

RAQUEL GARDINI SANCHES PALASIO

**“Polimorfismo dos genes mitocondrial 16S rRNA e nuclear ITS-2 em
populações de *Biomphalaria tenagophila* da Bacia Litorânea do
estado de São Paulo, e estudo da suscetibilidade dos caramujos ao
Schistosoma mansoni”**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAQUEL GARDINI SANCHES PALASIO

“Polimorfismo dos genes mitocondrial 16S rRNA e nuclear ITS-2 em populações de *Biomphalaria tenagophila* da Bacia Litorânea do estado de São Paulo e estudo da suscetibilidade dos caramujos ao *Schistosoma mansoni*”

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida pela candidata

**RAQUEL GARDINI SANCHES
PALASIO**

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal, na área de Biodiversidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães
Co-orientadora: Dra. Roseli Tuan

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P172p Palasio, Raquel Gardini Sanches, 1985-
Polimorfismo dos genes mitocondrial 16S rRNA e nuclear ITS-2 em populações de *Biomphalaria tenagophila* da bacia litorânea do estado de São Paulo e estudo da suscetibilidade dos caramujos ao *Schistosoma mansoni* / Raquel Gardini Sanches Palasio. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Eliana Maria Zanotti Magalhães.

Coorientador: Roseli Tuan.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Biomphalaria tenagophila*. 2. Filogenia - Aspectos moleculares. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. DNA ribossômico. 5. DNA mitocondrial. I. Zanotti-Magalhães, Eliana Maria, 1953-. II. Tuan, Roseli. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: DNA polymorphism within 16S rRNA and ITS-2 genes of *Biomphalaria tenagophila* from coastal basin at São Paulo state Brazil and implications to infection by strains of *Schistosoma mansoni*

Palavras-chave em inglês:

Biomphalaria tenagophila

Phylogeny - Molecular aspects

Schistosoma mansoni

DNA, ribosomal

DNA, Mitochondrial

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Eliana Maria Zanotti Magalhães [Orientador]

Patrícia Jacqueline Thyssen

Fernanda Pires Ohlweiler

Eliana Nakano

Marlene Tiduko Ueta

Data de defesa: 22-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 22 de Agosto de 2013.

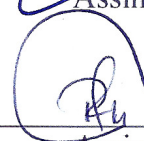
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Pires Ohlweiler



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Nakano

Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biologia, UNICAMP e seus professores, pela formação acadêmica e científica. Ao Laboratório de Helminologia, DBA/UNICAMP, que permitiu a realização de uma das partes dos experimentos de suscetibilidade e criação das populações de *Biomphalaria*.

A Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, pela infra-estrutura oferecida, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular que permitiu a realização dos experimentos moleculares e de coletas.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan por ceder a bactéria *E. coli* para o processo de clonagem e sequenciamento.

Às minhas orientadoras: Dra. Roseli Tuan, que há cinco anos me aceitou como aluna no programa de aprimoramento profissional da SUCEN, e deste então tem orientado no crescimento científico, por acreditar e por todos os conselhos. A Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães, pela paciência, empenho, dedicação, orientação durante o mestrado. Ao professor Dr. Luiz Augusto Magalhães, pelos conselhos e atenção.

Aos integrantes do L2B/Unicamp: Maicon Grella, Marcela Alonso (Qualy), Daniel Brancoli (Carioca), Fabio Rezende (Frango), Rafael Cedro, Maria Ligia Paseto, André Savino, Marina Klemm, Tacilda, Caue, agradeço a todos deste laboratório por ter cedido o espaço (um caramujo no meio das moscas), por todos os cafés e ajuda.

A Carolina Palanch pelas caronas e conversas, Carolina Regada, Mariana Nassu (Dori), Carina Mara de Souza, por ter permitido que me acomodasse em suas casas em Campinas, quando necessário. Em especial a Carina Mara de Souza por todo apoio desde a prova para ingresso do mestrado, nas formatações de texto, todos os conselhos e amizade e a Profa. Dra. Patrícia J. Thyssen, por todos os conselhos, sugestões e por compor a banca examinadora de defesa.

Aos integrantes do Laboratório de Helminto da Unicamp, Letícia Duarte, Luciana Franceschi, João Batista e Eliana Camargo, por toda ajuda no experimento e convivência.

Aos pesquisadores e funcionários da SUCEN-Sede e da regional de Caraguatatuba, por toda ajuda nas coletas, materiais, etc.. A pesquisadora Dra. Fernanda Pires Ohlweiler, por todas as críticas e sugestões e por compor a banca examinadora de defesa.

Aos integrantes do Laboratório de Malacologia da SUCEN, em especial à Dra. Marisa Guimarães pela ajuda nas coletas, dados parasitológicos. Aos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular da SUCEN, a Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte e Dr. José Eduardo Bracco, por toda ajuda e conselhos.

Aos aprimorandos do Laboratório de Biologia molecular, Diego Mendes Pereira, Roberta Silva, Nádia Martinez, Marta Ribeiro da Silva, por toda ajuda nos experimentos. À Eliane Batista e seu marido Rodrigo Toiço Souza, por toda ajuda no processo de clonagem. Aos aprimorandos do Laboratório de Imunologia, Entomologia e Malacologia, Eliane Janez, Marcelo Jordani, Petra Assis Pereira e Marco Marchi por todas as conversas. À Madilene Alves pela amizade e pela grande ajuda nos experimentos. Enfim a todos os aprimorandos da SUCEN, por tornarem as tardes na Sucen mais divertidas.

Aos meus pais Valter Sanches Palasio e Vanderli Gardini Palasio e meus irmãos Rafael e Carolina Gardini Sanches Palasio, por sempre estarem ao meu lado, deste o começo, os grandes incentivadores, que devo tudo, me ajudando nas horas difíceis, sem bolsa de estudo, na correria, no apoio emocional, todo carinho, confiança, por ouvirem a apresentação, toda paciência e compreensão. Vanderli por ler milhares de vezes a dissertação e pelos comentários. Carolina muito obrigada pela ajuda em inglês e pela paciência de invadir muitas vezes seu espaço. Aos meus familiares por todo incentivo.

Aos meus amigos Cibelly Goulart, Catia Melo, Richard Cardoso, Edileni Aparecida de Lima e Eduardo Lima Coghetto, por toda amizade, pelo incentivo de buscar algo maior e pelas conversas que me acalmaram em momentos de ansiedade.

Aos meus amigos judocas: Sebastião Barbosa da Costa, Diogo Heitor do Nascimento e Higor Faires Ferreira (Majin) pela paciência por me ouvirem falar incessantemente sobre o mestrado, conselhos e apoio. Ao Jaques Guimarães (Gemu), Douglas Guimarães, Marcelo Augusto de Souza (Cavanha), aos colegas do judô da Bushikan e Dell'Antônia pelo apoio que sempre permitiram relaxar, distrair para continuar. Aos meus senseis Renato Ribeiro e Francisco Costa por todo o apoio e incentivo.

**"Não se deixe levar pela distância
entre seus sonhos e a realidade.
Se você é capaz de sonhá-los,
também pode realizá-los!"
William Shakespeare**

RESUMO

O planorbídeo *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda: Planorbidae) é a espécie hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 predominante no estado de São Paulo. No estado de São Paulo a espécie está relacionada com a transmissão da maioria dos casos autóctones de esquistossomose. Exemplares de *B. tenagophila* provenientes de várias localidades da bacia Litorânea Paulista foram analisados quanto ao polimorfismo de um trecho do gene mitocondrial rRNA16S e o segmento ITS2 que integra o cistron de DNA ribossômico nuclear. Paralelamente foi testada a suscetibilidade de populações de *B. tenagophila* das localidades de Itariri, Caraguatatuba, Ilha Bela e São Sebastião com linhagens diferenciadas de *S. mansoni*. As localidades amostradas representam pontos importantes na transmissão da esquistossomose no estado de São Paulo, devido as condições de infraestrutura, por serem áreas inundáveis e pela presença de contingente humano de outras áreas do Brasil. Nesta situação, destacam-se o município de Itariri, onde ocorreram os maiores números de casos de esquistossomose no Vale do Ribeira e os municípios de Caraguatatuba e São Sebastião que ao longo dos anos vem tendo um aumento no número de casos autóctones. Do total de 1635 espécimes de *Biomphalaria* coletados nas coleções de água doce do Litoral Norte e Sul do estado de São Paulo observamos a predominância de 84% da espécie *B. tenagophila* e 16% da espécie *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). As análises moleculares indicaram que existem duas subpopulações de *B. tenagophila* nesta área, com haplótipos exclusivos para Juquiá e Registro, e sequências que compartilham o mesmo haplótipo do Litoral Norte e de Itariri. As taxas de infecções para as linhagens SJ e SJS mostraram que os caramujos do Litoral Norte foram mais suscetíveis que os caramujos do município de Itariri, talvez pode ser devido a proximidade dos municípios do Litoral Norte com o Vale do Rio Paraíba, local de origem da linhagem. A maior taxa de infecção correspondeu uma maior mortalidade nos moluscos de Caraguatatuba e Ilha Bela, indicando que o parasita afetou a sobrevivência dos moluscos. Os resultados deste trabalho mostraram que todas as populações testadas foram resistentes às linhagens BH e SE. Os resultados sugerem haver uma correlação positiva entre a suscetibilidade ao *S. mansoni* e a redução da variabilidade genética nas populações de caramujos testadas. Desta forma, o risco de infecção dos hospedeiros intermediários por *S. mansoni* estaria relacionado com populações de caramujos geneticamente homogêneas. Desta forma o grau de diversidade genética pode ser um indicador de risco para a transmissão da esquistossomose.

Palavras-chave: *Biomphalaria tenagophila*, Filogenia molecular, *Schistosoma mansoni*, DNA-ITS2, rRNA16S, Suscetibilidade, Vale do Ribeira, Litoral Norte.

ABSTRACT

DNA POLYMORPHISM WITHIN 16S rRNA AND ITS-2 GENES OF *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA* (ORBIGNY, 1835) (GASTROPODA: PLANORBIDAE) FROM COASTAL BASIN AT SÃO PAULO STATE BRAZIL AND IMPLICATIONS TO INFECTION BY STRAINS OF *SCHISTOSOMA MANSONI* SAMBON, 1907.

The planorbid *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda: Planorbidae) is the predominant intermediate host species of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in São Paulo state, where it is most related to autochthonous cases of schistosomiasis transmission. Specimens of *B. tenagophila* were obtained from several locations of São Paulo Coastal Basin and analyzed for the polymorphism of a portion of the mitochondrial gene rRNA16S and the ITS2 segment, which integrates the cistron of nuclear ribosomal DNA. In parallel it was tested the susceptibility of *B. tenagophila* populations from the municipalities of Itariri, Caraguatatuba, Ilha Bela and São Sebastião, with different strains of *S. mansoni*. These sampling sites represent important points of schistosomiasis transmission in São Paulo state due to infrastructure conditions, floodable areas and the presence of human contingent of other Brazilian areas, in particular the municipality of Itariri, where occurred the highest number of cases of schistosomiasis in the Ribeira Valley and in the cities of São Sebastião and Caraguatatuba that over the years it has had an increase in the number of autochthonous cases. Of the total 1635 of *Biomphalaria* specimens collected in freshwater pools from the North and South Coasts of the state of São Paulo, it was observed the predominance of 84% *B. tenagophila* species and the presence of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in 16%. The molecular analysis indicates that there are two subpopulations of *B. tenagophila* in this area, one with an exclusive and unique haplotype from Juquiá and Registro, and the other with sequences which share the same haplotype from the North Coast and Itariri. The infection rates of SJ and SJS strains show the snails from the North Coast are more susceptible than the snails from the municipality of Itariri. This, in hypothesis, can be caused due to the proximity of the cities of the North Coast and the Paraíba River Valley, site of origin of those strains. The highest infection rate corresponded to a higher mortality rate of the mollusks from Caraguatatuba and Ilha Bela, indicating the effect of the parasite in the snails' survival. The results of this study show that all tested populations were resistant to the BH and SE strains. The results suggest a positive relationship between *S. mansoni* susceptibility and the reduction of genetic variability in the snails populations tested. Therefore, the *S. mansoni* infection risk of the intermediate hosts would be related to genetically homogeneous snails' populations. And with that, genetic diversity can be an indicator of risk for the transmission of schistosomiasis.

Key-words: *Biomphalaria tenagophila*, Molecular phylogeny, *Schistosoma mansoni*, DNA-ITS2, rRNA16S, Susceptibility, Ribeira Valley, North Coast.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos autóctones de esquistossomose no estado de São Paulo, distribuído por bacia hidrográfica nos períodos de 1981 a 2008.....	11
Tabela 2 – Temperatura média anual, pluviosidade média anual e o atendimento da rede de esgoto sanitário ou pluvial coletado do Vale do Ribeira (Itariri, Juquiá e Registro) e do Litoral Norte do estado São Paulo.....	14
Tabela 3 – Pontos de coletas e procedência das amostras de DNA das populações de <i>Biomphalaria</i> nas bacias do Vale do Ribeira de Iguape e Litoral Norte de São Paulo.....	27
Tabela 4 – Quantidade de DNA's extraídos, sequências de 16S/ ITS-2 e identificação geográfica.....	35
Tabela 5 - Quantidade de caramujos das populações de <i>Biomphalaria tenagophila</i> testadas por localidade e as diferentes linhagens de <i>Schistosoma mansoni</i> e grupo controle.....	45
Tabela 6 - Caracterização geográfica, espécie e resultado parasitológico nos pontos de coletas de caramujos da bacia hidrográfica do Litoral Norte do estado de São Paulo.....	47
Tabela 7 - Caracterização geográfica, espécie e resultado parasitológico nos pontos de coletas de caramujos da bacia hidrográfica do Vale do Rio Ribeira do Iguape do estado de São Paulo.....	48
Tabela 8 - Índices de diversidade molecular para o gene mitocondrial 16S rRNA de <i>B. tenagophila</i> estimados em sequências agrupadas conforme microrregiões litorâneas do estado de São Paulo.....	49
Tabela 9 - Índices de divergência genética para o gene mitocondrial 16S rRNA de <i>Biomphalaria tenagophila</i> calculados entre as microrregiões do Litoral Norte e Sul do estado de São Paulo.....	49
Tabela 10 - Polimorfismo molecular estimado para as 55 sequências do gene mitocondrial 16S rRNA de <i>Biomphalaria tenagophila</i>	50
Tabela 11 - Estimativa de divergência genética entre as diferentes populações de <i>Biomphalaria tenagophila</i> para o mitocondrial 16S rRNA com 322 nucleotídeos testadas aos pares em DNAsp.....	51
Tabela 12 - Banco de dados com 55 sequências do gene mitocondrial 16S rRNA de <i>Biomphalaria tenagophila</i> e 7 sequências de <i>B. straminea</i> estruturadas em grupos de haplótipos.....	52
Tabela 13 - Índices de diversidade intrapopulacional para o gene 16S da espécie <i>B. tenagophila</i>	52
Tabela 14 - Índices de diversidade molecular para o gene nuclear ITS2 das 31 sequências de <i>Biomphalaria tenagophila</i> estimados em sequências agrupadas conforme microrregiões litorâneas do estado de São Paulo ...	57
Tabela 15 - Polimorfismo molecular estimado para as 31 sequências do gene nuclear ITS2 de <i>B. tenagophila</i> por DNAsp.....	58
Tabela 16 - Índices de divergência genética para o gene ITS2 de <i>Biomphalaria tenagophila</i> calculados entre as microrregiões dos Litorais Norte e Sul do estado de São Paulo.....	58
Tabela 17 - Estimativa de divergência genética entre as diferentes populações de <i>Biomphalaria tenagophila</i> para o gene ITS2 com 409 nucleotídeos.....	59
Tabela 18 - Banco de dados com 31 sequências do gene ITS2 de <i>B. tenagophila</i> e 2 sequências de <i>B. straminea</i> estruturadas em grupos de haplótipos.....	60
Tabela 19 - Diversidade genética molecular intrapopulacional de <i>B. tenagophila</i> de ITS2.....	60
Tabela 20 - Índices de diversidade molecular do conjunto de haplótipos para as sequências da região 16S e ITS2 de <i>Biomphalaria tenagophila</i>	64
Tabela 21 - Taxas de infecção, taxa de mortalidade e período pré patente de <i>Biomphalaria tenagophila</i> expostas às linhagens SJ e SJS.....	65
Tabela 22 - Taxa de infecção de <i>Biomphalaria tenagophila</i> de Itariri, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha Bela exposta às linhagens BH e SE de <i>S. mansoni</i>	66
Tabela 23 - Número de casos autóctones de esquistossomose no Litoral Norte e Vale do Rio Ribeira nos períodos de 1981 a 2010.....	75
Tabela 24 - Distribuição de <i>Biomphalaria tenagophila</i> examinadas e positividade para <i>S. mansoni</i> no período de 2001 a 2005, no Litoral Norte.....	78
Tabela 25 - Comparação entre os índices de diversidade genética para o gene 16S rRNA das populações de Travessão, Indaiá e Morro de Algodão, Barra do Una e Fábrica Alumínio com as taxas máximas (%) de suscetibilidade às linhagens de <i>S. mansoni</i> testadas neste estudo.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies de <i>Biomphalaria</i> descritas na África (11 espécies), nas Américas (26 espécies), no Brasil (•) (11 espécies e uma subespécie) e no estado de São Paulo (8 espécies), Invasão de <i>B. tenagophila</i> na África e na Romênia (○), (*) Suscetível ao <i>S. mansoni</i>	2
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria</i> na América do Sul. (A) hospedeiras intermediárias de <i>S. mansoni</i> e (B) pertencentes ao complexo <i>Biomphalaria tenagophila</i>	3
Figura 3 - Bacias hidrográficas (A) e os 246 municípios com criadouros de <i>B. tenagophila</i> no estado de São Paulo (B)	4
Figura 4 - Distribuição dos casos de Esquistossomose: casos autóctones, importados, indeterminados e totais, 1981 a 2012 (A) e total de casos notificados segundo Evolução, 1998 a 2012 (B), no estado de São Paulo.....	7
Figura 5 - Distribuição de casos autóctones e totais das GVEs do estado de São Paulo para o ano de 2010.....	8
Figura 6 - Porcentagem de casos de esquistossomose no estado de São Paulo, distribuído por bacia hidrográfica nos períodos de 1981 a 2010.....	9
Figura 7 - Número de casos autóctones de esquistossomose da Bacia Litorânea Paulista distribuída nas suas regiões nos períodos de 1981 a 2010	10
Figura 8 - Mapa do relevo do estado de São Paulo na bacia Litorânea: (A) em cores hipsométricas com sombreado e (B) aspectos geomorfológicos	15
Figura 9 - Esquema da molécula de DNA mitocondrial de <i>Biomphalaria</i> e dos genes ribossômicos (Espaçador transcrito interno, ITS, Espaçador transcrito externo, ETS e espaçador não transcrito, NTS)	19
Figura 10 - Mapa da Bacia Litorânea (Litoral Norte, Baixada Santista e Ribeira do Iguape) com seus municípios, rios/afuentes, foco de esquistossomose e criadouro de <i>B. tenagophila</i> e pontos de coletas	26
Figura 11 - Visualização em gel de agarose 1,4% das extrações de <i>Biomphalaria</i> , da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular de 1kb; 2ª e 3ª colunas: N° LBMSU 503 e 504, da localidade de Itariri, Ana Dias, Foco Palmito.....	36
Figura 12 - Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy, utilizado no processo de transformação bacteriana	40
Figura 13 - Foto das placas com as colônias azuis sem o inserto e colônias brancas com o inserto de ITS2 das amostras de 354 (Juquiá), 495 e 501 (São Sebastião/ Barra do Una) respectivamente e demonstração da transferência de uma colônia branca para o tubo tipo Eppendorff.....	41
Figura 14 - Visualização em gel de agarose 1,4% das purificações de <i>Biomphalaria</i> , corado com Gel red, (A) ITS2, da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular “Low Ladder”, 2ª, 3ª e 4ª colunas: N° LBMSU 354 (Juquiá), 495 e 501(São Sebastião). (B) 16S, da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular 500pb, 2ª, 3ª e 4ª colunas: N° LBMSU 532, 534, 535 e 536 (Itariri)	42
Figura 15 - Distribuição geográfica das sequências de 16S agrupadas em haplótipos.....	53
Figura 16 - Rede de haplótipos de 16S calculada por meio de parcimônia, em TCS.....	54
Figura 17 - Árvore calculada para o gene mitocondrial 16S rRNA a partir de matriz de distância, com correção baseada em modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, construção de árvore ótima com algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 réplicas, no software PAUP.....	55
Figura 18 - Representação gráfica da relação evolutiva entre os haplótipos do gene mitocondrial 16S rRNA de <i>Biomphalaria tenagophila</i> , após análise por Máxima Parcimônia e busca heurística para a construção da árvore de consenso. Confiabilidade dos ramos calculada por bootstrap em 1000 réplicas.....	56
Figura 19 - Representação gráfica da relação de parentesco entre os haplótipos 16S rRNA de <i>B. tenagophila</i> , após análise Bayesiana, no software MrBayes.	56
Figura 20 - Distribuição geográfica das sequências de ITS2 agrupadas em haplótipos.	61
Figura 21 - Árvore calculada para o gene ITS2 a partir de matriz de distância, com correção baseada em modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, construção de árvore com algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 réplicas.	62
Figura 22 - Representação gráfica da relação evolutiva entre os haplótipos ITS2 de <i>Biomphalaria tenagophila</i> , após análise por Máxima Parcimônia e busca heurística para a construção da árvore de consenso. Confiabilidade dos ramos calculada por bootstrap em 1000 réplicas.	63
Figura 23 - Representação gráfica da relação de parentesco entre os haplótipos ITS2 de <i>Biomphalaria tenagophila</i> , após análise Bayesiana.	63
Figura 24 - Taxa de infecção de <i>Biomphalaria tenagophila</i> das localidades de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela, expostas às linhagens SJ e SJS	65

Figura 25 - Taxa de infecção e período pré-patente em <i>Biomphalaria tenagophila</i> das localidades de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela infectadas com as linhagens SJ e SJS.....	67
Figura 26 - Mortalidade dos caramujos por semana após a infecção com <i>Schistosoma mansoni</i> das linhagens BH, SE, SJ e SJS.....	68
Figura 27 - Taxa de mortalidade dos caramujos após a exposição ao <i>Schistosoma mansoni</i> das linhagens BH, SE, SJ e SJS (A) agrupados por linhagem (B) agrupados por localidade.....	69
Figura 28 - Taxa de mortalidade de 6 populações de <i>Biomphalaria tenagophila</i> de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela infectados com as linhagens SJ e SJS, separados do total de moluscos mortos, aqueles que liberaram (positivos) ou que não liberaram cercárias (negativos).	71
Figura 29 - Taxas de infecção e mortalidade por 14 semanas de <i>Biomphalaria tenagophila</i> de Itariri e Ilha Bela, expostas às linhagens SJ e SJS de <i>Schistosoma mansoni</i>	71
Figura 30 - Taxas de infecção e mortalidade por 14 semanas de <i>Biomphalaria tenagophila</i> de Caraguatatuba (Indaiá P1, P3 e P4 e Morro do Algodão P2) expostas às linhagens SJ e SJS de <i>Schistosoma mansoni</i>	72
Figura 31 - Distribuição de casos autóctones de esquistossomose, por ano de notificação por municípios, do Litoral Norte e Vale do Ribeira do Iguape, 1981 a 2010.....	80

Anexo

Figura I - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (n° ●) em Caraguatatuba	99
Figura II - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados (n° ●) no município de Caraguatatuba no bairro (15) Indaiá, (16) Morro do Algodão (CA) (ponto 1 -Casimiro de Abreu) e (JA) (ponto 2 - Jose Antonio Ferreira), (17) Porto Novo, ponto 1 e 2 (P1 e P2), (1) Travessão e (19) Rio Claro (Cambixo)	99
Figura IV - Locais de coleta em Caraguatatuba, no bairro Morro do Algodão. (A) Rua Casimiro de Abreu – P2 e (B) Rua Jose Antonio Ferreira – P1	100
Figura V - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados (n°●) no município de Caraguatatuba, no bairro Indaiá em 4 pontos.....	100
Figura VI - Local de coleta em Caraguatatuba, no Bairro Indaiá no ponto 1, afluente do Rio Santo Antônio.....	101
Figura VII - Locais de coletas em Caraguatatuba, no Bairro Rio Claro e na Rua Cambixo em dois locais da fazenda no lado Esquerda (A e B) e lado Direita (C) e imagem de satélite (D) delimitando área e pontos amostrados (n° ●).....	101
Figura VIII - Locais de coleta em Caraguatatuba (Bairro Travessão).....	102
Figura IX - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (n° ● ou ●) em Ilha Bela e Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no bairro Itaquanduba e Barra Velha.....	103
Figura X - Local de coleta em Ilha Bela – (A) Barra Velha e (B) Itaquanduba.....	104
Figura XI - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (n°●●) em São Sebastião e Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no bairro Camburi, Maresias, Boracéia, Canto do Mar e Barra do Una	105
Figura XII - Imagem de satélite dos locais de coletas em São Sebastião, nas valas no bairro Canto do Mar (A), Camburi (B), Maresias (C), Boracéia (D) e Barra do Una (E).....	105
Figura XIII - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (22 ● Bairro Sesmaria) em Ubatuba	106
Figura XIX - Imagem de satélite do local de coleta em Ubatuba, vala da Avenida Fluminense	106
Figura XX - Mapa hidrografico delimitando os pontos de coleta (N°●) do municipio de Itariri e imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no distrito de Ana Dias (13 - Foco Palmito, 14 – Fábrica Alumínio, 21.....	107
Figura XXII - Local de coleta em Itariri, Distrito Ana Dias, na	108
Figura XXIII - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no distrito Raposo Tavares (20 – Pesqueiro Balsamo e Hotel Juréia).....	108
Figura XXIV – Local de Coleta em Itariri, Distrito Raposo Tavares, no Pesqueiro Balsamo (A) e no Hotel Juréia (B) ...	108
Figura XXV - Mapa hidrografico delimitando os pontos de coleta (N° ●) do município de Registro e Juquiá	109
Figura XXVI - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados do municipio de Registro	109
Figura XXVII - Local de coleta em Registro, na Vila São Francisco	110
Figura XXIX - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no município de Juquiá (8-Parque Nacional, 9-Centro e 10-Bairro Estação)	110
Figura XXX - Local de coleta em Juquiá, (A) Bairro Estação e (B) Parque Nacional	111
Figura XXXI - Local de coleta em Juquiá, no Centro (Vila Florida)	111
Anexo 1 - Protocolo de extração de tecido animal	112
Anexo 2 - Alinhamento em Clustal X dos 322 nucleotídeos A, T, C, G das sequências de 16S dos 55 indivíduos da espécie <i>B. tenagophila</i> mais 7 sequência de <i>B. straminea</i>	113
Anexo 3 - Alinhamento em Clustal X dos 410 nucleotídeos A, T, C, G das sequências de ITS2 dos 31 indivíduos da espécie <i>B. tenagophila</i> mais duas sequência de <i>B. straminea</i>	116

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>BIOMPHALARIA</i> E A IMPORTÂNCIA DA <i>B. TENAGOPHILA</i> COMO HOSPEDEIRA INTERMEDIÁRIA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. A DINÂMICA DA TRANSMISSÃO DA ESQUISTOSSOMOSE NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	5
2.2. SUSCETIBILIDADE DE <i>B. TENAGOPHILA</i> AO <i>S. MANSONI</i> NO VALE DO RIBEIRA E LITORAL NORTE.....	13
2.3. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM <i>BIOMPHALARIA</i> SPP.....	17
3. JUSTIFICATIVAS	21
4. OBJETIVOS.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 COLETAS DOS CARAMUJOS E PROCEDÊNCIAS DAS AMOSTRAS DE DNA	25
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS LOCALIDADES DE COLETA NO LITORAL NORTE.....	27
5.2.1 CARAGUATATUBA	28
5.2.2 ILHA BELA	29
5.2.3 SÃO SEBASTIÃO.....	30
5.2.4 UBATUBA.....	30
5.3. CARACTERÍSTICAS DAS LOCALIDADES DE COLETA NO VALE DO RIBEIRA/LITORAL SUL.....	31
5.3.1 ÍTARIRI.....	31
5.3.2. REGISTRO E JUQUIÁ.....	32
5.4. EXAME PARASITOLÓGICO E DISSECÇÃO DOS CARAMUJOS	33
5.5. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÕES E SEQUENCIAMENTO	35
5.6. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE ITS-2, PCR PÓS-CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO	39
5.7. ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES.....	43
5.8. ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE <i>BIOMPHALARIA TENAGOPHILA</i>	45
6. RESULTADOS	47
6.1. COLETA NO LITORAL NORTE	47
6.2. COLETA NO VALE DO RIBEIRA/LITORAL SUL	48
6.3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL NA ESPÉCIE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. STRAMINEA</i>	49
6.3.1 ANÁLISE DE rRNA 16S.....	49
6.3.2 ANÁLISE DE ITS2	57
6.4. TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE <i>BIOMPHALARIA TENAGOPHILA</i>	65
6.4.1. TAXA DE INFECÇÃO	65
6.4.2. TAXA DE MORTALIDADE.....	68
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	73
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	99

1. Introdução

1.1. Distribuição geográfica do gênero *Biomphalaria* e a importância da *B. tenagophila* como hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*

Nos continentes Americano e Africano os moluscos gastrópodes do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Pulmonata: Basommatophora: Planorbidae) são representados por 37 espécies de caramujos de água doce (Mandahl-Barth, 1957; Malek, 1985; Carvalho *et al.*, 2008a); nove destas espécies (Figura 1) são consideradas suscetíveis ao *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, parasita causador da esquistossomose mansônica. Nas Américas foram descritas 26 dentre as 37 espécies (Figura 1) de *Biomphalaria* (Carvalho *et al.*, 2008a); no Brasil são encontradas onze espécies e uma subespécie para esse gênero (Teodoro *et al.*, 2010) sendo três delas hospedeiras naturais do *S. mansoni*: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848).

As coleções hídricas de água doce do estado de São Paulo são colonizadas por oito das onze espécies de *Biomphalaria* descritas para o Brasil (Figura 1): *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. schrammi* (Crosse, 1846), *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. occidentalis* Paraense, 1981, e as três espécies hospedeiras intermediárias naturais do *S. mansoni*, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Ohlweiler *et al.*, 2010).

A distribuição neotropical de *B. tenagophila* inclui o Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru e Bolívia (Paraense, 2001). No Brasil a espécie foi registrada nos seguintes estados: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e no Distrito Federal (Figura 2) (Ministério da Saúde, 2008).

B. tenagophila predomina sobre as demais espécies no estado de São Paulo estando presente em todas as bacias hidrográficas (Figura 3). Apresenta alta probabilidade de ocorrência em coleções de água doce transitórias e peri-urbanas, com pouca ou nenhuma correnteza, como represas, lagos, córregos, alagados, valas e valetas de irrigação (Paraense, 2001; CVE, 2007).

No Estado de São Paulo *B. tenagophila* representa maior risco para a transmissão da esquistossomose humana, pois coloniza corpos de água doce em 38% dos 645 municípios (Figura

3). Em comparação, *B. glabrata* e *B. straminea* colonizam, respectivamente, 6% e 4% dos municípios do Estado de São Paulo (Carvalho *et al.*, 2008b).

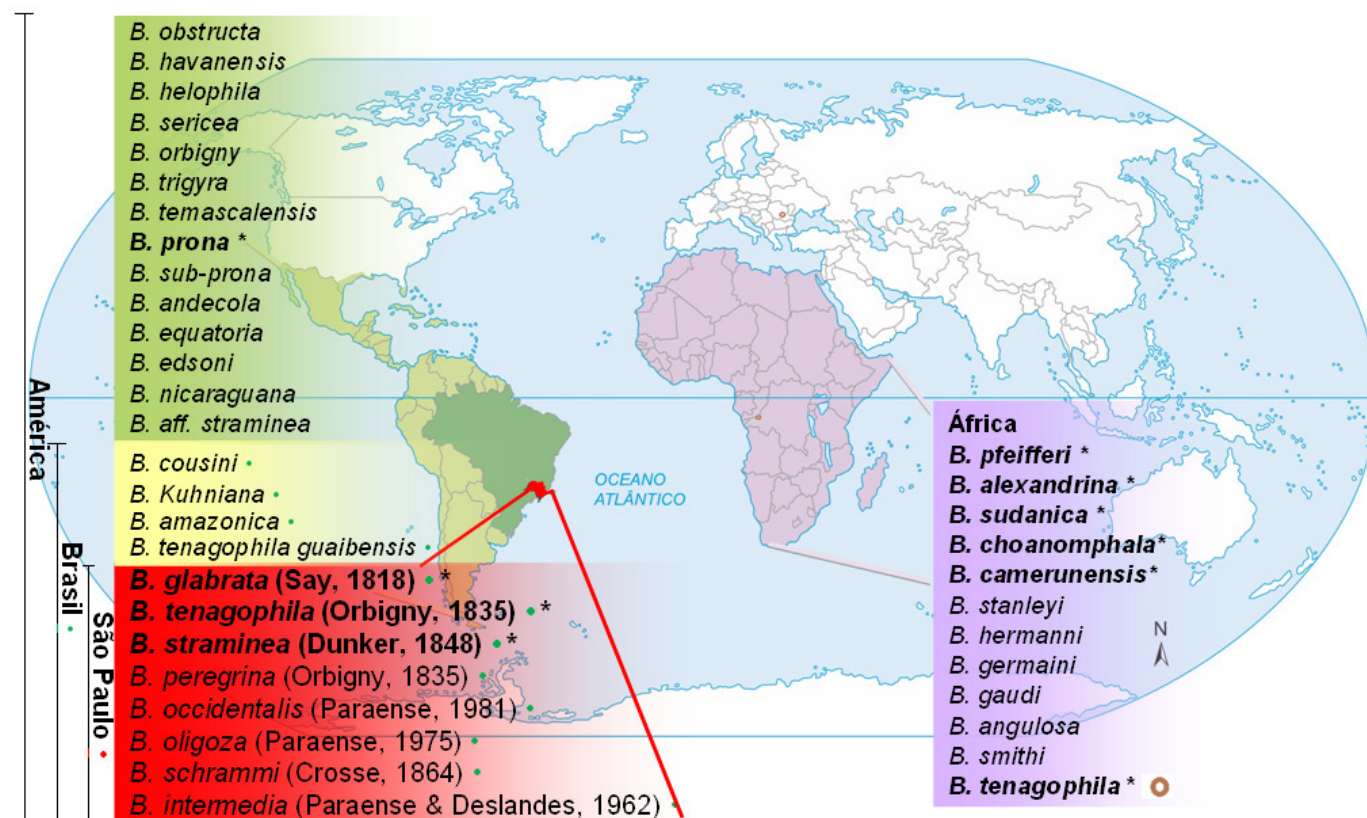


Figura 1 - Espécies de *Biomphalaria* descritas na África (11 espécies) (de acordo com Carvalho *et al.*, 2008a), nas Américas (26 espécies), no Brasil (•) (11 espécies e uma subespécie) (de acordo com Ministério da Saúde, 2008; Teodoro *et al.*, 2010) e no estado de São Paulo (8 espécies) (de acordo com Ohlweiler *et al.*, 2010), Invasão de *B. tenagophila* na África e na Romênia (○) (de acordo Pointier *et al.*, 2005 & Majoros *et al.*, 2008), (*) Suscetível ao *S. mansoni* (Tuan *et al.*, 2012, modificado).

A facilidade de dispersão e colonização de novos habitats por *B. tenagophila* é um fato importante para a saúde pública, o que causa preocupação, e como exemplos podemos citar o registro de *B. tenagophila* em Kinshasa (Congo) na África (Pointier *et al.*, 2005) e na Romênia (Majoros *et al.*, 2008).

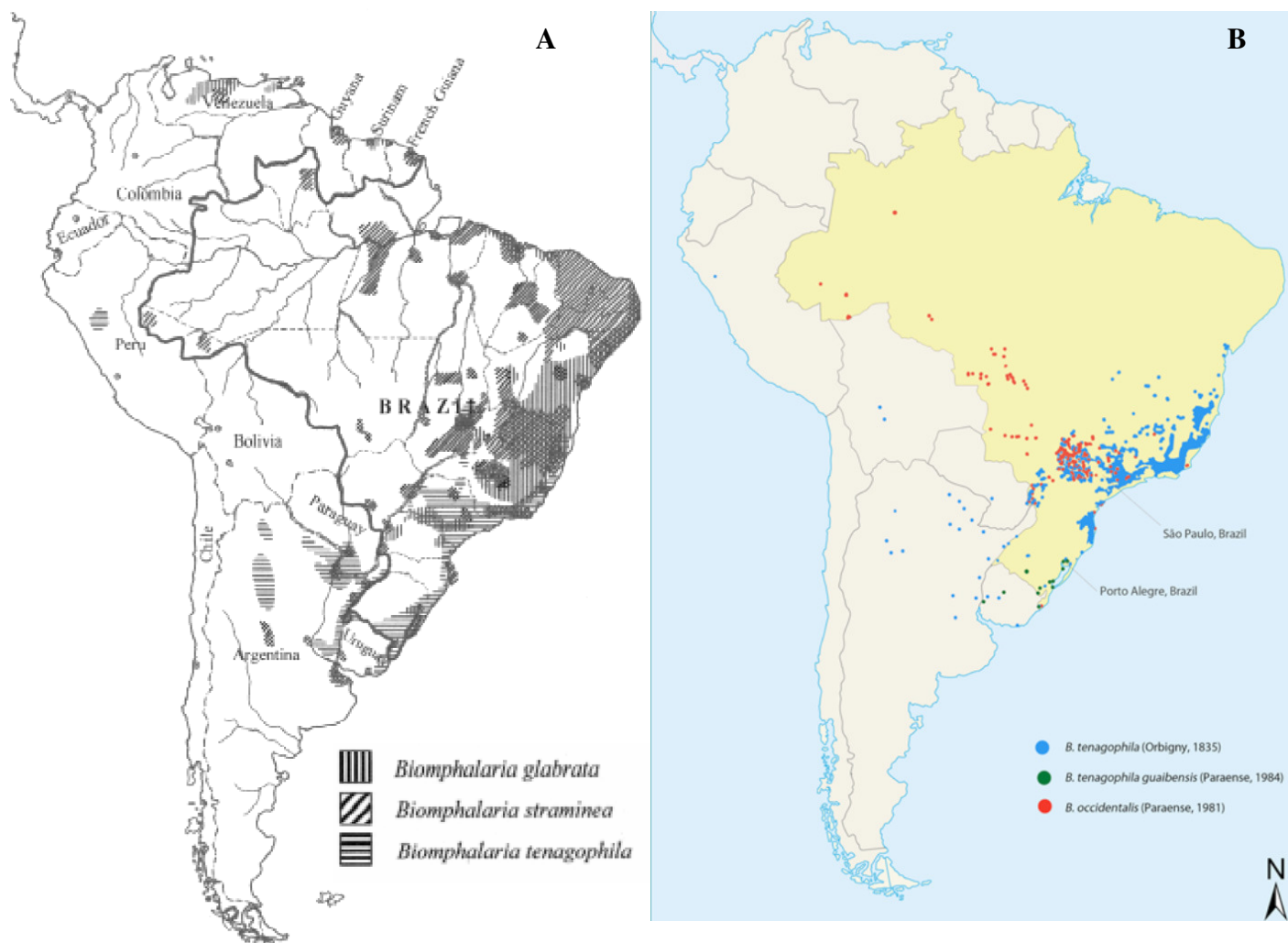


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria* na América do Sul. (A) hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* (Paraense, 2001) e (B) pertencentes ao complexo *Biomphalaria tenagophila* (Palasio & Tuan baseado na ilustração: Lima *et al.*, 1993; Paraense, 1984, 2001; Carvalho & Caldeira, 2004, Tuan *et al.*, 2012).

A capacidade de colonização em ambientes distantes da população original é potencializada pelo fato destes caramujos se reproduzirem de forma eficiente por autofecundação (Paraense, 1955; Tuan & Simões, 1989). O processo de colonização de novos habitats por *B. tenagophila* pode aumentar significativamente em função da sobrevivência destes caramujos em estado fisiológico basal (estivação/anidrobiose) após longos períodos de seca (Tuan *et al.*, 1984). Via de regra, ciclos de cheia-seca são perturbações em ecossistemas com influência na variação da diversidade de espécies (Buckling *et al.*, 2000).

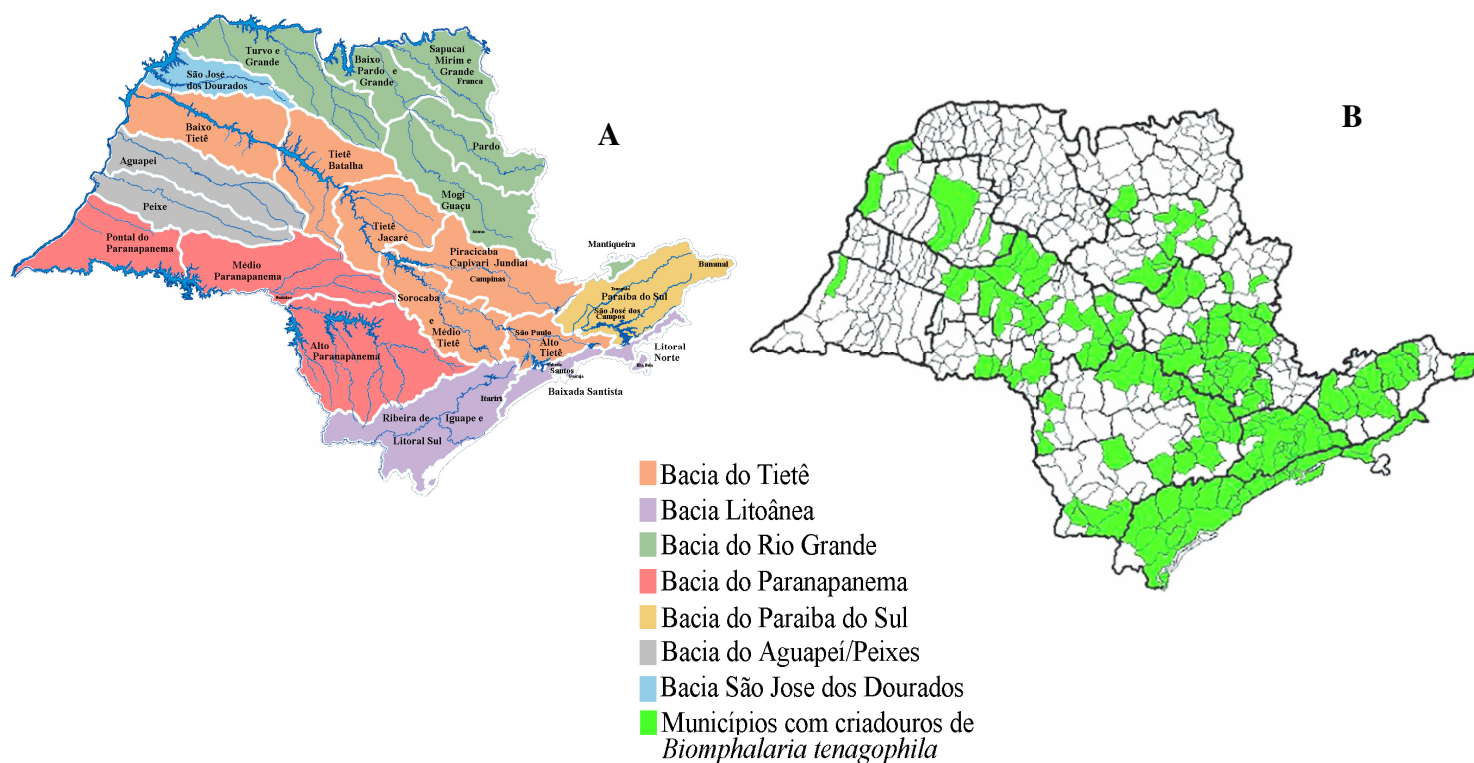


Figura 3 - Bacias hidrográficas **(A)** (Zanna, 2010) e os 246 municípios com criadouros de *Biomphalaria tenagophila* no estado de São Paulo **(B)** (CVE, 2007).

2. Revisão da literatura

2.1. A dinâmica da transmissão da esquistossomose no estado de São Paulo

A esquistossomose *lato sensu* é endêmica em 78 países no mundo e o número de pessoas infectadas em 2011 foi estimado em mais de 243 milhões (WHO, 2013). No continente americano existe apenas uma espécie de helminto que pode provocar a doença no homem: o *S. mansoni* (Ministério da Saúde, 2008). No Brasil, existem cerca de oito milhões de indivíduos infectados com *S. mansoni* em 19 estados da união (Ohlweiler *et al.*, 2010; Ministério da Saúde, 2011).

A esquistossomose é denominada como doença negligenciada e prevalece significativamente em populações humanas de baixa renda devido ao baixo investimento na geração de novos conhecimentos, na produção de tratamentos inovadores e em ações planejadas de saúde pública (Morel, 2006; Feasey *et al.*, 2009).

Os caramujos hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* se infectam com a forma larval do *S. mansoni* denominada miracídio. Os miracídios eclodem dos ovos do parasita, eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo infectado. Nos caramujos, os miracídios transformam-se em esporocistos primários os quais geram os secundários, desenvolvendo posteriormente em formas larvárias denominadas cercárias, as quais são eliminadas na água. As cercárias, em contato com o homem, penetram através da pele, diferenciando-se em esquistossômulos. Os esquistossômulos chegam aos vasos sanguíneos ou aos vasos linfáticos, a seguir ao coração e pulmões, depois ao fígado. Nele se diferenciam em formas sexuadas do parasita, os vermes adultos, que migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo e após cruzamento eliminam ovos recomeçando o ciclo (Deane, 1955; Rey, 1992; Katz & Almeida, 2003).

O *S. mansoni* foi provavelmente introduzido no Brasil no século XVI, com a vinda dos escravos africanos para localidades da região do nordeste brasileiro principalmente Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe (Silva, 1985). A disseminação da esquistossomose da região do nordeste brasileiro em direção ao sudeste deu-se em função dos movimentos migratórios e da expansão dos centros urbanos para as regiões onde ocorriam as espécies hospedeiras naturais (Chieffi & Waldman, 1988).

Os primeiros casos autóctones da esquistossomose no estado de São Paulo foram descritos no município de Santos em 1923 (Arantes, 1923). A partir dos anos 50, a esquistossomose se expandiu do litoral para localidades do interior do estado de São Paulo (Piza & Ramos, 1960; Chieffi & Waldman, 1988), quando passou a ser reconhecida como um grave problema de saúde pública (Silva, 1985). Em 1951 foram registrados 100 casos autóctones no estado de São Paulo em 3 municípios, 20 anos depois, em 1970, o número de casos subiu para 716 casos autóctones em 30 municípios. Ramos & Piza (1971) observaram que a expansão da doença está relacionada com características geográficas específicas e com as bacias hidrográficas onde estão distribuídos os hospedeiros intermediários.

A partir dos anos 1950 e durante trinta anos o número de casos autóctones e importados da doença no Estado de São Paulo progrediu de forma acentuada. O número total de casos de esquistossomose autóctones e importados notificados no Estado de São Paulo, entre 1951 e 1976, somam mais de 9.000 casos. Durante o período de 1978 a 1983 foram diagnosticados a média anual de 20.000 novos casos (Sucen, 1980, 1982; Chieffi & Waldman, 1988). A aplicação de medidas de controle, a eficácia dos medicamentos para o tratamento, com impacto significativo no aumento de casos com cura, a crescente urbanização e mudanças no padrão de produção agrícola (Waldman, Silva & Monteiro, 1999; Barata, 2000) no estado de São Paulo, reduziram substancialmente a média anual de casos notificados de esquistossomose, de 20 mil na década de 80 (Sucen, 1980, 1982; Chieffi & Waldman, 1988) para 1027 casos notificados no ano de 2010 (CVE, 2008, 2010, 2011ab; SINAN, 2012) (Figura 4).

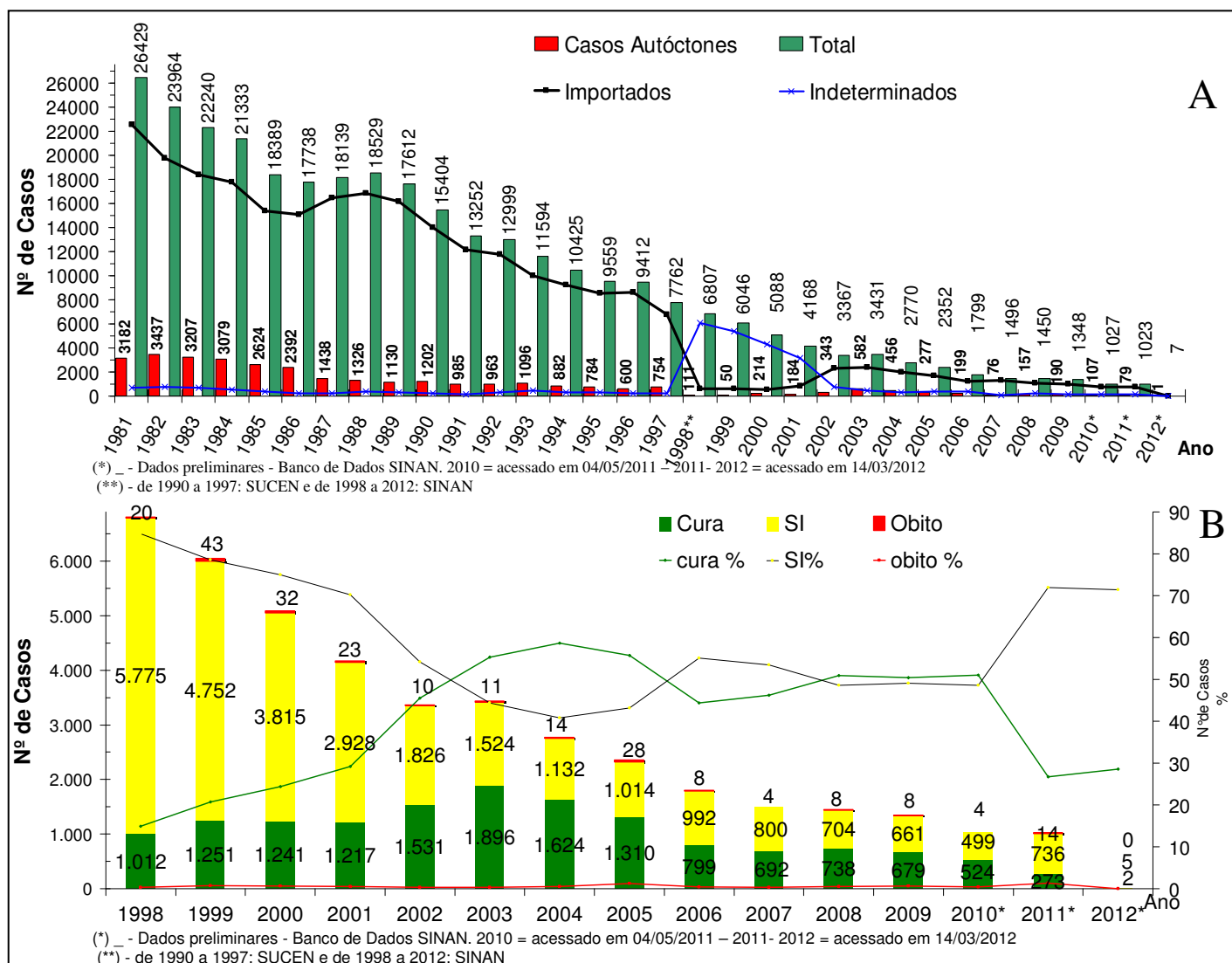


Figura 4 - Distribuição dos casos de Esquistossomose: casos autóctones, importados, indeterminados e totais, 1981 a 2012 (A) e total de casos notificados segundo Evolução, 1998 a 2012 (B), no estado de São Paulo (CVE, 2008, modificado, 2011ab, SINAN, 2012). SI = sem informação.

A área atual de transmissão autóctone da esquistossomose no estado de São Paulo está relacionada com áreas endêmicas localizadas no Vale do Ribeira, Vale do Paraíba, Litoral Norte, Baixada Santista, Grande Campinas e alguns municípios da Região Metropolitana de São Paulo, incluindo a capital (Figura 5) (Secretaria de Estado da Saúde, 2009) onde a espécie *B. tenagophila* é predominante (Carvalho *et al.*, 2008b). A única exceção está relacionada com os casos procedentes dos criadouros naturais de *B. glabrata*, restritos a coleções de água no trecho

médio do Rio Paranapanema onde a espécie coloniza inúmeras coleções de água (Eduardo & Souza *et al.*, 2005).

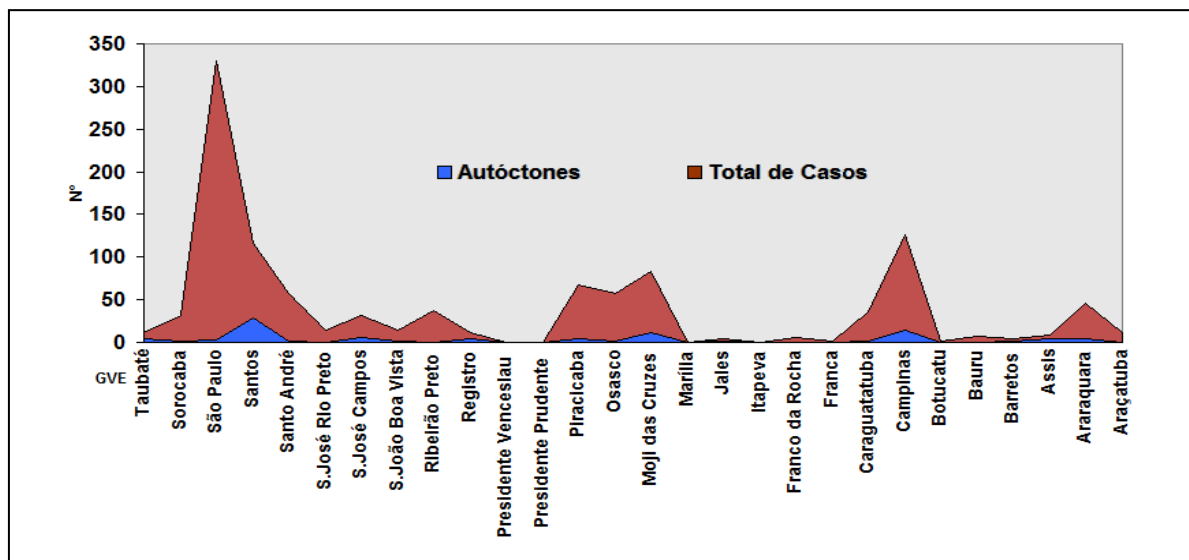


Figura 5 - Distribuição de casos autóctones e totais das GVEs do estado de São Paulo para o ano de 2010 (CVE, 2011b).

Na serie histórica apresentada na Tabela 1 podemos observar que em números totais há um decréscimo significativo do número de casos autóctones em todas as regiões do estado de São Paulo. Ao analisarmos detalhadamente os dados, verificamos que em alguns casos a transmissão mostra-se inalterada ao longo do tempo, enquanto em outras localidades há um aumento na transmissão local da esquistossomose (Figura 6). A região do município de Campinas, por exemplo, mantém a média de casos desde a década de sessenta em torno de 6,5 casos por 100 mil habitantes por ano (Lima, 1995) o que demonstra a dificuldade em reduzir a transmissão local da esquistossomose.

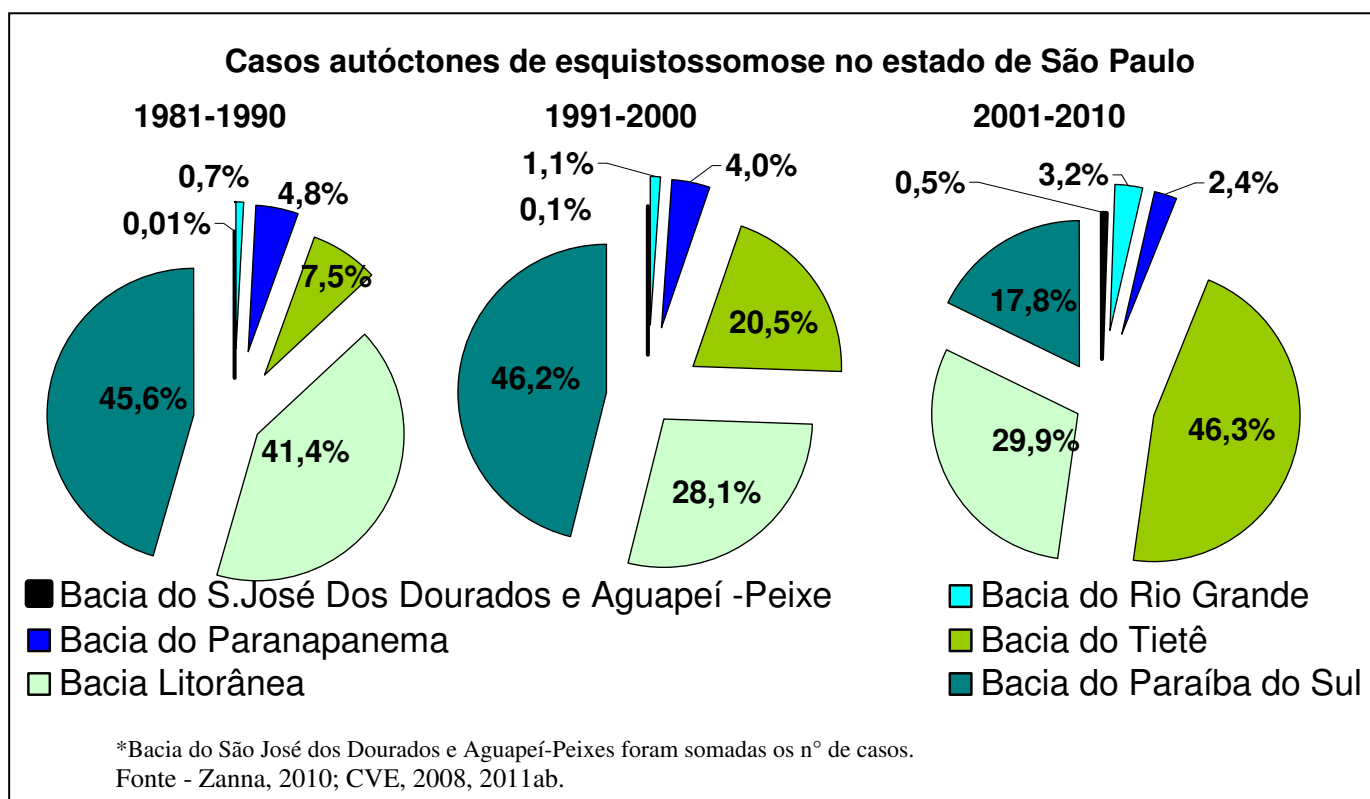


Figura 6 - Porcentagem de casos de esquistossomose no estado de São Paulo, distribuído por bacia hidrográfica nos períodos de 1981 a 2010.

Contudo, considerando que a distribuição de *B. tenagophila* abrange áreas onde ainda não existe transmissão local da esquistossomose, há ainda risco de expansão da área de ocorrência da doença, potencializada por modificações ambientais promovidas pelo homem, deslocamento humano e as precárias condições de infraestrutura de saneamento (Ministério da Saúde, 2010).

Interessa-nos particularmente o perfil da transmissão da esquistossomose em municípios cujas coleções hídricas estão localizadas na região do Rio Ribeira do Iguape e Litoral Norte (Figura 7).

No Vale do Ribeira, a maioria dos casos registrados foi descrito no município de Itariri (Tabela 1). Neste município foi registrado o primeiro foco de esquistossomose no Vale do Ribeira, descrito em 1953, no distrito de Ana Dias. Posteriormente a transmissão autóctone foi registrada nos municípios de Pedro de Toledo (1956) e Miracatu (1960) (Ramos *et al.*, 1969; Ramos & Piza, 1971). Atualmente os focos de esquistossomose no Vale do Ribeira estão

descritos em quatro municípios (Juquiá, Miracatu, Pedro de Toledo e Itariri) (Teles *et al.*, 2005). A espécie *Biomphalaria tenagophila* ocorre em 15 dos 24 municípios desta região: Apiaí, Cananéia, Eldorado, Iguape, Iporanga, Itariri, Jacupiranga, Juquiá, Jquitiba, Miracatu, Pariquera-Açu, Pedro de Toledo, Registro, Ribeira e Sete Barras. (IBGE, 2007; Teles *et al.*, 2005).

No Litoral Norte a transmissão da esquistossomose é mais recente. Observa-se ao longo dos anos, um aumento significativo de casos autóctones, tanto em Caraguatatuba quanto em São Sebastião (Figura 7/Tabela 1). No município de Ubatuba e Ilha Bela o número de casos se mantém inalterado nas últimas 3 décadas, sendo que o primeiro foco de esquistossomose no município de Ubatuba foi registrado década de 80 (CVE, 2008, 2011b).

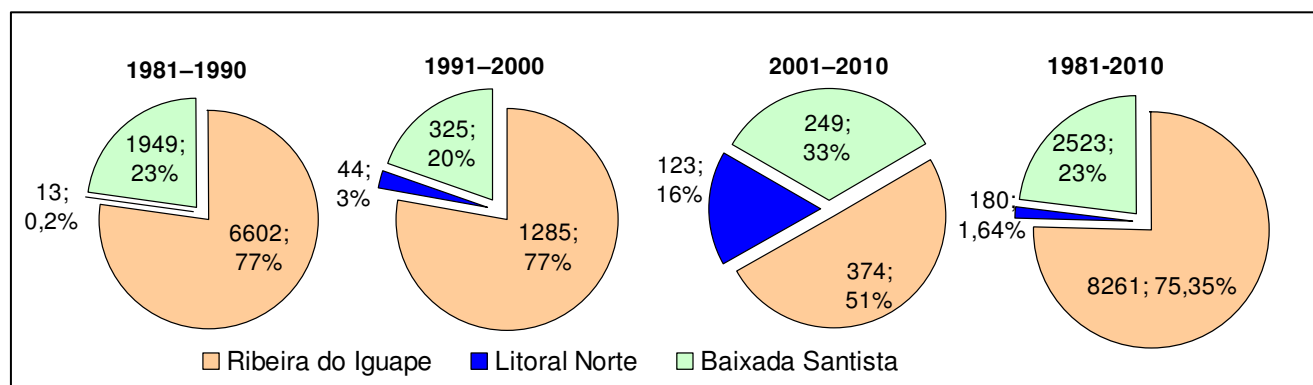


Figura 7 - Número de casos autóctones de esquistossomose da Bacia Litorânea Paulista distribuída nas suas regiões nos períodos de 1981 a 2010 (CVE, 2008, 2011b).

Caraguatatuba e São Sebastião exemplificam o potencial de expansão da esquistossomose a novas áreas geográficas. Os primeiros caramujos da espécie *B. tenagophila* naturalmente infectados por *S. mansoni* no município de Caraguatatuba foram observados em 2002, apontando esta região paulista do Litoral Norte como uma importante área endêmica da esquistossomose (Teles *et al.*, 2003). *B. tenagophila* ocorre nos quatro municípios do Litoral Norte: Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha Bela. E atualmente os focos de esquistossomose estão descritos em Caraguatatuba e Ubatuba (Teles *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Número de casos autóctones de esquistossomose no estado de São Paulo, distribuído por bacia hidrográfica nos períodos de 1981 a 2008 (Zanna, 2010; CVE, 2008, 2011ab, modificado).

Bacia Hidrográfica	Região*	Município**	Períodos			Total	%
			1981-1990	1991-2000	2001-2010		Total
1 São José dos Dourados			0	0	4	4	0,01
2 Aguapeí – Peixe			3	4	8	15	0,05
3 Rio Grande			150	67	79	296	1,02
4 Paranapanema	4.1Alto Paranapanema	Total da Região	5	5	10	20	
	4.2 Pontal Paranapanema	Total da Região	0	1	6	7	
	4.3 Médio Paranapanema	4.2.1Ourinhos	896	214	35	1145	
		4.2.2 Outros	88	14	10	112	
		Total da Região	984	228	45	1257	
Total da Bacia			989	234	61	1284	4,41
5 Tietê	5.1Sorocaba / Médio Tietê	Total da Região	2	3	27	32	
		Total da Região	1	1	9	11	
	5.2 Tietê/ Batalha	Total da Região	1	1	7	9	
		Total da Região	2	139	44	185	
	5.5 Alto do Tiete	5.2.1São Paulo(Capital)	82	33	112	227	
		5.2.2Guarulhos	250	20	22	292	
		5.2.3Outros	359	99	166	624	
		Total da Região	691	152	300	1143	
		5.6 Piracicaba, Capivari e Jundiá	5.3.1Campinas	647	544	597	1788
	5.3.2Amparo		36	51	24	111	
	5.3.3Hortolândia		0	139	4	143	
	5.3.4 Americana		62	35	7	104	
	5.3.5 Paulínia		22	27	20	69	
	5.3.6 Outros		87	115	115	317	
	Total da Região		854	911	767	2532	
	Total da Bacia			1551	1207	1154	3912
6 Litorânea	6.1Litoral Norte	6.1.1Caraguatatuba	1	33	68	102	
		6.1.2 São Sebastião	1	3	45	49	
		6.1.3 Ubatuba/Ilha Bela	11	8	10	29	
		Total da Região	13	44	123	180	
	6.2Baixada Santista	6.2.1 Cubatão	576	92	61	729	
		6.2.2 São Vicente	501	45	9	555	
		6.2.3 Peruíbe	323	90	129	542	
		6.2.4 Outros	549	98	50	697	
		Total da Região	1949	325	249	2523	
	6.3 Ribeira do Iguape	6.3.1Itariri	3598	1027	263	4888	
		6.3.2Pedro de Toledo	2787	236	56	3079	
		6.3.3 Outros	217	22	55	294	
Total da Região		6602	1285	374	8261		
Total da Bacia			8564	1654	746	10964	37,7
7 Paraíba do Sul		7.1.1São José dos Campos	2423	653	111	3187	
		7.1.2Bananal	990	550	95	1730	
		7.1.3 Outros	6029	1520	237	7691	
Total da Bacia			9442	2723	443	12608	43,4
Total			20699	5889	2495	29083	100
Município Ignorado			2313	177	87	2577	
Total			23012	6066	2582	31660	

* Regiões com maior número de casos autóctones na bacia hidrográfica.

** Município com maior número de casos autóctones da região relacionada à esquerda.

2.2. Suscetibilidade de *B. tenagophila* ao *S. mansoni* no Vale do Ribeira e Litoral Norte

Testes experimentais para verificar as taxas de infecção de *B. tenagophila* ao *S. mansoni* demonstraram adaptação fisiológica eficaz entre o molusco e a linhagem simpátrica do parasita (Paraense & Corrêa, 1963). Paraense e Corrêa (1963) obtiveram taxas de infecção experimental entre 65,8 e 100% em *B. tenagophila* expostas a 10-100 miracídios da linhagem de São José dos Campos (SJ). Especificamente para o município de Itariri (Distrito de Ana Dias), no Vale do Ribeira do Iguape, Paraense & Corrêa (1978) obtiveram em laboratório taxas de 91,5% de suscetibilidade em *B. tenagophila* com a linhagem SJ do *S. mansoni*, sendo este o índice de infecção mais alto entre os exemplares de 20 localidades da América do Sul. Estudos posteriores com caramujos da mesma localidade, testados com os miracídios da linhagem SJ mostraram índices de infecção de 8,3 e 60% (1-10 miracídios) (Figueiredo *et al.*, 1992; Guimarães *et al.*, 2010).

Em condições naturais há uma grande variação das taxas de infecção de *B. tenagophila*. Em Itariri (Distrito de Ana Dias) as taxas de eliminação de cercárias de *S. mansoni* por *B. tenagophila* variaram entre 3,7 e 51,3%, enquanto em espécimes obtidos de Pedro de Toledo a taxa variou entre 10 e 81,3% (Ramos *et al.*, 1969; Ramos & Piza, 1971). Estes valores demonstram o alto potencial de transmissão da esquistossomose no Vale do Ribeira do Iguape (Ramos *et al.*, 1969; Ramos & Piza, 1971).

No Vale do Ribeira do Iguape apenas 49% da rede esgoto é tratada adequadamente (Tabela 2, CETESB, 2008). A intensa atividade turística, agricultura e pesca, a presença de contingente humano de outras áreas do Brasil para o trabalho na construção civil e o predomínio de pessoas nas áreas rurais e peri-urbanas tornam estas regiões candidatas a manutenção dos casos de esquistossomose (Ramos *et al.*, 1969; Chieffi & Waldman, 1998; CETESB, 2008). Acrescente-se a este quadro uma pluviosidade média anual de 2.550 mm, em uma das mais extensas bacias inundáveis do Estado, propiciando desta forma a proliferação dos caramujos (Barbosa, 2007). Enchentes e inundações, que são frequentes em Juquiá e Registro (CEPAGRI, 2013), promovem a migração passiva dos caramujos.

Do ponto de vista epidemiológico o Litoral Norte, representa área de expansão recente de esquistossomose, principalmente as localidades próximas de Caraguatatuba. Teles *et al.*, (2003)

observaram taxa de infecção natural de *B. tenagophila* coletadas em Caraguatatuba, no bairro Olaria de 6,6%. As grandes inundações e enchentes ocorridas em 1967 e 1996 em Caraguatatuba (Castro, 2011), podem em tese, ter facilitado a dispersão dos caramujos para o Litoral Norte do estado de São Paulo. O risco de aumento da transmissão da esquistossomose no Litoral Norte é significativo: apenas 39% da rede esgoto é tratada (média dos 4 municípios do Litoral Norte, Seade, 2013), a pluviosidade média anual de 1.790 mm (Barbosa, 2007) e há grande fluxo humano para o turismo, pesca e construção civil (Teles *et al.*, 2003; CETESB, 2008).

As duas microrregiões estudadas: Litoral Norte e Vale do Ribeira/Litoral Sul apresetam um clima tropical equatorial com alta temperatura média anual, alta pluviosidade média anual e baixas porcentagens no atendimento da rede de esgoto sanitário ou pluvial coletado. Os dados dos municípios estudados podem ser visto na tabela 2.

Tabela 2 – Temperatura média anual, pluviosidade média anual e o atendimento da rede de esgoto sanitário ou pluvial coletado do Vale do Ribeira (Itariri, Juquiá e Registro) e do Litoral Norte do estado São Paulo.

Município	Temperatura Média Anual (°C) (CEPAGRI, 2013)	Precipidacao media anual (mm) (CEPAGRI, 2013)	Rede de esgoto sanitário ou pluvial coletado (em 2010) (SEADE, 2013)
Itariri	24.2°C	1597.6 mm	49,26%
Registro	24,2°C	1539,9 mm	84,52%
Juquiá	24,5°C	1831,8 mm	72,62%
Média do Vale do Ribeira	24,3 °C**	2.550 mm (Barbosa, 2007)	49%* (CETESB, 2008)
Caraguatatuba	24.9°C	1757.9 mm	57,94%
São Sebastião	24.8°C	1289.8 mm	52,46%
Ilha Bela	24.8°C	1507.4 mm	7,37%
Ubatuba	22,6°C	2154.2 mm	27,65%
Média do Litoral Norte	24,2 °C	1.790 mm (Barbosa, 2007)	39%

*média dos 23 municípios do Vale do Ribeira, CETESB, 2008. ** média de Itariri, Registro e Juquiá.

As duas microrregiões estudadas estão inseridas no ecossistema da Mata Atlântica imbricadas entre o Oceano Atlântico e a Serra do Mar. A Serra do Mar é um paredão montanhoso descontínuo de 1500 km de extensão que corre paralelo a costa sudeste brasileira, e se estende desde o 30°S do Rio Grande do Sul até 20°N do Espírito Santo (Safford & Martinelli, 2000). Ao sul do estado de São Paulo, a Serra do Mar se interrompe para a formação do Vale do Ribeira do Iguape, cuja bacia se expande no sentido do interior do Planalto Atlântico (Almeida *et al.*, 1998)

(Figura 8). O maciço rochoso Jureia-Itatins segmenta o litoral paulista na altura de Peruíbe (Souza & Souza, 2012). Os ecossistemas de água doce estão inseridos em área de Mata Atlântica, considerada *hot-spot* de biodiversidade (Carnaval *et al.*, 2009).

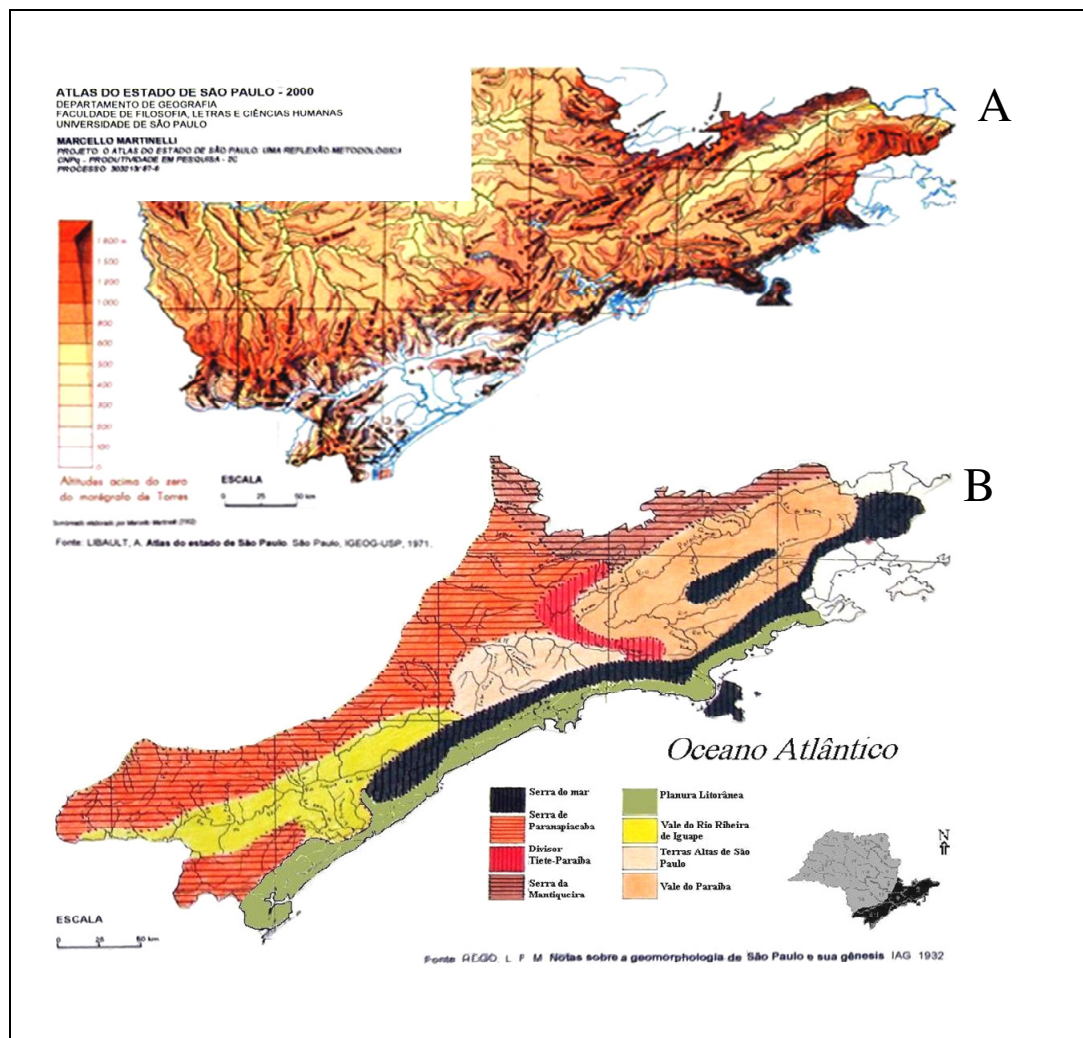


Figura 8 - Mapa do relevo do estado de São Paulo na bacia Litorânea: (A) em cores hipsométricas com sombreado e (B) aspectos geomorfológicos (Martinelli, 2009, Modificado).

A manutenção do ciclo parasitário pode também ocorrer em animais silvestres, os quais podem atuar como reservatórios desta parasitose, mantendo o ciclo paralelo ao do homem. Vários autores relataram a infecção natural, nas ordens Rodentia e Marsupialia. O índice de infecção natural foi estimado em 42,2% na espécie de roedor *Holochilus brasiliensis* com hábito semi-aquático (Amorim, 1953; Bastos, 1975; Kawazoe *et al.*, 1978; Kawazoe & Pinto, 1983). No Vale

do Ribeira, com focos ativos para a esquistossomose, foi observada taxa de infecção experimental de 73% dos camundongos, após exposição dos animais as coleções de água (Ramos *et al.*, 1969; Chieffi & Waldman, 1998).

Acrescente-se a este quadro de risco epidemiológico o fato da suscetibilidade dos moluscos planorbídeos à infecção por *S. mansoni* ser uma característica controlada geneticamente e herdável ao longo das gerações, conforme exemplos explicitados a seguir. Por seleção genética, Santana *et al.* (1978) e Zanotti-Magalhães *et al.* (1991) obtiveram a partir de *B. tenagophila* com baixo índice de infecção, populações do molusco altamente suscetíveis. O parasita obtido dos moluscos mais suscetíveis provocou no hospedeiro definitivo uma esquistossomose mais grave, com mais granulomas, maior eliminação de ovos do parasita pelas fezes e com alta mortalidade dos camundongos (Zanotti-Magalhães *et al.*, 1993, 1995, 1997).

2.3. Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares em *Biomphalaria* spp.

Os resultados moleculares em *Biomphalaria* da região neotropical, obtidos após introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram obtidos com marcadores moleculares arbitrários (Vidigal *et al.*, 1998; Tuan & Bortolato, 2001). Os resultados já indicavam a alta diversidade genética populacional principalmente das espécies hospedeiras intermediárias do *S. mansoni*.

Os espaçadores internos (ITS) do gene nuclear que codificam o RNA ribossômico, digeridos por enzimas de restrição (RFLP) foram utilizados para a identificação de espécies neotropicais de *Biomphalaria* (Caldeira *et al.*, 1998, 2000, 2004; Vidigal *et al.*, 1998, 2000, 2002, 2004ab; Spatz *et al.*, 1999; Jannotti-Passos *et al.*, 2006; Teodoro *et al.*, 2010). Uma das desvantagens da técnica é a alta variabilidade intraespecífica associada aos sítios de restrição (Lotfy *et al.*, 2005) demandando, portanto, uma grande combinação de enzimas para estabelecer padrões específicos.

Além de contribuir no processo de identificação taxonômica segura e rápida a aplicação de marcadores moleculares pode conduzir à uma análise filogenética consistente. De Jong *et al.* (2001) compararam sequências dos genes 16S rRNA e ITS1 em caramujos do gênero *Biomphalaria* das regiões neotropical e africana. Os autores relataram alta diversidade genética com ambos marcadores do grupo de espécies neotropicais em relação às espécies africanas.

Estudos genético-populacionais são frequentes em espécies de caramujos africanos, mas pouco frequentes em espécies de caramujos neotropicais. Mavarez *et al.* (2002) utilizaram marcadores moleculares para avaliar a distribuição da diversidade genética de *B. glabrata* na região do Caribe e concluíram ser este um grupo tão diverso que poderia se supor a existência de mais de uma espécie dentro do taxon *glabrata*. Tuan e Santos (2007) estudaram a distribuição da variabilidade genética molecular do segundo espaçador interno do DNA ribossômico (ITS2) comparando sequências de *B. tenagophila* em escala micro-geográfica. Os autores concluíram que a variabilidade da espécie está fragmentada em subpopulações e que a variabilidade total chega a ser maior do que a variabilidade de *B. glabrata*. Estes primeiros resultados se opõem às premissas que consideram a *B. tenagophila* uma única unidade evolutiva, indicando, ao contrário, uma complexidade taxonômica e populacional da espécie.

A hipótese sobre a fragmentação genética de *B. tenagophila* em populações distintas foi testada também por meio da análise de sequências de genes mitocondriais citocromo oxidase I (Zanna, 2010) e 16S rRNA (Tuan *et al.*, 2009ab; Palasio & Tuan, 2010). O DNA mitocondrial (DNAm) (Figura 9) é uma molécula circular, que codifica proteínas do sistema de transporte celular de elétrons e da fosforilação oxidativa (Avise, 1994). Este DNA apresenta taxa de evolução 1-10 vezes mais rápida que o DNA nuclear, com simples substituições de bases, sendo uma técnica adequada para estudos de genética populacional (Avise *et al.*, 1987).

O gene nuclear (DNA ribossomal) (Figura 9) que codifica o RNA ribossomal (rRNA) está representado nos genomas animais por várias repetições, dispostas em série, agrupadas como unidades em *tandem*, (Hillis & Dixon, 1991; Matioli, 2001). Há regiões conservadas, referentes às subunidades ribossomais 18S, 5,8S e 28S, e regiões mais diversas referentes aos dois espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, e aos espaçadores externos ETS (Hillis & Dixon, 1991; Paskewitz *et al.*, 1993). Os espaçadores ITS1 e ITS2 evoluem em uma taxa de substituição de nucleotídeos maior que as subunidades dos ribossomos, e são muito aplicadas para estudos de divergência genética de espécies crípticas que retratam evolução recente (Hillis *et al.*, 1996, Coleman, 2003). Os espaçadores internos ITS1 e ITS2 têm demonstrado ser um marcador de alto potencial de diferenciação intraespecífica em *Biomphalaria* (Spatz *et al.*, 1999; Vidigal *et al.*, 2002; 2004ab; Tuan & Santos, 2007).

As principais características dos marcadores ITS-2 e 16S rRNA são:

1- Ambos têm regiões altamente conservadas (Hillis *et al.*, 1996; Coleman, 2003) que permitem o uso de iniciadores bem conhecidos (Spatz *et al.*, 1999; Vidigal *et al.*, 2002, 2004ab; Tuan & Santos, 2007);

2- Ambos têm cópias múltiplas facilitando a amplificação (Hillis & Dixon, 1991; Matioli, 2001);

3- Os amplicons apresentam tamanho moderado;

4- Possuem taxa de substituição de nucleotídeos significativa que se adequam ao estudo genético e evolutivo ao nível de espécie (Avise *et al.*, 1987; Coleman, 2003);

5- O banco de dados público de sequências de nucleotídeos (NCBI) contém sequências destes genes para a *B. tenagophila* do sudeste e sul do Brasil, permitindo discutir de forma mais abrangente a filogeografia da espécie.

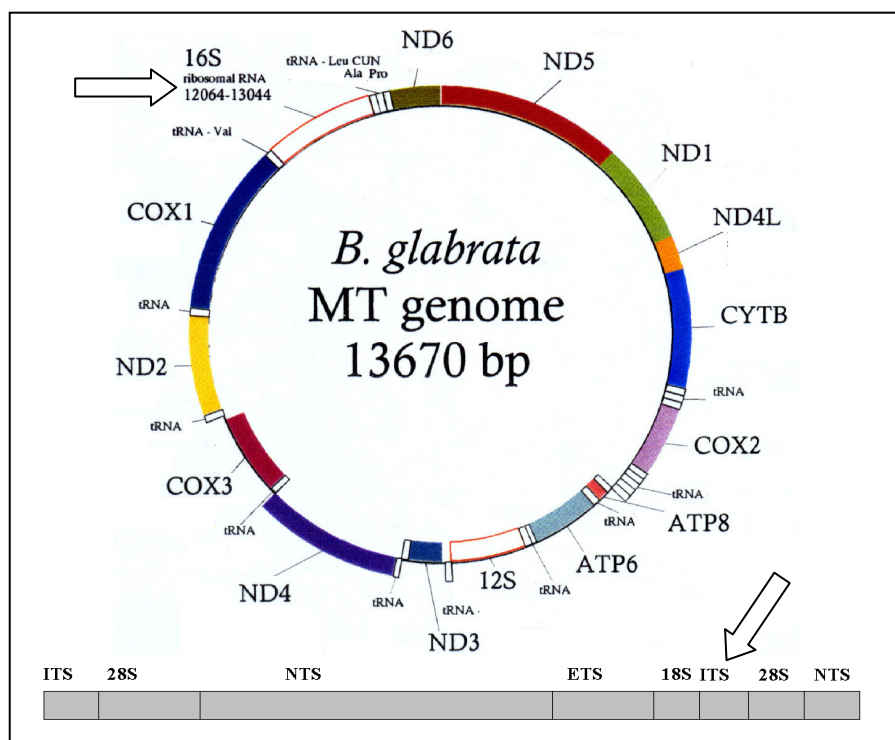


Figura 9 - Esquema da molécula de DNA mitocondrial de *Biomphalaria* (DeJong *et al.*, 2003) e dos genes ribossômicos (Espaçador transcrito interno, ITS, Espaçador transcrito externo, ETS e espaçador não transcrito, NTS) , Setas indicando o gene 16S e o ITS-2. (Matioli, 2001).

3. Justificativas

Estudos preliminares mostraram divergência genética significativa de duas populações de *B. tenagophila* do Vale do Ribeira do Iguape, SP, em relação a outras populações amostradas no estado de São Paulo. Assim, torna-se necessário expandir geograficamente a análise de distribuição desta diversidade genética na região paulista da bacia Litorânea Brasileira compreendida pelo Vale do Ribeira do Iguape e pelo Litoral Norte do estado de São Paulo. Essas duas regiões litorâneas constituem dois ecossistemas diferenciados que estão submetidos a alterações por ação do desenvolvimento humano e também representam pontos importantes de transmissão da esquistossomose. Os conhecimentos sobre a suscetibilidade da *B. tenagophila* destas regiões, correlacionada aos aspectos genéticos do caramujo e do parasita, entretanto, são escassos ou inexistentes. Este trabalho oferece assim, uma oportunidade de preencher uma lacuna importante de conhecimento para a saúde pública, comparando as taxas de infecção de *B. tenagophila* do Vale do Ribeira do Iguape e do Litoral Norte ao perfil genético dos caramujos e relacionar se a suscetibilidade pode afetar a diversidade molecular destas populações.

4. Objetivos

1) Avaliar o polimorfismo e a divergência genética entre as populações de *B. tenagophila* de diferentes coleções hídricas do Vale do Rio Ribeira do Iguape e do Litoral Norte do estado de São Paulo, através do gene mitocondrial (rRNA 16S) e do segundo espaçador interno transcrito do gene nuclear que codifica o RNA ribossômico (ITS-2);

2) Verificar a suscetibilidade de populações de *B. tenagophila* do Vale do Rio Ribeira do Iguape e do Litoral Norte à infecção pelo *S. mansoni* das linhagens BH, SE, SJ e SJS.

3) Associar a análise molecular com a suscetibilidade das populações de *B. tenagophila* procedentes das regiões submetidas ao *S. mansoni* de diferentes linhagens.

5. Material e Métodos

5.1 Coletas dos caramujos e procedências das amostras de DNA

As coletas foram feitas com metodologia de captura padronizada pelo Ministério da Saúde (2008). Os caramujos foram coletados nas margens dos corpos de água e no fundo dos criadouros, em municípios e localidades do Vale do Ribeira do Iguape e Litoral Norte, comumente monitoradas pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do estado de São Paulo para o Programa de Controle da Esquistossomose (Tabela 3).

Cada ponto de coleta foi geo-referenciado, por meio de GPS Garmin® Etrex. As coletas de moluscos do gênero *Biomphalaria* em coleções de água do Litoral Norte e Vale do Ribeira, foram feitas entre junho de 2010 e março de 2013.

Após coletados, os caramujos foram embalados em gaze seca e encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular da SUCEN (LBMSU) para identificação e a análise molecular. E ao Laboratório de Helminologia (DBA/UNICAMP) para a criação e o estudo da suscetibilidade.

No Litoral Norte Paulista os planorbídeos foram coletados em córregos e valas interligados aos rios que nascem na Serra do Mar e deságuam no Oceano Atlântico. Foram coletadas populações de caramujos dos municípios de São Sebastião, Caraguatatuba, Ubatuba e Ilha Bela (Figura 10- Tabela 3).

Do Vale do Rio Ribeira do Iguape foram coletados caramujos de coleções de água doce pertencentes ao rio Itariri no município de Itariri.

Das coleções hídricas irrigadas pelos rios Juquiá e Ribeira do Iguape, mais especificamente dos municípios de Juquiá e Registro, foram utilizadas 18 amostras de DNA genômico. Estas amostras foram processadas em 2008 e, deste então, encontram-se preservadas em ultrabaixa temperatura em freezer a -70°C (Figura 10- Tabela 3).

Tabela 3 – Pontos de coletas e procedencia das amostras de DNA das populações de *Biomphalaria* nas bacias do Vale do Ribeira de Iguape e Litoral Norte de São Paulo.

Município		Localidades (Ponto)
DNA	Vale do Ribeira do Iguape	
	*Juquiá	Bairro Estação (10), Parque Nacional (8), Centro (9) (Vila Florida) (LBMSU 354-363)
	*Registro	Vila São Francisco (11), Bairro Nosso Teto (12) (LBMSU 349-353)
Coletas	Itariri	Ana Dias (13, 14 e 21), Raposo Tavares (20)
	Litoral Norte	
	Caraguatatuba	Travessão (1), Rio Claro (19), Indaiá (15), Porto Novo (17), Morro do Algodão (16)
	São Sebastião	Boracéia (4), Maresias (2), Barra do Uma (3), Camburi (6), Canto do Mar (5)
	Ilha Bela	Barra Velha (7), Itaquanduba (18)
	Ubatuba	Bairro Sesmaria (22)

* LBMSU - N° do DNA da coleção do Laboratório de biologia molecular da Sucen.

5.2. Caracterização das localidades de coleta no Litoral Norte

A região hidrográfica do Litoral Norte (URGH 3) do estado de São Paulo, com área total de 1.987 Km², faz limite ao norte com o Estado Rio de Janeiro, a oeste com as Bacias do Paraíba do Sul e do Tietê, e ao Sul com a Baixada Santista e é caracterizada por 26 sub-bacias continentais, cujos rios partem da Serra do Mar para o Oceano Atlântico e 8 sub-bacias insulares (CBH LN, 2010; IPT, 2001). A bacia hidrográfica do Litoral Norte é formada pelo maior índice de vegetação do estado de São Paulo, com 81,8% de sua área total representada pelo bioma da Mata Atlântica: Floresta Ombrófila Densa, restinga e manguezais (CETESB, 2008).

5.2.1 Caraguatatuba

Os principais rios que permeiam a cidade de Caraguatatuba são: Juqueriquerê, Santo Antônio, Claro e Perequê-Mirim. As nascentes destes rios estão localizadas na Serra do Mar. As coletas foram feitas em pontos específicos relacionados a cada um destes rios (Anexo/Figura I e II).

→ **Morro do Algodão e Porto Novo.** Foram feitas coletas em dois bairros permeados pelo Rio Juqueriquerê. Localizado na divisa do município de Caraguatatuba e São Sebastião, o rio tem uma área de vazão $419,8\text{km}^2$ (CBH LN, 2010). Este rio nasce na serra do Mar, como todos os rios da bacia do Litoral Norte Paulista, e deságua na praia do Porto Novo e no bairro do Morro do Algodão. Nos dois bairros foram coletados em junho de 2012.

Foram coletadas *B. tenagophila* em uma vala no bairro Porto Novo em dois pontos: em Barranco Alto (P1) e na estrada do Rio Claro (P2) (Anexo/Figura II-III).

No bairro Morro do Algodão as coletas foram feitas em dois pontos: na Rua Jose Antonio Ferreira (P1) e na Rua Casimiro de Abreu (P2) (Anexo/Figura II-IV).

→ **Indaiá.** Foram feitas coletas no Bairro Indaiá, permeado pelo Rio Santo Antônio. Este rio é formado por vários cursos de água, tais como: o Rio do Ouro, o Córrego da Manteiga e o dos Quinhentos Reis, com uma área de $39,8\text{km}^2$ (CBH LN, 2010). O Rio Santo Antônio nasce na Serra do Mar e deságua entre as praias do Centro e do Indaiá.

Foram coletados *B. tenagophila* em 4 pontos diferentes de uma vala de fundo de cimento em um canal artificial próximo da praia de Indaiá, na Avenida São Paulo (Anexo/Figura V-VI). As coletas dos pontos 2, 3 e 4 foram feitas em outubro de 2010 e no ponto 1 em junho de 2012.

→ **Rio Claro.** Foram feitas coletas no bairro Rio Claro, que é permeado pelo Rio Claro. O Rio Claro nasce na Serra do Juqueriquerê em São Sebastião e segue até o município de Caraguatatuba. É afluente do Rio Juqueriquerê e tem área de vazão de $70,2\text{ km}^2$ (Chan *et al.*, 2009). Foram feitas coletas em uma vala de irrigação em uma fazenda no bairro Rio Claro, na Rua Cambixo em junho de 2012 (Anexo /Figura VII).

→ **Travessão.** Foram feitas coletas no bairro Travessão, permeado pelo Rio Perequê-Mirim, localizado na divisa de Caraguatatuba e São Sebastião, o qual se junta ao Rio Juqueriquerê. Em épocas de chuva há registro de ocorrência de inundações em virtude do refluxo causado pelos dois rios (CSAN, 2011).

Em outubro de 2010 e abril de 2012 foram feitas coletas em uma vala alagada na Rua Guarujá esquina com Rua Manoel Silva, que resultaram em apenas 21 exemplares de caramujos coletados. Em junho de 2012 foi possível coletar novamente no mesmo local, resultando em 146 espécimes de caramujos (Anexo/Figura VIII).

5.2.2 Ilha Bela

A Ilha Bela (Anexo/Figuras IX e X) está separada do continente por 18 km. Possui um relevo montanhoso. Em Ilha Bela foram coletados moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* nos seguintes pontos (Anexo/Figura IX):

→ **Bairro Barra Velha,** os espécimes foram coletados na Rua Bahia em uma vala alagada (Anexo/Figura X(A)), conectada ao Córrego Paquera/Cego, com área de vazão de 49,8 Km². Esta sub-bacia apresenta problemas típicos de poluição dos recursos hídricos (CBH LN, 2010). Neste ponto foram coletados caramujos *B. straminea*. As coletas foram feitas em junho e outubro de 2010 e junho de 2012.

→ **Bairro Itaquanduba,** a coleta foi feita na Rua Alzira Simões Bertine, em uma vala recentemente reformada com fundo de cimento (Anexo/Figura X(B)), abastecida pelo Córrego Ilhabela/Cachoeira, com área de 12,3 km². Esta sub-bacia está localizada no centro urbano de Ilha Bela (CBH LN, 2010). Neste ambiente foram coletados caramujos *B. tenagophila* em junho de 2012.

5.2.3 São Sebastião

No município de São Sebastião há numerosos rios formando sub-bacias. Os principais rios são Camburi, Maresias, Una e Juqueriquerê. As coletas foram feitas em coleções hídricas nos seguintes pontos (Anexo/Figura XI):

→ **Bairro Camburi**, permeado pelo Rio Camburi que tem área de vazão de 36,2 Km² (CBH LN, 2010). As coletas foram feitas na vala da Rua Reginaldo Flávio Correia (Anexo, Figura XII/), em junho de 2010.

→ **Bairro Maresias**, a coleta foi feita na vala da Rua Guanabara (Figura XII/Anexo) que é abastecida pelo Rio Maresias (21,1 Km², CBH LN, 2010). As coletas foram feitas em junho de 2010.

O bairro da Barra do Una e Boracéia estão conectados ao Rio Una com área de vazão de 120,8 Km² (CBH LN, 2010).

→ **Bairro Barra do Una**, as coletas foram feitas na vala da Rua Itaipava com a Rua Borá Jesus (Anexo/Figura XII), em junho e outubro de 2012.

→ **Bairro Boracéia**, as coletas foram feitas na vala da Rua Cubatão com a Rua Paranapiacaba (Anexo/Figura XII), em junho de 2010.

→ **Bairro Canto do Mar**, especificamente na Avenida Nereu, em junho de 2010. A vala está conectada ao Rio Juqueriquerê, que faz divisa com Caraguatatuba e São Sebastião (Anexo/Figura XII).

Em todos os pontos foram coletados apenas a espécie de *B. tenagophila*.

5.2.4 Ubatuba

No município de Ubatuba foram coletados em outubro de 2010 apenas 3 espécimes de *B. tenagophila* no bairro Sesmaria, na vala da Avenida Fluminense, que é permeado pelo Rio Acaraú, afluente do Rio Grande de Ubatuba, este com área de vazão de 103 Km² (CBH LN, 2010) (Anexo/Figuras XIII e XIX).

5.3. Características das localidades de coleta no Vale do Ribeira/Litoral Sul

O Vale do Rio Ribeira abrange uma área de 18.112,80 Km². A região está localizada ao sul do estado de São Paulo e leste do Estado do Paraná. Os recursos hídricos (URGH 11) desta região estão distribuídos em 13 sub-bacias em uma extensão de aproximadamente 260 Km em território paulista e área de drenagem de 17068 Km². O principal rio que percorre a região é o Ribeira do Iguape que nasce como Rio Assungui no Estado do Paraná (CETESB, 2008). Os principais afluentes do Rio Ribeira do Iguape são os rios Turvo, Ponta Grossa, Pardo, Jacupiranga, Juquiá e Itariri (CBH RB, 2007). A vegetação natural da área é formada por remanescentes contínuos de Mata Atlântica (CETESB, 2008).

5.3.1 Itariri

Foram coletados planorbídeos em afluentes do rio Itariri (Anexo/Figura XX). Este rio nasce no litoral próximo do município de Peruíbe, corre em sentido oeste seguindo em direção a Miracatu onde deságua no Rio São Lourenço. Tem área de vazão de 551,83 km² (CBH RB, 2007), e aproximadamente 42 km de extensão.

Os pontos de coleta no município de Itariri incluem os distritos de Ana Dias e Raposo Tavares (Anexo/Figuras XX–XXII):

→ Distrito Ana Dias

Em Ana Dias foram feitas coletas em quatro pontos específicos (Anexo/Figura XX e XXI):

Em um alagado no Foco Palmito (P1), em valas na Fábrica Alumínio (P2), na Avenida Engenheiro Clay P. do Amaral (P3) (Anexo/Figura XXII) e Campo de Aviação I (P4).

No Foco Palmito e Fábrica Alumínio as coletas foram feitas em junho e novembro de 2010, maio e agosto de 2012 e março de 2013. Foram coletados exemplares da espécie *B. tenagophila* e apenas no ponto P3 foram identificadas as espécies *B. tenagophila* e *B. straminea*.

→ Distrito Raposo Tavares

Foram feitas coletas em dois pontos (Anexo/Figura XX e XXIII): No lago artificial do Pesqueiro Balsamo (P1), onde foi coletado *B. tenagophila*, e no lago do Hotel Juréia (P2)

(Anexo/Figura XXIV) onde foi encontrado *B. straminea*. As coletas foram feitas em maio de 2012 e março de 2013.

5.3.2. Registro e Juquiá

Em Registro e Juquiá (Anexo/Figuras XXV a XXXI) os exemplares que deram origem ao material genômico foram coletados em coleções hídricas relacionadas aos Rios Ribeira do Iguape e Rio Juquiá. As amostras derivadas de Registro e Juquiá foram coletadas em 2008:

Registro:

O Rio Ribeira nasce no Paraná como Rio Açungui. No seu percurso, após confluência com seu principal afluente, o Rio Juquiá, passa a ser denominado Rio Ribeira de Iguape após o município de Registro no estado de São Paulo (CETESB, 2006) (Anexo/Figura XXV). O Rio Ribeira do Iguape tem área de vazão de 3.631 km² (CBH RB, 2007).

Os caramujos foram procedentes de dois pontos (Anexo/Figuras XXV e XXVI):

→ **Bairro da Vila São Francisco.** Foi identificada a espécie *B. tenagophila* (Anexo/Figura XXVII).

→ **Bairro Nosso Teto.** Foram identificadas as espécies *B. tenagophila* e *B. straminea* (Anexo/Figura XXVIII).

Juquiá:

O Rio Juquiá nasce da junção do Rio Açungui com o Rio Juquiá-Guaçu. O Rio Juquiá deságua no Rio Ribeira do Iguape, no município de Registro, e termina no Oceano Atlântico. O Rio Médio Juquiá que tem área de vazão de 1.166,59 Km² (DAEE, 2013) e o Rio Baixo Juquiá com 1.059,20 Km², drenam no município de Juquiá (CBH RB, 2007).

Apenas a espécie *B. tenagophila* foi identificada no município. As amostras de DNA foram procedentes de três pontos (Anexo/Figura XXIX):

→ **Bairro Estação** (Anexo/Figura XXXA)

→ **Parque Nacional** (Anexo/Figura XXXB)

→ **Centro, na Vila Florida** (Anexo/Figura XXXI).

5.4. Exame parasitológico e dissecação dos caramujos

No laboratório os caramujos coletados do litoral Norte e Itariri foram examinados durante 30 dias, 2 vezes por semana, para observação de liberação de cercárias de trematódeos (Infecção Natural). Para isso os caramujos foram expostos a luz artificial. A identificação de cercárias *in vivo* foi feita por observação em microscópio óptico. Estes moluscos foram mantidos em cubas com água dechlorada e alimentados com alface *ad libitum*.

Apenas amostras livres de infecção por parasitas foram utilizadas como matriz para a análise molecular e as desovas destes para os testes de suscetibilidade (Infecção experimental).

Para identificação das espécies foram utilizadas duas técnicas complementares. A técnica de fixação para afrouxamento dos músculos e separação das partes moles da concha foi feita por imersão do caramujo a 70°C por 30 segundos e permitiu a identificação morfológica. Esta técnica não permite a obtenção de material genômico intacto (pois o aquecimento do caramujo em água quente degrada o DNA), por isso a extração de DNA foi feita após excisão da região cefalopodal de caramujos vivos submetidos à esmagamento. Nesta técnica o caramujo é prensado entre placas de Petri e submetido a uma leve pressão. Com pinças de ponta finas, são retirados os pedaços de conchas cuidadosamente no microscópio estereoscópio, para a dissecação *in vivo* (Ministério da Saúde, 2008). Do mesmo caramujo é retirada a porção inferior do pé (cefalopodal), que segue para a extração de DNA. As peças (aparelho reprodutor) utilizadas para identificação foram mantidas como “*vouchers*” em tubos com fixador Raillet-Henry.

Para garantir um relaxamento padrão os caramujos foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (*Hypnotol*®, Cristália, Brazil) 0,4 mg/ml por 5-8h (Martins-Sousa *et al.*, 2001) tanto nos caramujos utilizado na técnica de fixação e de esmagamento.

Dos caramujos coletados do campo 6 espécimes de cada localidade (ponto) foram isolados, e destes 3 foram dissecados (Deslandes, 1959) e identificados por meio de características morfológicas do aparelho reprodutor, conforme Paraense (1975; 1981) por meio da técnica de fixação de gastropodos límnicos. Dos outros 3 caramujos foram submetidos à separação da concha e partes moles por esmagamento, a identificação morfológica foi feita *in vivo*, para evitar danos ao material genético.

5.5. Extração de DNA, ampliações e sequenciamento

A extração do DNA foi feita utilizando o kit comercial DNeasy Blood e Tissue (Qiagen), (No Anexo 1 está descrito o Protocolo de extração), a partir de espécimes de cada localidade (Tabela 4). Todas as amostras de DNA genômico foram cadastradas e, posteriormente, mantidas em tubos tipos Eppendorff® em ultrafreezer a -70 °C, na coleção de DNA do LBMSU, que atualmente conta com aproximadamente 650 exemplares de DNA's genômicos das principais espécies neotropicais de *Biomphalaria*.

Tabela 4 – Quantidade de DNA's extraídos, sequencias de 16S/ ITS-2 e identificação geográfica.

Município	Local de coleta	Nº amostras /DNA	Nº Seq de:	
			16S	ITS-2
Juquiá	Bairro Estação	4	3	2
	Parque Nacional	4	3	2
	Vila Florinda	2	1	1
Registro	São Francisco	4	3	2
	Nosso Teto	1	1	1
Itariri	Ana Dias - P1 Foco Palmito	3	2	2
	Ana Dias - P2 Fábrica Alumínio	4	3	1
	Ana Dias - P3 Av Eng. Clay P. Amaral	5	2	1
	Ana Dias - P4 Campo de Aviação I	1	1	1
	Raposos Tavares - P1 Pesqueiro Bálamo	1	1	1
Caraguatatuba	Indaiá - P1	4	4	1
	Indaiá - P2	1	1	-
	Indaiá - P3	1	1	1
	Indaiá - P4	2	2	-
	Morro do Algodão - P1 Jose Antonio Ferreira	4	2	-
	Morro do Algodão - P2 Casimiro de Abreu	2	3	1
	Porto Novo - P1 Barranco Alto	2	2	1
	Porto Novo - P2 Estrada Rio Claro	2	2	1
	Rio Claro, Cambixo	5	4	1
	Travessão	11	6	4
São Sebastião	Barra do Uma	2	2	2
	Boracéia	1	1	1
	Camburi	1	1	1
	Canto do Mar	1	1	1
	Maresias	1	1	1
Ubatuba	Sesmaro	1	-	-
Ilha Bela	Itaquanduba	2	2	1
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		Total 72	Total 55	Total 31
Registro	Nosso Teto	3	3	1
Ilha bela	Barra Velha (Rua Bahia)	5	2	1
Itariri	Raposo Tavares - P2 Hotel Jureia	4	1	
	Ana Dias - P3 Av Eng. Clay P. Amaral	1	1	-
<i>Biomphalaria straminea</i>		Total 13	Total 7	Total 2

Para verificar a eficiência da extração do DNA genômico, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4% e os produtos obtidos foram visualizados por meio de Transiluminador Eletrônico UV (Ultra-Lum) (Figura 11). Fotografias digitais dos géis de agarose foram obtidas por meio de câmera Canon® acoplada a computador. As imagens foram analisadas por meio do *software* Launch Doc-ItLS.

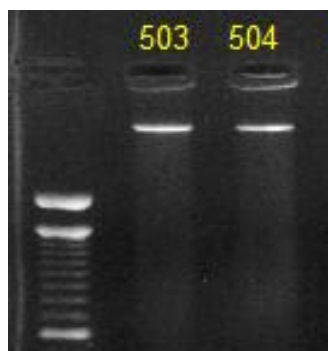


Figura 11 - Visualização em gel de agarose 1,4% das extrações de *Biomphalaria*, da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular de 1kb; 2ª e 3ª colunas: N° LBMSU 503 e 504, da localidade de Itariri, Ana Dias P1, Foco Palmito.

Ao DNA extraído foi aplicado o seguinte protocolo de amplificação do trecho de DNA mitocondrial 16S, para reações com volume total de 50 µL: 10-100 ng de DNA de *Biomphalaria*, concentração final de 200 µM de cada nucleotídeo - dNTP's (1 µL de 10 mM - desoxirribonucleotídeos fosfatados - Adenina, Citosina, Guanina e Timina), 0,5 µM de cada *primer* (2,5 µL de 10 µM), 1,5 µL de MgCl₂ (3 µL de 25 µM), 25 µL de H₂O autoclavada e 1 unidade (1 µL) de Taq DNA polimerase (Promega) com concentração final 1x de *buffer* (10 µL de 5x). Foram utilizados os seguintes pares de *primers* (Palumbi, 1996) para a reação de amplificação:

16S Ar Forward (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3')
 16S Br Reverse (5'-CCGGTCTGAACTGAGATCACGT- 3').

As reações de PCR ocorreram em termociclador MJResearch® com o seguinte perfil de temperatura: uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 repetições de 30 segundos a temperatura 94°C, 30 segundos a 54°C e 1 minuto a 72°C, mais uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,4%, com Gel Red e luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram purificados

utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®). A concentração de DNA foi estimada a partir de comparação com o padrão do marcador de peso e concentração de massa “*Low DNA mass ladder*” (Invitrogen). Apenas produtos com no mínimo 20 ng de DNA seguiram para sequenciamento, de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan, otimizado para o sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems®).

Os dados foram utilizados para estimar a distância genética entre pares de indivíduos, utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) e construção de árvore filogenética por algoritmo *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987). Esta análise foi feita em PAUP (Swofford, 2002), com o objetivo de identificar indivíduos mais divergentes entre si, para a amplificação de ITS2.

Para a amplificação do segundo espaçador do DNA ribossômico (ITS2) através da reação em cadeia de polimerase (PCR), foram utilizados os *primers* ITS2F e ETTS1 (Vidigal *et al.*, 2000):

ITS2F	Forward	(5'-CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGC- 3')
ETTS1	Reverse	(5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3').

Cada reação da PCR do ITS2 foi feita com volume total de 50 µL: contendo 10-100 ng de DNA de *Biomphalaria*, concentração final de 200 µM de cada dNTP's (1µL de 10 µM), 1 µM de cada *primer* (5 µL de 10 µM), 2,5 µL de MgCl₂ (5 µL de 25 µM), 25 µL de H₂O autoclavada e 1 unidade (1 µL) de Taq DNA polimerase (Promega) com concentração final 0,5x de *buffer* (5µL de 5x).

O perfil de temperatura de PCR foi o seguinte: uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 40 repetições de 30 segundos a temperatura 94°C, 45 segundos a 58°C e 1 minuto a 72°C mais uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram verificados e depois foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e clonados em plasmídeo.

5.6. Clonagem dos fragmentos de ITS-2, PCR pós-clonagem e sequenciamento

O gene ITS-2 é representado em varias repetições no genoma, por isso foi feito o processo de clonagem, buscando minimizar as variações em um mesmo individuo. Os produtos de PCR purificados do gene nuclear ITS2, de aproximadamente 450 pares de bases, foram submetidos à reação de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor pGEM[®]-T Easy (Plasmidio). Para este fim foi utilizado o kit pGem-T Easy Vector System[®] (Promega). As reações de ligação continham 1µl de T4 DNA ligase (1U), 0,5µl de Vetor pGEM-T Easy, 3µl de produto de PCR purificada (inserto), 5µl de tampão 2x e 0,5µl de H₂O autoclavada. As reações permaneceram durante uma hora a temperatura ambiente e depois *overnight* a 4°C.

Para a transformação de células competentes foi utilizado 10µl da reação de ligação e 50µl de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes por MgCl₂, cedidas pelo Instituto Butantan. A inserção do fragmento ITS2 à bactéria foi induzida por meio de choque de temperatura. A mistura foi mantida no gelo por 30 minutos e depois 30 segundos a 42°C e novamente 2 minutos no gelo. O produto foi incubado em 940µl de meio LB Broth (Invitrogen) sem ampicilina por uma hora a 37°C. Após este período, 100µl de cada um dos meios com plasmídeos foi colocado em placas de Petri contendo meio LB-Agar (Invitrogen) com ampicilina, 60µl de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e 17µl de IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalacto pyranoside).

O antibiotico (ampicilina) foi utilizado para que as bactérias que não continham o vetor não sobrevivessem, uma vez que o vetor confere resistência à bactéria que o possui. O substrato análogo à lactose Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) foi adicionado ao meio para a identificação das bactérias que continham o vetor-inserto. Como mostra a figura 12, o plasmídeo utilizado apresenta o sítio múltiplo de clonagem incorporado ao gene *lacZ'*, que codifica para um segmento de β-galactosidase. Dessa forma, quando o gene está íntegro, isto é, não houve a incorporação de nenhum fragmento (inserto) de DNA em um dos sítios de clonagem, o gene *lacZ'* é transcrito e traduzido, seu produto combina com outra proteína codificada pelo DNA cromossômico, formando um híbrido ativo de β-galactosidase. Se o substrato X-Gal está presente no meio, ele é hidrolisado por esta enzima em um composto de cor azul, sob estas condições, colônias que incorporaram o vetor sem inserto apresentaram cor azul. Em contraste,

células que carregaram um vetor com um inserto clonado formaram colônias brancas. Isto ocorre porque o fragmento de DNA inserido em um dos sítios de clonagem interrompeu a sequência correta de códons do gene de *lacZ'* e inibiu a produção de proteína *lacZ'* funcional, e portanto, a produção do híbrido de β -galactosidase ativo (Glick & Pasternak, 1998).

O IPTG é um indutor da transcrição genética que aumenta a quantidade da enzima T7 RNA polimerase, a qual se liga ao promotor T7, iniciando a transcrição do cDNA de interesse.

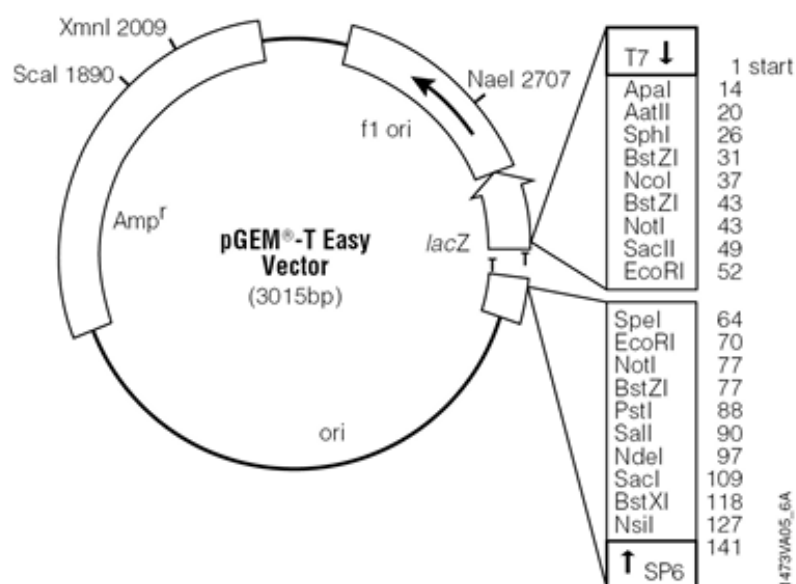


Figura 12 - Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy, utilizado no processo de transformação bacteriana. Fonte: Promega (2012).

As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas para o crescimento das bactérias. Depois das colônias já crescidas foram selecionadas as colônias brancas (Figura 13) para a reação de PCR de ITS-2 pós-clonagem.

Colônias individuais foram transferidas para tubos tipo *Eppendorff*® (Figura 13) onde foram acrescentados os reagentes para amplificação em PCR. Cada tubo de reação continha 2 μ L (10 μ M) de dNTP's, 3 μ L (10 μ M) de cada *primer* ITS2, 5 μ L (25 μ M) de $MgCl_2$, 0,4 μ L de Taq DNA polimerase (Promega), 10 μ L *buffer* (5x) e água MilliQ para completar 50 microlitros. O protocolo de amplificação constou de uma etapa de desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 repetições de 30 segundos a temperatura de 94°C, 40 segundos a 52°C e 40 segundos a 72°C, mais uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

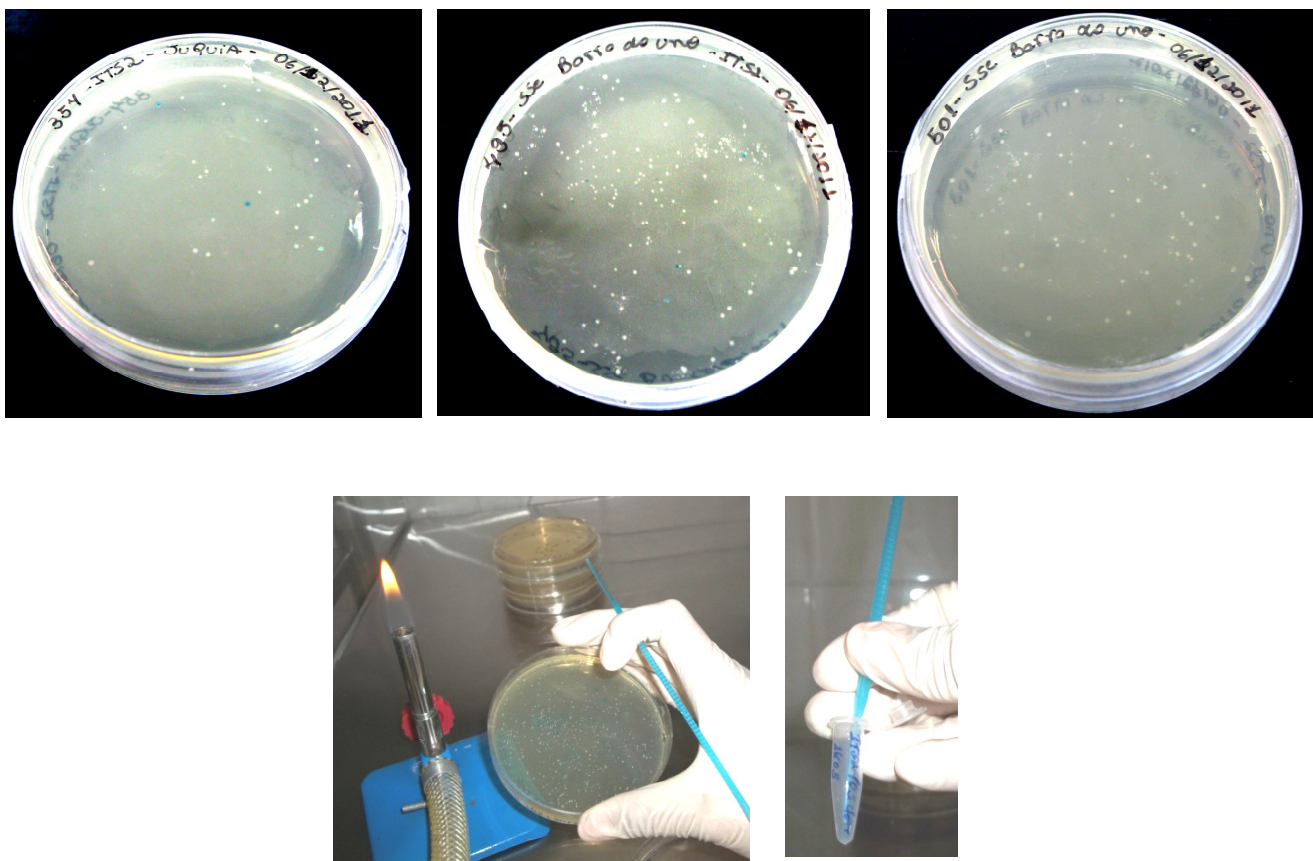


Figura 13 – Foto das placas com as colônias azuis sem o inserto e colônias brancas com o inserto de ITS2 das amostras de 354 (Juquiá), 495 e 501 (São Sebastião/ Barra do Una) respectivamente, e demonstração da transferência de uma colônia branca para o tubo tipo Eppendorff®.

Os produtos da PCR pós-clonagem (segunda PCR) foram verificados por eletroforese em gel de agarose e purificados (Figura 14) com o QIAquick PCR Purification (Qiagen®). A concentração de DNA foi calculada por comparação com o padrão de massa de DNA “*Low DNA mass ladder*” (Invitrogen). Apenas produtos com no mínimo 20 ng de DNA seguiram para sequenciamento, de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan, otimizado para o sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems®).

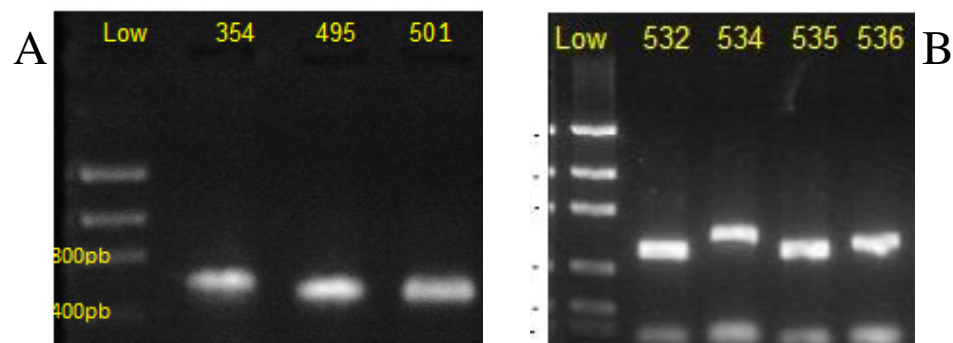


Figura 14 - Visualização em gel de agarose 1,4% das purificações de *Biomphalaria*, corado com Gel red, **(A)** ITS2, da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular “Low Ladder”, 2ª, 3ª e 4ª colunas: N° LBMSU 354 (Juquiá), 495 e 501(São Sebastião). **(B)** 16S, da esquerda para a direita, 1ª coluna: marcador molecular 500pb, 2ª, 3ª e 4ª colunas: N° LBMSU 532, 534, 535 e 536 (Itariri) .

5.7. Análise dos dados moleculares

As sequências foram corrigidas usando o programa Chromas (Technelysium Pty Ltd.), alinhadas com a versão do programa ClustalX 1,8 (Thompson *et al.*, 1997). Os alinhamentos foram ajustados visualmente através do programa BioEdit 7.0 (Hall, 1999). A análise da distribuição da variabilidade de nucleotídeos nas sequências de um mesmo grupo ou de grupos distintos foi calculada com o uso do *software* DNAsp (Librado & Rozas, 2009) que estima parâmetros de diversidade de nucleotídeos (Pi) e a diversidade de haplótipos (Hd). A estimativa da genealogia dos genes, que resultou numa rede multifurcada e reticulada, rede de haplótipos, foi estimada com auxílio do *software* TCS 2.1 (Clement, Posada & Crandal, 2000).

Para a reconstrução filogenética, os dados foram analisados em PAUP versão Beta 10 (Swofford, 2002), que implementa critérios de distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança. De forma a testar a robustez dos resultados filogenéticos obtidos por distância e verossimilhança, os alinhamentos de sequências foram submetidos à reconstrução filogenética inferida por meio de análise Bayesiana, utilizando o programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003), que se baseia na distribuição de probabilidades posteriores, conforme o teorema de probabilidades de Bayes. A seleção do modelo de substituição de nucleotídeos mais ajustado aos conjuntos de sequências alinhadas foi feita por meio do cálculo de verossimilhança em PAUP (Swofford, 2002). O menor valor de verossimilhança foi calculado por meio do *software* MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004).

5.8. Análise da suscetibilidade de populações de *Biomphalaria tenagophila*

Para a análise de suscetibilidade foram utilizados os caramujos procedentes de oito sítios distintos nas localidades de Itariri (Ana Dias Ponto 2- Fábrica Alumínio), Caraguatatuba (Bairro Indaiá Ponto 1, Ponto 2 e Ponto 3; Bairro Travessão e Bairro Morro do Algodão Ponto 2- Casimiro de Abreu), São Sebastião (Barra do Una) e Ilha Bela (Itaquantuba). Estes caramujos foram mantidos acasalados em laboratório, e a partir deles foram isoladas as desovas para a criação dos espécimes testados quanto a suscetibilidade ao *S. mansoni*.

Os moluscos utilizados para esta finalidade são os eclodidos das desovas (F1), que a atingirem 5-7 mm de diâmetro de concha. Os caramujos foram expostos a 10 miracídios de *S. mansoni* de diferentes linhagens, com um grupo controle para cada localidade (Tabela 5). Os miracídios, que foram colocados em contato com os moluscos por duas horas sob a ação de luz incandescente (60W) e a temperatura de 28°C, foram obtidos de fezes de camundongos previamente infectados.

Tabela 5 - Quantidade de caramujos das populações de *Biomphalaria tenagophila* testadas por localidade e as diferentes linhagens de *Schistosoma mansoni* e grupo controle.

População de <i>B. tenagophila</i>	Nº de moluscos testados/linhagem:				Nº de moluscos	
	SJ	SJS	BH	SE	Controle	Total
1. Itariri (Ana dias P2 - Fábrica Alumínio)	30	30	30	30	30	150
2. Caraguatatuba (Travessão)	30	30	15	15	15	105
3. Caraguatatuba (Indaiá Ponto 1)	15	15	15	15	15	75
4. Caraguatatuba (Indaiá Ponto 3)	30	30	30	30	30	150
5. Caraguatatuba (Indaiá Ponto 4)	30	30	15	0	15	90
6. Caraguatatuba (Morro do Algodão-P2)	15	15	15	15	15	75
7. São Sebastião (Barra do Una)	30	30	30	30	30	150
8. Ilha Bela (Itaquantuba)	30	30	15	15	15	105

Decorridos 30 dias da exposição aos miracídios, os moluscos foram examinados duas vezes por semana durante dois meses para a verificação da liberação de cercárias de *S. mansoni*. Para isso foram expostos individualmente a luz incandescente (60W) e a temperatura de 28°C em

frascos contendo água decolorada ao longo de todo o experimento. Foi anotada a mortalidade dos caramujos expostos e do grupo controle.

A suscetibilidade de moluscos de cada localidade e população foi testada para quatro diferentes linhagens do *S. mansoni* (Tabela 5). As linhagens BH, (Belo Horizonte, MG) e SE (Ilha das Flores, SE) são mantidas rotineiramente em laboratório em espécimes de *B. glabrata* simpátrica. As linhagens de *S. mansoni* denominadas SJ, (São José dos Campos, SP) e SJS (São José dos Campos, Seleccionada geneticamente para suscetibilidade) (Zanotti-Magalhães *et al.*, 1991) são mantidas em laboratório em espécimes de *B. tenagophila* simpátrica.

6. Resultados

6.1. Coleta no Litoral Norte

Foram coletados 1270 caramujos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* nos municípios de Caraguatatuba, Ubatuba, São Sebastião e Ilha Bela. Dos exemplares coletados, 84% foram morfologicamente identificados como *B. tenagophila* e o restante (16%) foram identificados como *B. straminea* (Tabela 6).

Foram observados caramujos parasitados em amostras de *B. tenagophila* coletadas em Caraguatatuba (Travessão, Morro do Algodão e Indaiá). Foram identificadas xifidiocercárias (*Cercaria minense*, Ruiz 1952), equinostomocercárias (*Cercaria macrogranulosa*, Ruiz 1952) e cercárias ocelíferas (*Cercaria ocellifera*, Lutz 1919) (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização geográfica, espécie e resultado parasitológico nos pontos de coletas de caramujos da bacia hidrográfica do Litoral Norte do estado de São Paulo.

Município	Ponto de coleta – Localidade		Coordenadas Geográficas		Tipo coleção	Nº Caramujos coletados	Espécie identificada	Resultado Exame cercárias
			Latitude S	Longitude O				
Caraguatatuba	Bairro Rio Claro		23°41’16.4’’	45°28'157.9’’	Irrigação, Fazenda	59	<i>B. tenagophila</i>	negativo
	Bairro Indaiá	P1	23°38’04,2’’	45°25’14.7	Vala- praia	389	<i>B. tenagophila</i>	<i>C. ocellifera</i> Poll <i>C. macrogranulosa</i>
		P2	23°37'59.65"	45°25'11.43"		13	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P3	23°38'3.25"	45°25'14.32"		13		
		P4	23°37'55.7"	45°25'8.78"		9		
	Bairro Travessão		23°41'49.5"	45°26'30.8"	Vala - Rio Pereque-Mirim	167	<i>B. tenagophila</i>	<i>C. macrogranulosa</i>
	Bairro Porto Novo	P1	23°41'24.33"	45°26'41.19"	Vala	11	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P2	23°41’34.8’’	45°26’58.1’’		14		negativo
	Bairro Morro do Algodão	P1	23°40’42,2’’	45°27’18,5’’	Vala	147	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P2	23°40'26,1"	45°26'54,3"		168		<i>C. macrogranulosa</i> <i>C. minense</i>
São Sebastião	Canto do Mar		23°42'58.38"	45°25'53.75"	Vala	4	<i>B. tenagophila</i>	negativo
	Camburi		23°46'20.25"	45°38'50.55"	Vala	15		negativo
	Maresias		23°47’15.60’’	45°33’24.89’’	Vala	19		negativo
	Boracéia		23°45’12,25’’	45°49’31,89’’	Vala	15		negativo
	Barra do Uma		23°45’25.34’’	15°16’74’’	Vala	16		negativo
Ilha Bela	Barra Velha		23°49'17.5"	45°22'01.4"	Vala-alagado	204	<i>B. straminea</i>	negativo
	Itaquanduba		23° 47' 56,4"	45° 21' 44"	Vala	4	<i>B. tenagophila</i>	negativo
Ubatuba	Bairro Sesmária		23°27'22.11"	45° 5'6.98"	Vala-Rio Acaraú	3	<i>B. tenagophila</i>	negativo
Total						1270		

6.2. Coleta no Vale do Ribeira/Litoral Sul

Foram coletados 365 exemplares em Itariri. Dos exemplares coletados 310 foram morfologicamente identificados como *B. tenagophila*, 55 como *B. straminea*. E das 18 amostras de DNA de Registro e Juquiá depositadas na coleção do LBMSU, 15 amostras foram identificados com *B. tenagophila* e 3 como *B. straminea* (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização geográfica, espécie e resultado parasitológico nos pontos de coletas de caramujos da bacia hidrográfica do Vale do Rio Ribeira do Iguape do estado de São Paulo.

Município	Ponto de coleta - Localidade Latitude S		Coordenadas Geográficas		Tipo Coleção	Nº Caramujo coletado	Espécies identificadas	Resultado Exame cercárias
			Latitude S	Longitude O				
Itariri	Ana Dias	P1,	24°18'39,9''	47°07'31,4	Alagado	120	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P2	24°18'26,3''	47°03'58,9	Vala	120	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P3	24°18'11,8"	47°04'04,1"	Vala no Bananal	46	<i>B. tenagophila</i> e <i>B. straminea</i>	negativo
		P4	24°18'13,57"	47° 4'31,73"	Vala	19	<i>B. tenagophila</i>	negativo
	Raposo Tavares	P1	24°17' 55"	47° 08.06,8"	Lago artificial	28	<i>B. tenagophila</i>	negativo
		P2	24°17'53,6''	47°08,55''	Lago artificial	32	<i>B. straminea</i>	negativo
Juquiá	Bairro Estação		24°19'33,6"	47°37'53,5"	Vala	*4	<i>B. tenagophila</i>	
	Pq Nacional		24°18'56,7"	47°38'03,1"	Vala	*4		
	Centro / Vila florida		24°19'19,7"	47°38'22,9"	Vala	*2		
Registro	Vila São Francisco		24°29'20,1"	47°51'06,1"	Vala	*4	<i>B. tenagophila</i>	
	Nosso Teto		24°30'37,0"	47°50'07,9"	Vala	*3 *1	<i>B. straminea</i> <i>B. tenagophila</i>	
Total						383		

* Nº de DNA extraído e depositado na coleção do LBMSU

6.3. Análise da distribuição da diversidade genética populacional na espécie *B. tenagophila* e *B. straminea*

Foram obtidas 72 amostras de DNA genômico da espécie *B. tenagophila* e 13 amostras de *B. straminea* (Tabela 4).

6.3.1 Análise de rRNA 16S

Para o trecho do gene mitocondrial 16S rRNA foram geradas 55 sequências de *B. tenagophila* e 7 sequências de *B. straminea*, com 322 nucleotídeos após edição. No anexo 2 está descrito o alinhamento feito em ClustalX para trecho do gene 16S rRNA.

Em relação às duas microrregiões do estado de São Paulo analisadas, Litoral Norte (35 sequências) e Litoral Sul/Vale do Ribeira do Iguape (20 sequências), a análise para o gene mitocondrial 16S rRNA indicou maior fragmentação no Litoral Sul/Ribeira do Iguape; são 7 haplótipos diferentes, com alta diversidade gênica (0,732) (Tabela 8). A distância genética (Kxy) entre as duas microrregiões, em torno de 2%, e o $F_{ST} > 0,25$ (Tabela 9) indicaram que estas microrregiões apresentam um grau considerável de isolamento genético.

Tabela 8 - Índices de diversidade molecular para o gene mitocondrial 16S rRNA de *B. tenagophila* estimados em sequências agrupadas conforme microrregiões litorâneas do estado de São Paulo. (N= número de sequências, S= número de sítios variáveis, h= número de haplótipos, Hd= diversidade haplotípica e variância (VHd), π = número médio de diferenças entre duas sequências, k= número médio de diferenças, D= índice de neutralidade de Tajima).

Microrregiões	N	S	h	Hd (VHd)	π	k	Tajima D
Litoral Norte	35	3	3	0,516 (0,00247)	0,00333	1,018	0,8982
Litoral Sul	20	8	7	0,732 (0,00855)	0,00526	1,611	-0,9632

Tabela 9 - Índices de divergência genética para o gene mitocondrial 16S rRNA de *Biomphalaria tenagophila* calculados entre as microrregiões do Litoral Norte e Sul do estado de São Paulo. (N= número de sequências, n=número de sítios polimórficos, Kxy= número médio de diferenças de nucleotídeos entre sequências, distância genética, nfix= número de diferenças fixadas, μ = número de mutações compartilhadas, Fst= índice de diferenciação de Wright).

Microrregiões 1	Microrregiões 2	N	n	Kxy	Nfix	μ	Fst
Litoral Norte	Litoral Sul	55	9	2,060	0	2	0,36189

Os resultados do gene 16S rRNA analisados nas seis populações deste estudo mostraram uma significativa diversidade genética (Hd) (0,714) nos caramujos de Juquiá (Tabela 10). Os resultados indicaram também que a diversidade genética está estruturada dentro das populações de caramujos, ou seja, os caramujos são mais diferentes entre si numa mesma população do que em caramujos de diferentes populações (Tabela 10 e 11).

Tabela 10 - Polimorfismo molecular estimado para as 55 sequências do gene mitocondrial 16S rRNA de *Biomphalaria tenagophila*. (N= número de sequências, S= número de sítios variáveis, h= número de haplótipos, Hd= diversidade haplotípica e variância (VHd), π = número médio de diferenças entre duas sequências, k= número médio de diferenças, Tajima D= índice de neutralidade de Tajima).

16S Populações	N	S	H	Hd (VHd)	K	π	Tajima D
Caraguatatuba	27	3	3	0,453 (0,00755)	0,807	0,00285	0,29137
São Sebastiao	6	2	2	0,533 (0,02963)	1,067	0,00349	1,03194
Ilha Bela	2	0	1	0,000	0,000	0,000	0,0000
Registro	4	3	2	0,500 (0,07031)	1,500	0,00490	0,75445
Itariri	9	5	4	0,583 (0,03361)	1,111	0,00363	1,67754
Juquiá	7	2	3	0,714 (0,01606)	0,857	0,00280	0,20619
Total	55	9	8	0,670 (0,00161)	1,585	0,00518	0,53400

O teste de neutralidade D de Tajima não foi significativo para $p > 0,10$ em nenhuma das amostras, indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações.

O índice de diferenciação (Fst) estimado para as populações aos pares (Tabela 11) indicou diferenciação genética alta ($F_{st} > 0,25$) entre as populações de Registro/Caraguatatuba (0,68), Registro/Ilha Bela (0,66), Ilha Bela/Caraguatatuba (0,71), Juquiá/Registro (0,58), Juquiá/Caraguatatuba (0,58), Registro/Itariri (0,47), Registro/São Sebastião (0,56) e Itariri/Caraguatatuba (0,43). Os baixos valores de divergência e fixação de alelos $< 0,25$ entre populações de Caraguatatuba/São Sebastião (0,19), São Sebastião/Ilha Bela (0,20) e Juquiá/ Itariri (0,12) são de certa forma esperados, em função da proximidade geográfica destes pontos investigados.

É interessante notar a proximidade genética entre as populações de São Sebastião/Itariri (0,01), Ilha Bela/Itariri (0,0) e Juquiá/São Sebastião (0,22). Como justificativa a possibilidade de um corredor de colonização entre estas localidades não pode ser descartada (Tabela 11).

Os resultados estimados de divergência genética baseada em parâmetros estimados em DNAsp para o gene 16S demonstram que populações que colonizam áreas geograficamente próximas, como Juquiá e Registro, podem ser geneticamente distintas das demais populações.

Tabela 11 - Estimativa de divergência genética entre as diferentes populações de *Biomphalaria tenagophila* para o mitocondrial 16S rRNA com 322 nucleotídeos testadas aos pares em DNAsp. (N= número de sequências, N= número de sítios polimórficos, Kxy= número médio de diferenças de nucleotídeos entre sequências, distância genética, nfix= número de diferenças fixadas, μ = número de mutações compartilhadas, Fst= índice de diferenciação de Wright (varia de 0 a 1)).

População 1	População 2	N	n	Kxy	n fix	μ	Fst
Juquiá	Registro	11	5	2,821	0	0	0,58228
	Itariri	16	7	1,127	0	0	0,12676
	São Sebastião	13	4	1,238	0	0	0,22308
	Caraguatatuba	34	5	2,090	0	0	0,58637
	Ilha Bela	9	2	0,571	0	0	0,25000
Registro	Itariri	13	6	2,472	0	2	0,47191
	São Sebastião	10	5	2,917	0	0	0,56000
	Caraguatatuba	31	6	3,769	0	0	0,68531
	Ilha Bela	6	3	2,250	0	0	0,66667
Itariri	São Sebastião	15	5	1,074	0	2	0,01379
	Caraguatatuba	36	6	1,745	0	2	0,43179
	Ilha Bela	11	5	0,556	0	0	0,00000
São Sebastião	Caraguatatuba	36	6	1,745	0	2	0,19064
	Ilha Bela	8	2	0,667	0	0	0,20000
Ilha Bela	Caraguatatuba	29	3	1,519	0	0	0,71295

No conjunto de sequências de *B. tenagophila* para o gene 16s rRNA foram identificados 8 haplótipos diferentes, que estão distribuídos de forma heterogênea; uma mesma localidade tem até 4 haplótipos compartilhados, enquanto algumas localidades apresentaram sequências agrupadas em haplótipos únicos e exclusivos da localidade de coleta (Tabelas 12 e 13). Em Caraguatatuba observamos que localidades geograficamente próximas – bairro Morro do Algodão, Indaiá e Travessão – apresentam indivíduos agrupados em diferentes haplótipos, o que caracteriza a possibilidade de alta variabilidade genética numa mesma localidade.

Tabela 12 - Banco de dados com 55 sequências do gene mitocondrial 16S rRNA de *Biomphalaria tenagophila* e 7 sequências de *B. straminea* estruturadas em grupos de haplótipos.

Haplótipos	N	Q° de Sequência/Município/Local
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		
H1	22	19 Caraguatatuba: 3 Travessão, 4 Rio claro, 4 Porto Novo P1 e P2, 2 Morro do Algodão P1 (Jose Antonio Ferreira), 6 Indaiá P1, P2 e P3, 2 São Sebastião: Barra do Una e Maresias, 1 Itariri: Ana dias P2, (Fábrica Alumínio)
H2	1	1 Caraguatatuba: Travessão
H3	3	3 Registro: São Francisco
H4	1	1 Itariri: Ana dias P4, (Campo de Aviação)
H5	23	3 Juquiá: Pq. Nacional, Bairro Estação 1, Vila Florida 1 Registro: Nosso Teto 6 Itariri: Ana dias P1, P2 e P3 (F. Palmito, F. Alumínio e Av. Eng. Clay), Raposo Tavares P1 (P. Balsamo) 4 São Sebastião: Canto do Mar, Boracéia, Camburi, Barra do Una 2 Ilha Bela: Itaquantuba 7 Caraguatatuba: 2 Travessão, 3 Morro do Algodão P2 (Casimiro de Abreu), 2 Indaiá P4
H6	1	1 Itariri: Ana dias P1 (F. Palmito)
H7	1	1 Juquiá: Bairro Estação 2
H8	3	3 Juquiá: Pq. Nacional, Bairro Estação 1
<i>Biomphalaria straminea</i>		
H9	4	3 Registro: Nosso Teto, 1 Itariri: Raposo Tavares P2 (Hotel Jureia)
H10-11	2	2 Ilha Bela: Barra Velha
H12	1	2 Itariri: Ana dias P3 (Av. Eng. Clay)

Tabela 13 - Índices de diversidade intrapopulacional para o gene 16S da espécie *B. tenagophila*.

População	Hd	N° H	H	Q°/ localidade/ Identificação
Caraguatatuba	0,453	3	H1	19: 3 Travessão, 4 Rio claro, 4 Porto Novo P1 e P2, 2 Morro do Algodão P1 (Jose Antonio Ferreira), 6 Indaiá P1, P2 e P3,
			H2	1: Travessão
			H5	7: 2 Travessão. 3 Morro do Algodão P2, 2 Indaiá P4
São Sebastião	0,5333	2	H1	2: Barra do Una e Maresias
			H5	4: Canto do Mar, Boracéia, Camburi, Barra do Una
Ilha Bela	0,0000	1	H5	2: Itaquantuba
Registro	0,5000	2	H3	3: São Francisco
			H5	1: Nosso Teto
Itariri	0,5830	4	H1	1: Ana dias P2, (Fábrica Alumínio)
			H4	1: Ana dias P4, (Campo de Aviação)
			H5	6: : Ana dias P1, P2 e P3 (F. Palmito, F. Alumínio e Av. Eng. Clay), Raposo Tavares P1 (Pesqueiro Balsamo)
			H6	1: Ana dias P1, (F. Palmito)
Juquiá	0,7140	3	H5	3: Pq. Nacional, Bairro Estação 1, Vila Florida
			H7	1: Bairro Estação 2
			H8	3: Pq. Nacional, Bairro Estação 1

A distribuição de haplótipos por localidade de coleta (Figura 15) demonstrou populações com compartilhamento de vários haplótipos (Caraguatatuba, São Sebastião e Itariri, H1 e H5) e localidades com haplótipos únicos e exclusivos que estão restritos a estas localidades: Itariri (H7), Caraguatatuba (H2), Juquiá (H6) e Registro (H3). O haplótipo 5 (H5) é compartilhado entre todas as localidades.

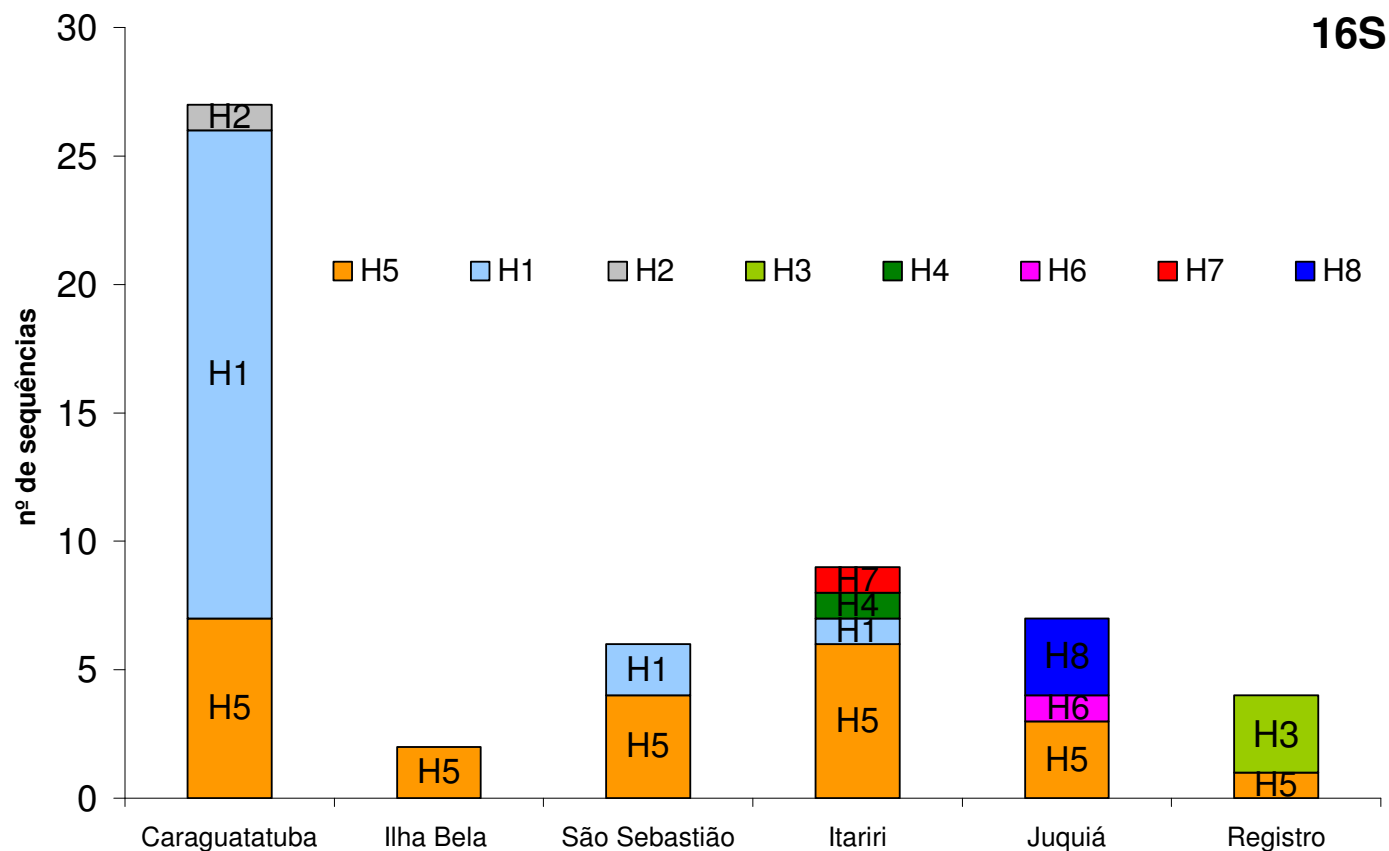


Figura 15 - Distribuição geográfica das sequências de 16S agrupadas em haplótipos.

Uma rede de haplótipos foi calculada por meio de parcimônia, em TCS (Clement, Posada & Crandal, 2000), onde os haplótipos são conectados a partir do número de mutações. Grupos mais antigos são aqueles com maior número de mutações. O grupo H1, teoricamente com sequências ancestrais, agrega 21 sequências (5 Itariri, 3 Juquiá, 7 Caraguatatuba, 4 São Sebastião, 2 Ilha Bela); os grupos H2 (Juquiá), H3, H4, H5, H6, contêm apenas uma sequência em cada um deles; o grupo H7 tem 22 sequências (19 Caraguatatuba, 2 São Sebastião, 1 Itariri); os haplótipos H8 (Caraguatatuba), H9 (Itariri), H10 (Registro), são formados por uma sequência, enquanto o H11 apresenta 2 sequências de Registro. O *loop* entre os haplótipos H9, H10 e H11 indica baixa resolutividade para estas sequências (Figura 16).

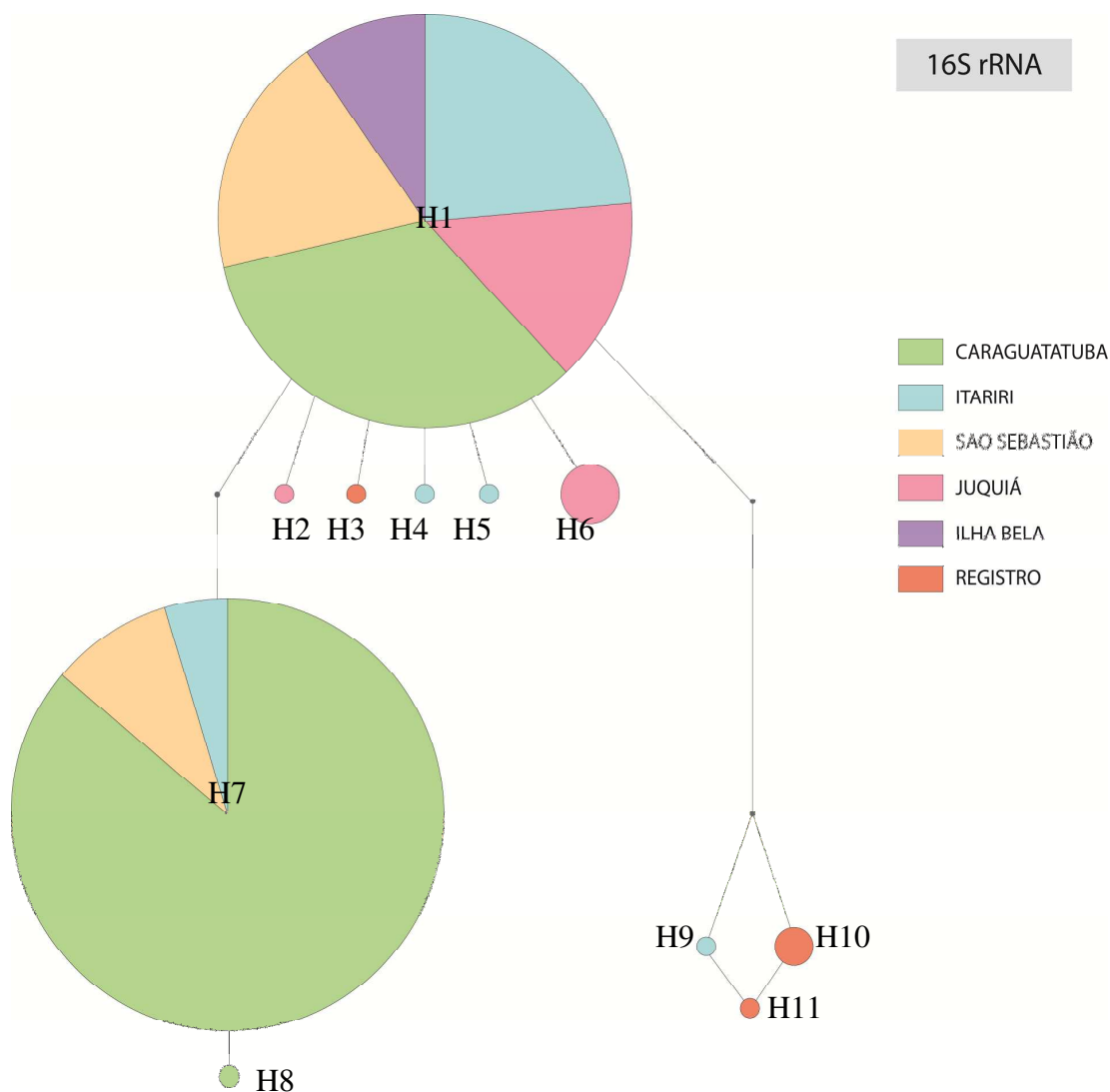


Figura 16 - Rede de haplótipos de 16S calculada por meio de parcimônia, em TCS.

A análise filogenética foi feita sobre os dados organizados em haplótipos (Tabela 12). É interessante notar a estruturação em clados distintos da espécie *B. straminea*.

Na Figura 17 está representada a análise filogenética das sequências 16S rRNA de caramujos coletados nas seis localidades na porção paulista da Bacia Litorânea, pelo método de distancia. Na Figura 18, a aplicação do método de Máxima Parcimônia, resultou numa árvore onde podemos verificar a diferenciação das populações em dois clados distintos, um com haplótipos exclusivamente do Litoral Sul/Vale do Ribeira do Iguape mais Ilha Bela e outro com haplótipos do Litoral Norte (Caraguatatuba e São Sebastião), mais uma sequência de Itariri. Topologia similar foi obtida por análise Bayesiana (Figura 19), sob o modelo de substituição de nucleotídeos HKY85 (Hasegawa, Kishino & Yano, 1985).

Nos distintos métodos de análise filogenética (Distância, Máxima Parcimônia e MrBayes) (Figuras 17-19), há alto suporte estatístico para o ramo com as sequências de Registro e Itariri (81% em Distância, 86% em Máxima Parcimônia e 90% em MrBayes).

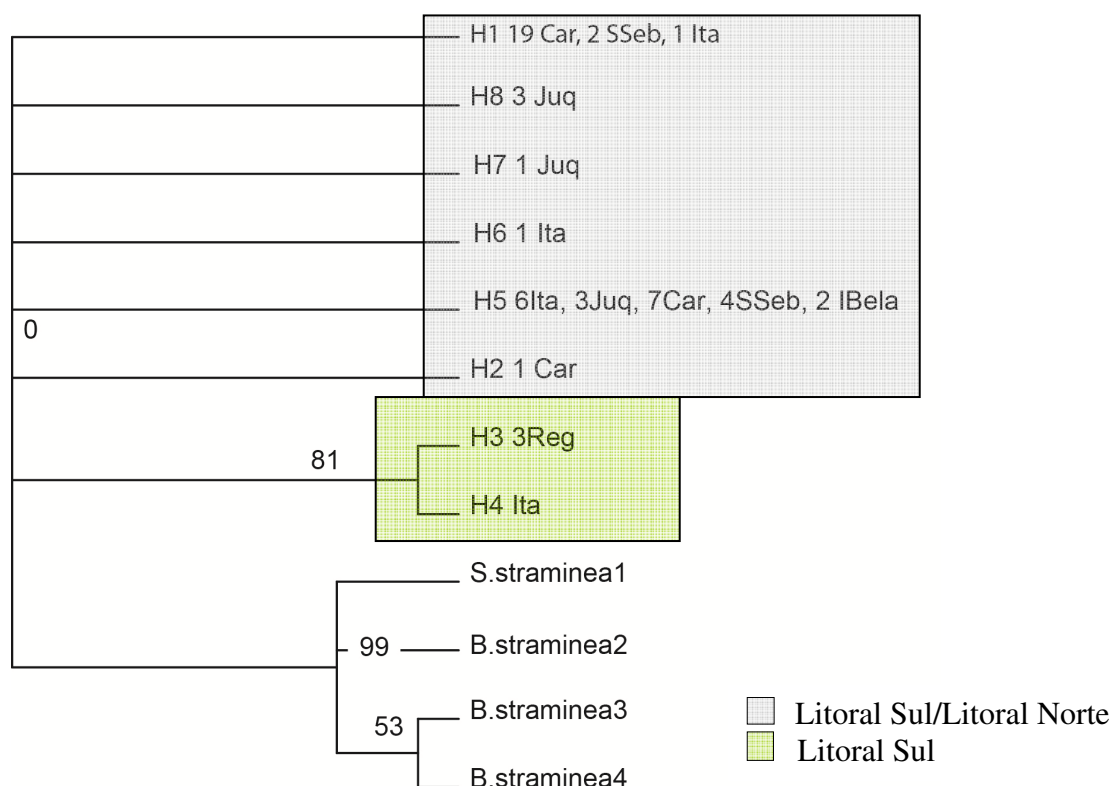


Figura 17 - Árvore calculada para o gene mitocondrial 16S rRNA a partir de matriz de distância, com correção baseada em modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, construção de árvore ótima com algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 réplicas, no software PAUP.

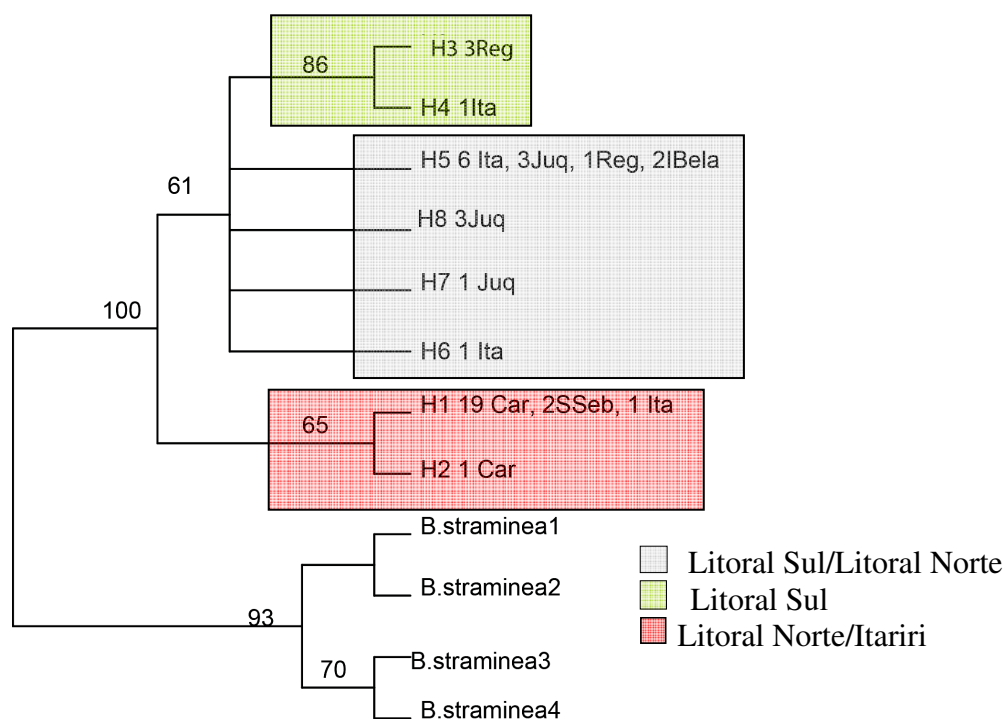


Figura 18 - Representação gráfica da relação evolutiva entre os haplótipos do gene mitocondrial 16S rRNA de *Biomphalaria tenagophila*, após análise por Máxima Parcimônia e busca heurística para a construção da árvore de consenso. Confiabilidade dos ramos calculada por bootstrap em 1000 réplicas.

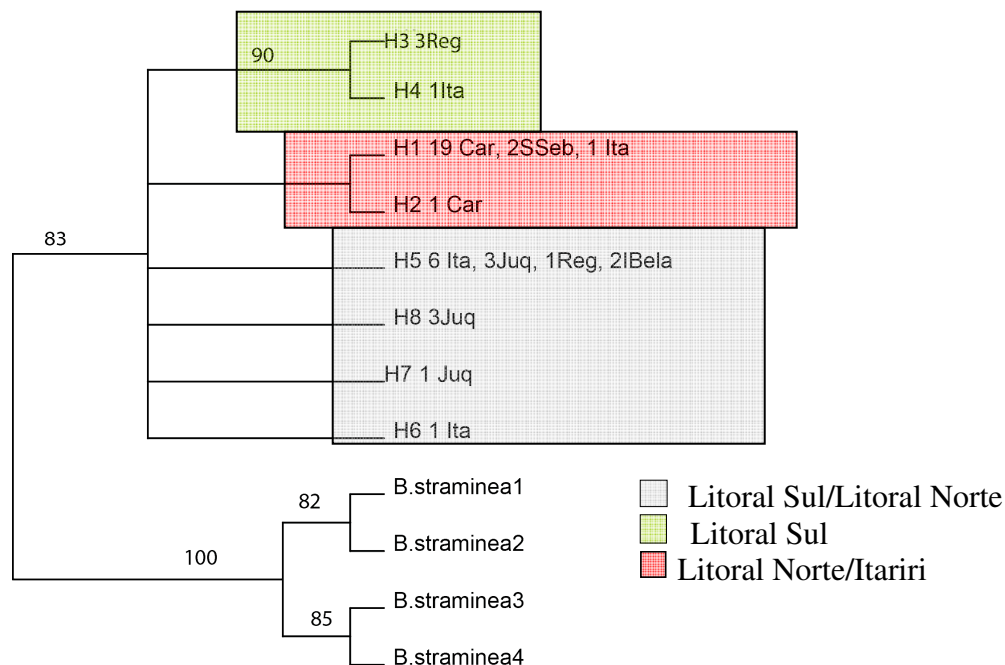


Figura 19- Representação gráfica da relação de parentesco entre os haplótipos 16S rRNA de *B. tenagophila*, após análise Bayesiana, no software MrBayes.

6.3.2 Análise de ITS2

Para a região ITS2 do gene nuclear ribossômico foram obtidas 31 sequências de *B. tenagophila* e 2 sequências de *B. straminea*, com tamanho de 409 nucleotídeos após edição. No anexo 3 encontra-se o alinhamento do gene nuclear ITS2. Calculamos diferentes índices de diversidade para as populações de *B. tenagophila* aqui estudadas.

As sequências de ITS2 foram analisadas de forma comparada nas duas microrregiões do estado de São Paulo: uma microrregião com 17 sequências para o Litoral Norte e outra microrregião com 14 sequências para o Litoral Sul/Vale do Ribeira do Iguape.

Para o gene ITS2 podemos observar que a probabilidade de retirarmos dois haplótipos diferentes (Hd) de uma mesma localidade geográfica varia entre as diferentes microrregiões do Litoral Norte e do Litoral Sul/Vale do Ribeira do Iguape. Os índices de diversidade (Hd) calculados para as sequências de *B. tenagophila* do Litoral Sul é duas vezes maior do que a diversidade haplotípica calculada para as sequências do Litoral Norte, ou seja, a probabilidade de dois animais serem idênticos por descendência no Litoral Sul é muito baixa (Tabela 14).

Tabela 14 - Índices de diversidade molecular para o gene nuclear ITS2 das 31 sequências de *Biomphalaria tenagophila* estimados em sequências agrupadas conforme microrregiões litorâneas do estado de São Paulo. (N= número de sequências, S= número de sítios variáveis, h= número de haplótipos, Hd= diversidade haplotípica e variância (VHd), π = número médio de diferenças entre duas sequências, k= número médio de diferenças, Tajima D= índice de neutralidade de Tajima).

Microrregião	N	S	h	Hd (VHd)	π	k	Tajima D
Litoral Norte	17	3	4	0,41912 (0,0199)	0,00116	0,45588	-1,3772
Litoral Sul	14	12	8	0,86813 (0,0058)	0,00898	3,53846	-0,2480

Os resultados de ITS2 foram analisados nas seis populações referentes aos seis municípios estudados (Tabela 15). O índice de diversidade de haplótipos (Hd) da população de Caraguatatuba é muito menor (0,200) do que nas demais populações. As populações de *B. tenagophila* de Registro e Juquiá apresentaram para o ITS2 caramujos extremamente diferentes entre si (Hd de 1,000). A alta diferenciação genética dentro de uma mesma população indica que a espécie pode se estruturar em pools genéticos distintos. Observou-se, no entanto, que os valores de diversidade gênica foram maiores em amostras com poucos indivíduos analisados (Tabela 15).

Populações abaixo de 10 indivíduos poderiam sofrer efeito do reduzido número amostral, interferindo na aferição da variabilidade genética.

Os valores do teste de neutralidade D de Tajima não foram significativos para $p > 0,10$ em nenhuma das amostras, indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações.

Tabela 15 - Polimorfismo molecular estimado para as 31 sequências do gene nuclear ITS2 de *B. tenagophila* por DNAsp. (N= número de sequências, S= número de sítios variáveis, h= número de haplótipos, Hd= diversidade haplotípica, VHd= variância de diversidade de haplotipos, π = número médio de diferenças entre suas sequências, D= índice de neutralidade de Tajima).

Populações	N	S	h	Hd (VHd)	π	Tajima D
Caraguatatuba	10	1	2	0,200 (0,02376)	0,00051	-1,11170
São Sebastião	6	2	3	0,733 (0,02407)	0,00220	-0,05002
Ilha Bela	1	0	0	0,000	0,00000	-
Itariri	6	8	3	0,600 (0,04630)	0,00728	-1,07180
Registro	3	8	3	1,000 (0,07407)	0,01354	-
Juquiá	5	8	5	1,000 (0,01600)	0,00863	-0,80734
Total	31	14	11	0,665 (0,00915)	0,00555	-1,24805

Ao compararmos as microrregiões do Litoral Norte e do Litoral Sul/Ribeira do Iguape, observamos o valor de diferenciação das microrregiões F_{st} próximo de 25% (Tabela 16) indicando que existe um moderado fluxo gênico entre estas diferentes regiões geográficas.

Tabela 16 - Índices de divergência genética para o gene ITS2 de *Biomphalaria tenagophila* calculados entre as microrregiões dos Litorais Norte e Sul do estado de São Paulo. (N= número de sequências, n=número de sítios polimórficos, Kxy= número médio de diferenças de nucleotídeos entre sequências, distância genética, nfix= número de diferenças fixadas, μ = número de mutações compartilhadas, F_{st} = índice de diferenciação de Wright).

Microrregião 1	Microrregião 2	N	n	Kxy	nfix	μ	F_{st}
Litoral Norte	Litoral Sul	31	14	2,655	0	1	0,24790

Mas, dentre as populações analisadas, quais tem maior probabilidade de fluxo gênico? A distância geográfica seria determinante para a restrição de fluxo gênico? Quando analisadas aos pares para os valores de divergência interpopulacional (Tabela 17), observamos baixa divergência genética ($F_{st} < 0,25$) nas populações próximas geograficamente como Juquiá e Itariri (0,069), Registro e Itariri (0,016), e nas populações de Caraguatatuba e São Sebastião (0,11).

Estes resultados indicam menor isolamento reprodutivo e maior fluxo gênico entre caramujos destas localidades. Nas populações geograficamente mais distantes, como as populações de Caraguatatuba e Juquiá (0,42), Itariri e São Sebastião (0,50) Caraguatatuba e Registro (0,32), Juquiá e São Sebastião (0,28), os valores de *Fst* mostram alto grau de isolamento reprodutivo entre estas populações. Em relação às populações Caraguatatuba e Itariri (*Fst*=0,04) e Registro e São Sebastião (0,19) os resultados indicam que, apesar de separadas geograficamente, estas populações estão filogeneticamente relacionadas (Tabela 17).

Tabela 17 - Estimativa de divergência genética entre as diferentes populações de *Biomphalaria tenagophila* para o gene ITS2 com 409 nucleotídeos. (N= número de sequências, n=número de sítios polimórficos, Kxy= número médio de diferenças de nucleotídeos entre sequências, distância genética, nfix= número de diferenças fixadas, μ = número de mutações compartilhadas, *Fst*= índice de diferenciação de Wright).

População 1	População 2	N	n	Kxy	Nfix	μ	Fst
Juquiá	Registro	8	10	3,533	0	6	0,23585
	Itariri	11	10	3,367	0	6	0,06931
	São Sebastião	11	9	2,967	0	1	0,28090
	Caraguatatuba	15	9	3,100	0	0	0,41935
	Ilha Bela	6	8	3,000	0	0	-
Registro	Itariri	9	11	4,167	0	5	0,01600
	São Sebastião	9	10	3,833	0	0	0,19130
	Caraguatatuba	13	10	4,100	1	0	0,32520
	Ilha Bela	4	9	4,000	1	0	-
Itariri	São Sebastião	12	9	1,778	0	1	0,50000
	Caraguatatuba	16	9	1,600	0	0	0,04167
	Ilha Bela	7	8	1,500	0	0	-
São Sebastião	Caraguatatuba	16	3	0,600	0	0	0,11110
	Ilha Bela	7	2	0,500	0	0	-
Ilha Bela	Caraguatatuba	11	1	0,100	0	0	-

As sequências agrupadas em haplótipos mostraram 11 haplótipos para as sequências de *B. tenagophila* e 2 haplótipos para as sequências de *B. straminea* (Tabela 18). Na tabela 19 os haplótipos estão agrupados por localidade e na Figura 20, observamos o compartilhamento de haplótipos entre as localidades de coleta, evidenciando provável fluxo gênico entre eles.

Tabela 18 - Banco de dados com 31 sequências do gene ITS2 de *B. tenagophila* e 2 sequências de *B. straminea* estruturadas em grupos de haplótipos.

Haplótipo	N	Sequência/Município/local
<i>B. tenagophila</i>		
H1	2	1 Juquiá: Pq. Nacional, 1 Registro: São Francisco
H2	1	1 Itariri: Ana Dias P2, Fábrica Alumínio
H3	1	1 Juquiá: Bairro Estação 1
H4	2	1 Juquiá: Bairro Estação 2, 1 Registro: Nosso Teto
H5	1	1 Juquiá: Pq. Nacional
H6	2	2 São Sebastião: Barra do Una e Maresias
H7	1	1 Registro: São Francisco
H8	18	1 Juquiá: Vila Florida 9 Caraguatatuba: 4 Travessão, 4 Porto Novo P1 e P2, 1 Morro do Algodão P2, 2 Indaia P1 e P3 3 São Sebastião: Canto do Mar, Camburi, Barra do Una 1 Ilha Bela: Itaquantuba 4 Itariri: 3 Ana Dias P1 e P3, (F. Palmito, Clay), 1 Raposo Tavares P1,(Pesqueiro)
H9	1	1 São Sebastião: Boracéia
H10	1	1 Caraguatatuba: Rio claro(Cambixo)
H11	1	1 Itariri: Ana Dias P4 (Campo de Aviação)
<i>B. straminea</i>		
H12-13	2	1 Registro: Nosso Teto , 1 Ilha Bela: Barra Velha

Tabela 19 - Diversidade genética molecular intrapopulacional de *B. tenagophila* de ITS2.

População	HD	Nº H	H	Q°/ localidade/ Identificação (LBMSU)
Caraguatatuba	0,2000	2	H8	9: 4 Travessão, 4 Porto Novo P1 e P2, 1 Morro do Algodão P2, 2 Indaia P1 e P3
			H10	1: Rio claro (Cambixo)
São Sebastião	0,7333	3	H6	2: Barra do Una e Maresias
			H8	3: Canto do Mar, Camburi, Barra do Una
			H9	1: Boracéia
Ilha Bela	0,0000	1	H8	1: Itaquantuba
Registro	1,0000	3	H1	1: São Francisco
			H4	1: Nosso Teto
			H7	1: São Francisco
Itariri	0,6000	3	H2	1: Ana Dias P2, Fábrica Alumínio
			H8	4: 3Ana Dias P1 e P3, (F. Palmito, Clay), 1 Raposo Tavares P1,(Pesqueiro)
			H11	1: Ana Dias P4 (Campo de Aviação)
Juquiá	1,0000	5	H1	1: Pq. Nacional
			H4	1: Bairro Estação 2
			H3	1: Bairro Estação 1
			H5	1: Pq. Nacional
			H8	1: Vila Florida

A distribuição de haplótipos por localidade de coleta (Figura 20) demonstrou a mesma tendência encontrada para o gene 16S: as populações de Caraguatatuba, São Sebastião, Ilha Bela, Itariri e Juquiá compartilham o haplótipo H8, que não está representado na população de Registro. As populações de Caraguatatuba (H10), São Sebastião (H6, H9), Registro (H7), Juquiá (H5, H3) e Itariri (H2, H11) apresentam haplótipos únicos, sem evidências de compartilhamento com as demais populações, podendo ser considerados raros. (Figura 20).

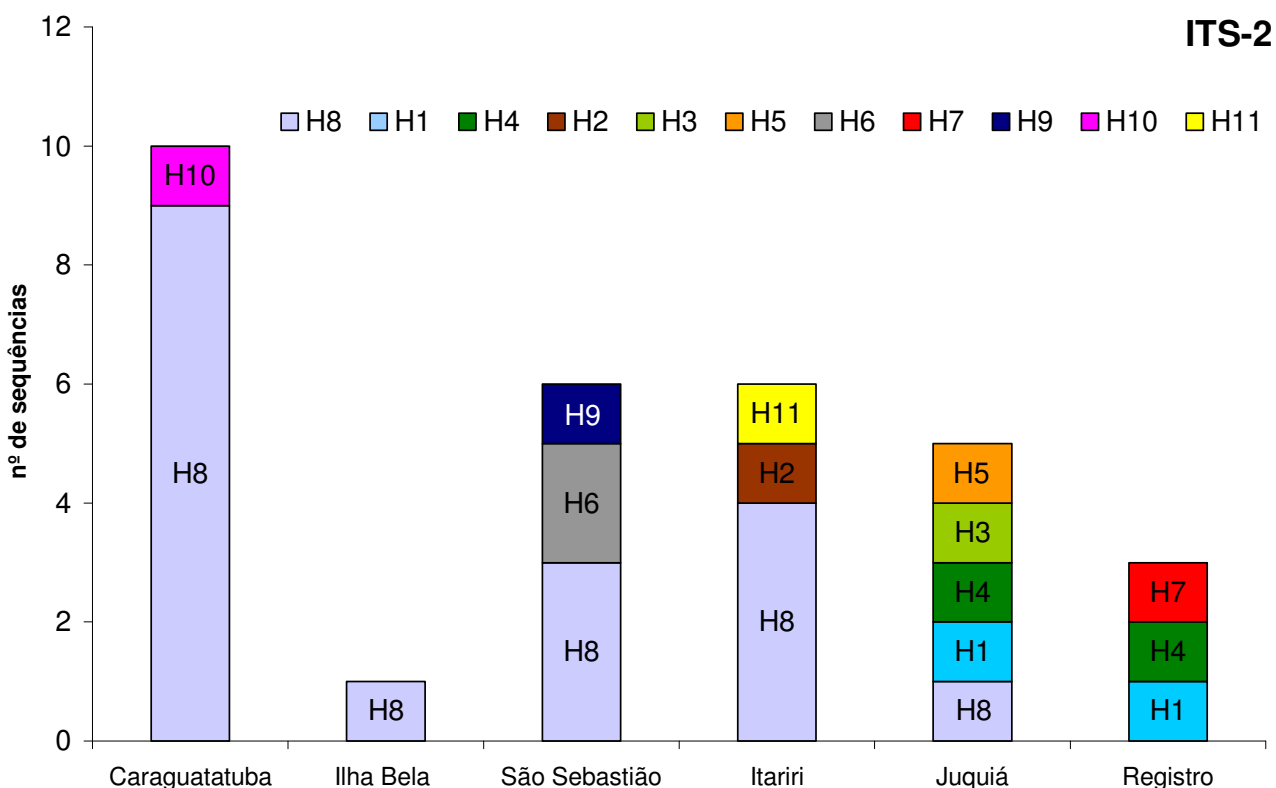


Figura 20 - Distribuição geográfica das sequências de ITS2 agrupadas em haplótipos.

Para as análises filogenéticas foram utilizadas as sequências agrupadas em haplótipos (Tabela 19). Desta forma, foi possível aplicar o método de Parcimônia, que seria impossível de ser aplicado em função do grande número de sequências individuais obtidas neste estudo.

A relação evolutiva entre as sequências de ITS2 está representada por três métodos diferentes. Na árvore representada na Figura 21 está a distância calculada a partir de uma matriz que foi corrigida aplicando-se o modelo Kimura 2-parâmetros, que pressupõe transições mais frequentes do que transversões. Na Figura 22, com a aplicação do método de Máxima Parcimônia

e busca heurística, há uma melhor resolução para o clado (H1, H2, H3). O agrupamento destas sequências em um único clado distinto fica evidente e ganha maior confiabilidade quando a análise é feita em MrBayes (Figura 23). A árvore filogenética por análise Bayesiana foi obtida a partir da aplicação do modelo evolutivo K80 (Kimura, 1980), calculado em MrModeltest.

Em termos gerais, a análise filogenética do gene ITS2 de Máxima Parcimônia e Bayesiana, corrobora a distinção de *B. tenagophila* em dois clados diferenciados, um com apenas sequências do Vale do Ribeira e outro com Vale do Ribeira e Litoral Norte. Os dados indicam a possibilidade de existência de caramujos em Registro e Juquiá que pertencem a um grupo taxonômico divergente dentro do agrupamento de *B. tenagophila*.

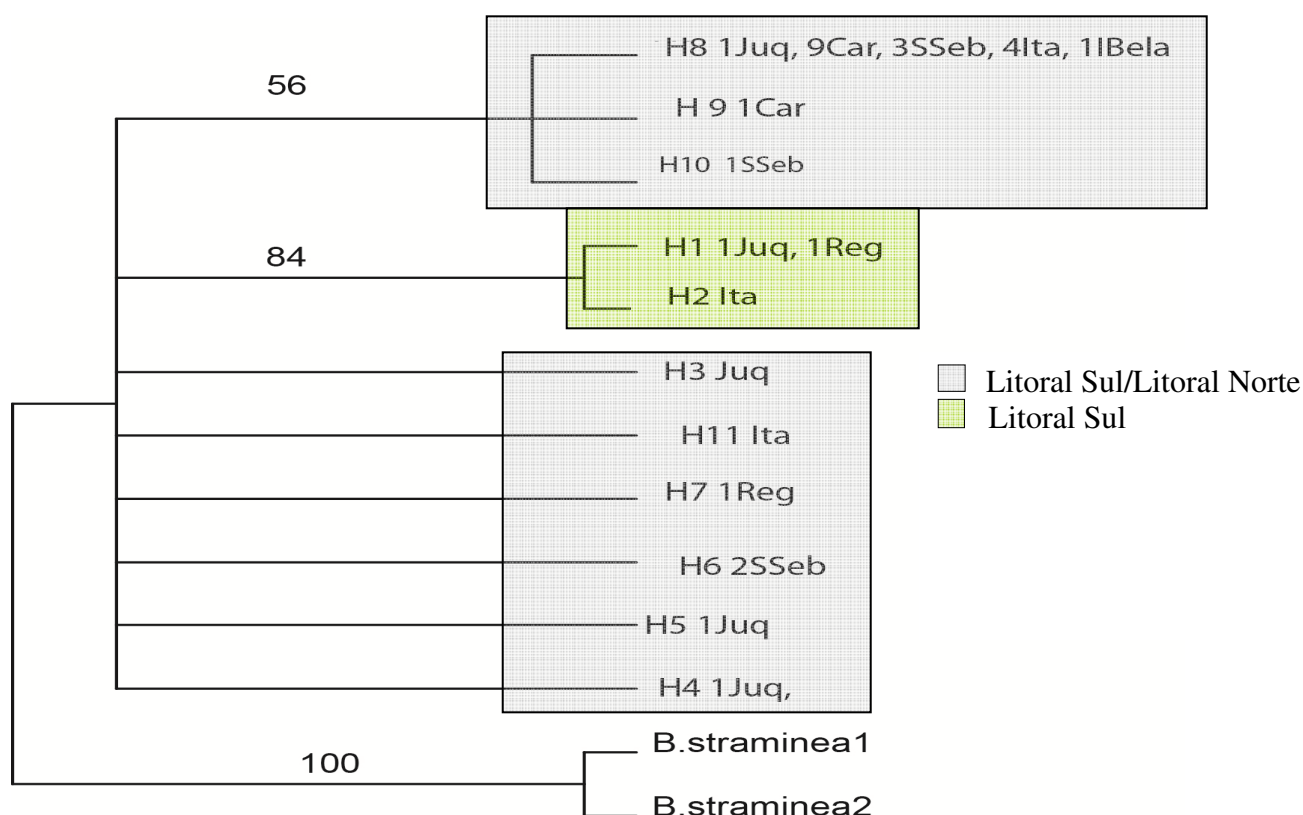


Figura 21 - Árvore calculada para o gene ITS2 a partir de matriz de distância, com correção baseada em modelo evolutivo Kimura-2 parâmetros, construção de árvore com algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1000 réplicas.

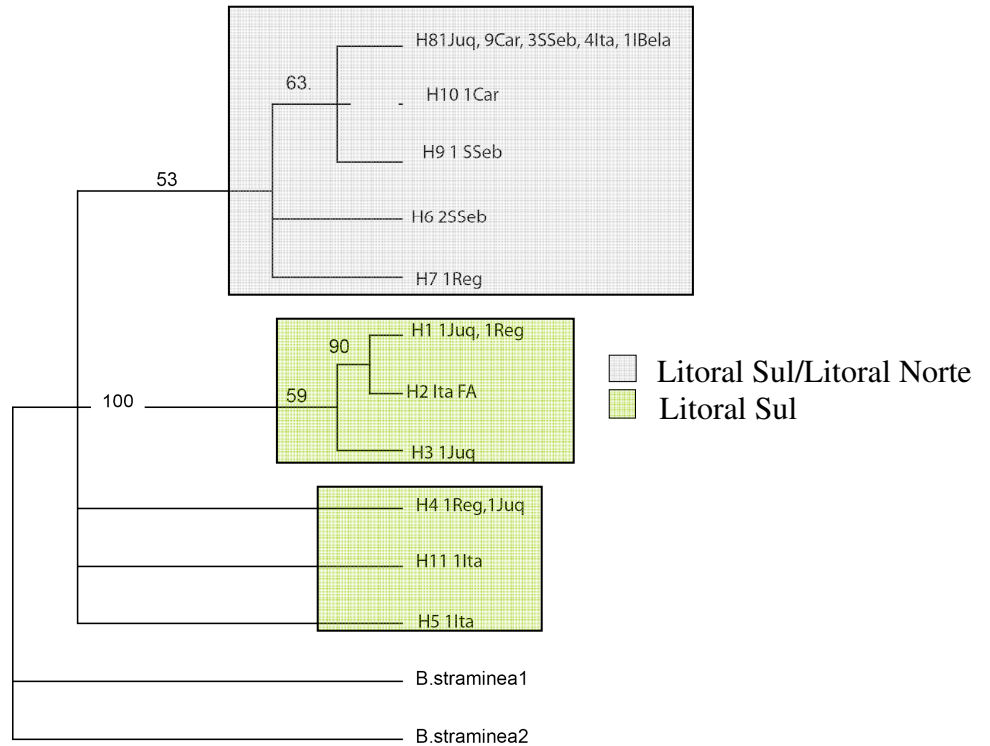


Figura 22 - Representação gráfica da relação evolutiva entre os haplótipos ITS2 de *Biomphalaria tenagophila*, após análise por Máxima Parcimônia e busca heurística para a construção da árvore de consenso. Confiabilidade dos ramos calculada por bootstrap em 1000 réplicas.

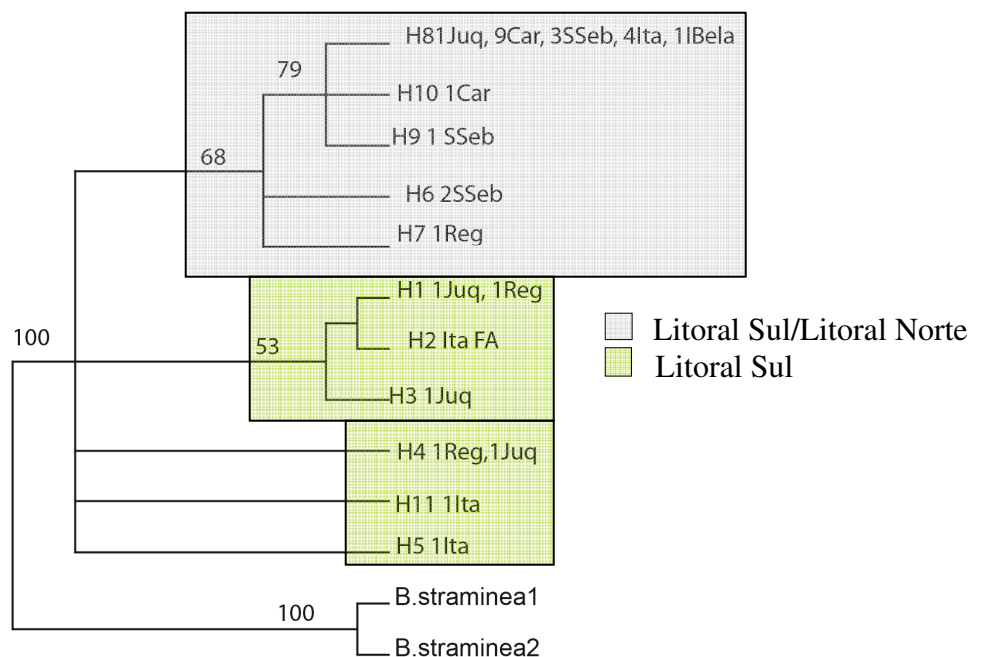


Figura 23 - Representação gráfica da relação de parentesco entre os haplótipos ITS2 de *Biomphalaria tenagophila*, após análise Bayesiana.

Quando comparados os valores de diversidade molecular dos genes ITS2 e 16S rRNA verificamos que a diferença significativa está no número médio de diferenças de nucleotídeos. Isto pode ser devido às diferentes características evolutivas destes dois genes. Em termos de diversidade gênica (Hd) podemos afirmar que para ambos os genes a diversidade total variou em torno de 66-67% (Tabela 20).

Tabela 20 - Índices de diversidade molecular do conjunto de haplótipos para as sequências da região 16S e ITS2 de *Biomphalaria tenagophila*. (H= número de haplótipos, Hd= diversidade haplotípica, (var)= variância de Hd, π = número médio de diferenças entre suas sequências, k= número médio de diferenças de nucleotídeos, D= índice de Tajima para neutralidade, S= número de sítios variáveis).

Gene	Tamanho	H	S	Hd (var)	π	k	Tajima D
ITS2	409 pb	31	14	0,6645 (0,00915)	0,00555	2,185	-1,24805*
16S	322 pb	55	9	0,6700 (0,00161)	0,00518	1,585	-0,53400*

*não significativo para $P > 0,10$.

6.4. Teste de suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila*

6.4.1. Taxa de infecção

Observamos que caramujos de Caraguatatuba dos bairros Indaiá (Pontos 1, 3 e 4), Morro do Algodão (Ponto 2 – Casimiro de Abreu) e de Ilha Bela (Itaquantuba) apresentaram taxas de infecção maiores do que a população de caramujos de Itariri (Ana Dias Ponto 2 - Fábrica Alumínio) quando expostos às linhagens SJ e SJS de *S. mansoni* (Figura 24 e Tabela 21).

Tabela 21 - Taxas de infecção, taxa de mortalidade e período pré patente de *Biomphalaria tenagophila* expostas às linhagens SJ e SJS.

B. tenagophila Expostas as Imagens SJ e SJS:											
		Linhagem SJ				Linhagem SJS					
B. tenagophila Localidade	Nº	Nº de Positivo	Taxa de Infecção (%)	Taxa mortalida de (%)	Período pré patente (Semanas)	Nº	Nº de Positivo	Taxa de Infecção (%)	Taxa mortalida de (%)	Período pré patente (Semanas)	
Itariri(Fábrica Alumínio)	30	6	20,0	26,7	(5º a 6º)	30	5	16,7	26,7	(5º a 6º)	
Ilha Bela (Itaquantuba)	30	21	70,0	73,3	(5º a 12º)	30	12	73,3	63,3	(5º)	
Caraguata tuba	(Indaiá –P1)	15	11	73,3	40	(5º a 7º)	15	12	80,0	60,0	(5º)
	(Indaiá –P3)	30	18	60,0	63,3	(6º a 13º)	30	25	83,3	76,3	(5º a 12º)
	(Indaiá –P4)	30	15	50,0	86,7	(5º a 7º)	30	22	73,3	86,7	(5º a 9º)
	(MA** -P2)	15	12	80,0	26,7	(5º a 9º)	15	14	93,3	66,7	(5º)
	(Travessão)	30	0	0	50,0	-	30	0	0	50,0	-
São Sebastião (B.Una)	30	0	0	36,7	-	30	0	0	43,3	-	

* MA = Morro do Algodão. ** Barra do Una.

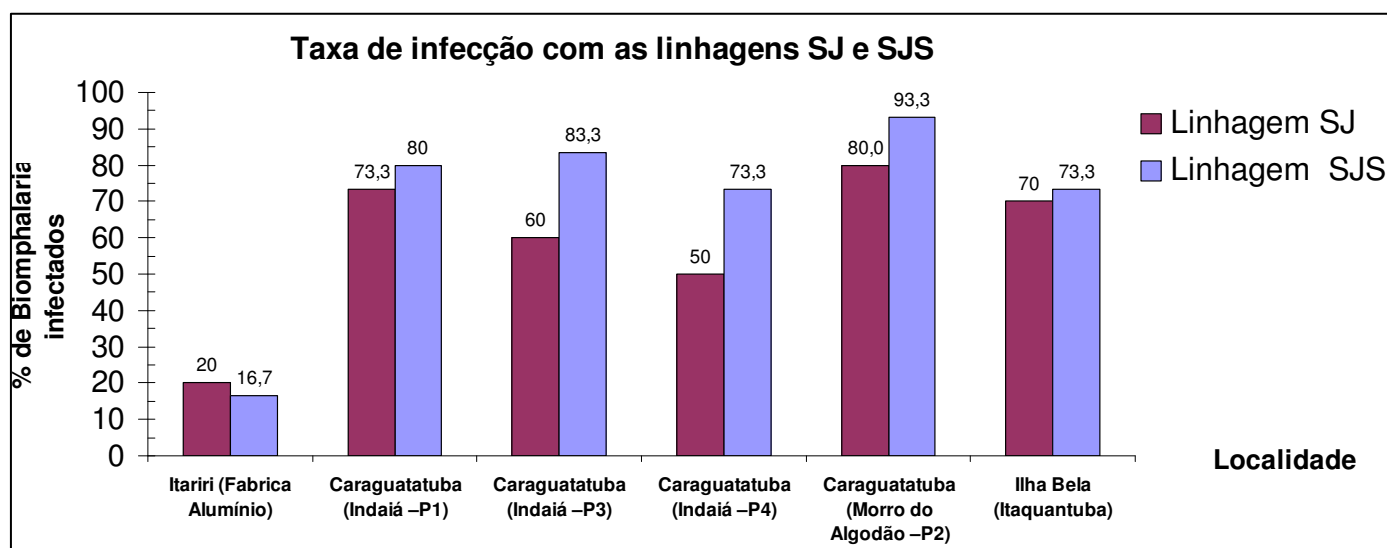


Figura 24 - Taxa de infecção de *Biomphalaria tenagophila* das localidades de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela, expostas às linhagens SJ e SJS.

A taxa de infecção variou de 16,7% (Itariri, Fábrica Alumínio) a 93,3% (Caraguatatuba, Morro do Algodão-P2) para a linhagem SJS e de 20% (Itariri, Fábrica Alumínio) a 80% (Caraguatatuba, Morro do Algodão, P2) para a linhagem SJ (Figura 24). Os espécimes de Caraguatatuba (Travessão) e São Sebastião (Barra do Una) testados com as linhagens SJS e SJ não eliminaram cercárias (Tabela 21)

Caramujos de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela quando expostos às linhagens SJ e SJS começaram a liberar cercárias após 30 dias da infecção, sendo que o período pré-patente estendeu-se até a 6^o a 7^o semanas. Nos caramujos de Caraguatatuba do Morro do Algodão e de Indaia (ponto 4) o período pré-patente prolongou-se até a 9^a semana de infecção, quando expostos à linhagem SJ e SJS, respectivamente. E nos caramujos de Ilha Bela e Caraguatatuba (Indaiá ponto 3) o período pré-patente prolongou até a 12^a semana de infecção, quando expostos à linhagem SJ e SJS, respectivamente (Tabela 21, Figura 25).

Caramujos de Caraguatatuba (Indaiá ponto 3) infectados com a linhagem SJ liberaram cercárias após 40 dias de infecção experimental (6^a semana) e o período pré-patente se prolongou até a 13^a semana após a infecção (86 dias) (Figura 25).

Não observamos liberação de cercárias em *B. tenagophila* dos municípios de Itariri, Ilha Bela, de São Sebastião e de Caraguatatuba expostas às linhagens BH e SE de *S. mansoni* (Tabela 22).

Tabela 22 - Taxa de infecção de *Biomphalaria tenagophila* de Itariri, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilha Bela exposta às linhagens BH e SE de *S. mansoni*.

		Linhagem BH			Linhagem SE			Controle	
<i>B. tenagophila</i>	Localidade	N ^o	Taxa de Infecção (%)	Taxa mortalidade (%)	N ^o	Taxa de Infecção (%)	Taxa mortalidade (%)	N ^o	Taxa mortalidade (%)
Itariri	(Fábrica Alumínio)	30	0	13,3	30	0	26,7	30	56,7
Ilha Bela	(Itaquantuba)	15	0	6,7	15	0	26,7	15	20,0
Caraguatatuba	(Indaiá –P1)	15	0	13,3	15	0	53,3	15	33,3
	(Indaiá –P3)	30	0	30,0	30	0	20,0	30	33,3
	(Indaiá –P4)	15	0	46,7	*	*	*	15	73,3
	(MA** -P2)	15	0	40	15	0	33,3	15	6,7
	(Travessão)	15	0	26,7	15	0	46,7	15	33,3
São Sebastião	(Barra do Una)	30	0	23,3	30	0	70,0	30	26,7

*Não foi possível realizar o experimento por falta de caramujo ** MA = Morro do Algodão.

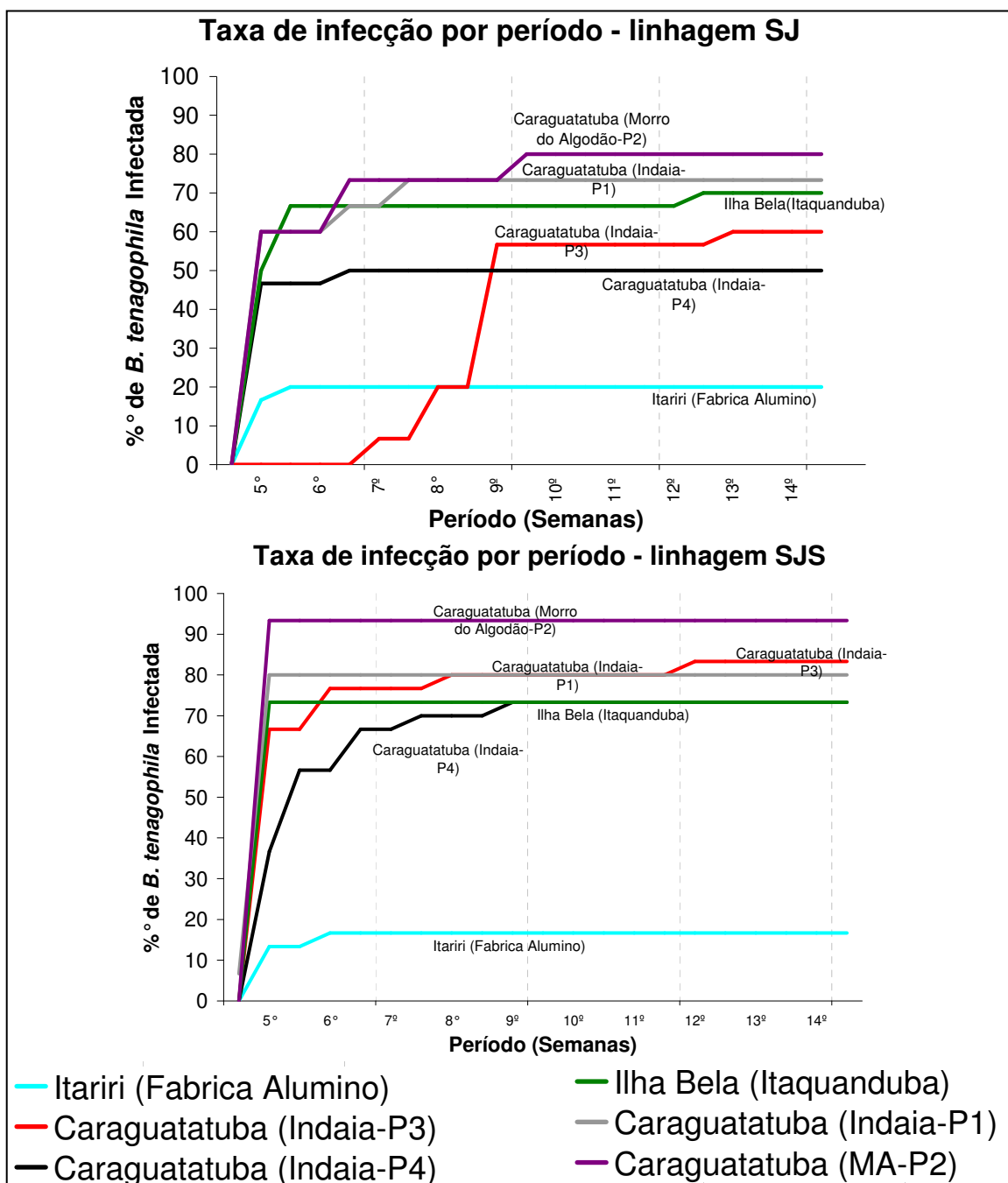


Figura 25 - Taxa de infecção e período pré-patente em *Biomphalaria tenagophila* das localidades de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela infectadas com as linhagens SJ e SJS.

6.4.2. Taxa de mortalidade

A mortalidade dos caramujos infectados com as linhagens SE, BH, SJ e SJS do *S. mansoni* foi acompanhada por 14 semanas após a exposição dos moluscos (Tabelas 21 e 22; Figuras 26 a 28). Em linhas gerais observamos que a mortalidade dos moluscos após a exposição às linhagens SJ e SJS foi maior quando comparada à mortalidade dos caramujos expostos às linhagens SE e BH. Observamos que a maior mortalidade verificada para as linhagens BH, SJS e SJ ocorreram nos caramujos Caraguatatuba Indaiá P4. A linhagem SE provocou maior mortalidade nos caramujos de São Sebastião (Barra do Una) (Figura 26).

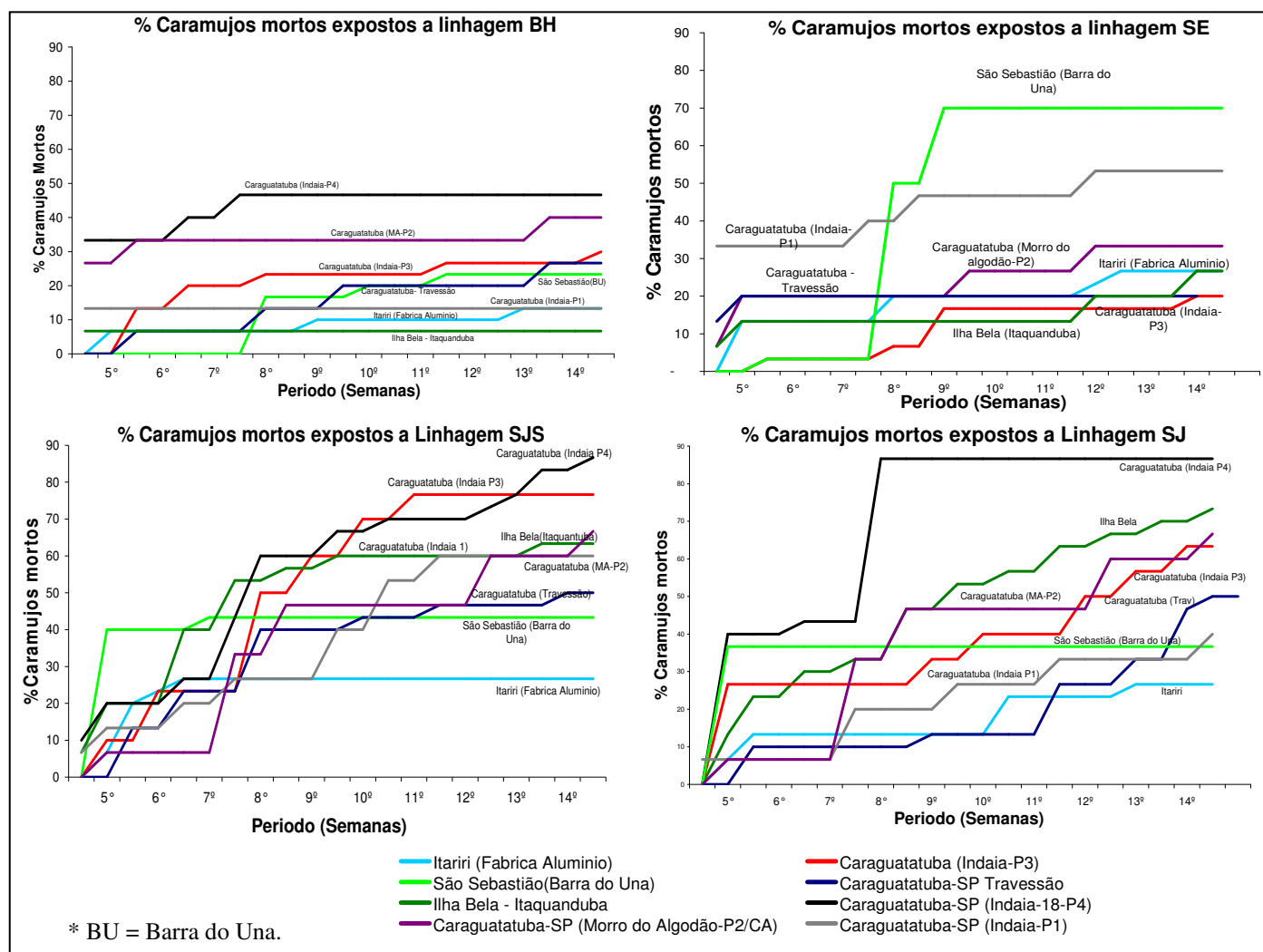


Figura 26 - Mortalidade dos caramujos por semana após a infecção com *Schistosoma mansoni* das linhagens BH, SE, SJ e SJS.

A taxa de mortalidade média dos caramujos expostos à linhagem SE foi de $39,5 \pm 17,9\%$. A taxa de mortalidade média dos caramujos das 8 populações expostas a linhagem BH foi de $25 \pm 13,8\%$ (Figura 27). Observamos que os caramujos expostos a linhagem SE e BH, que não liberaram cercárias de *S. mansoni*, apresentaram mortalidade média de $31,8\%$.

Nos caramujos que apresentaram liberação de cercárias, a taxa de mortalidade foi maior do que nos caramujos que não liberaram. Nas populações de caramujos que foram expostos às linhagens SJ obtivemos uma taxa de mortalidade média de $50,4\% \pm 22,1$; a taxa de mortalidade média para moluscos expostos à linhagem SJS foi de $59,1\% \pm 18,9\%$ (Figura 27).

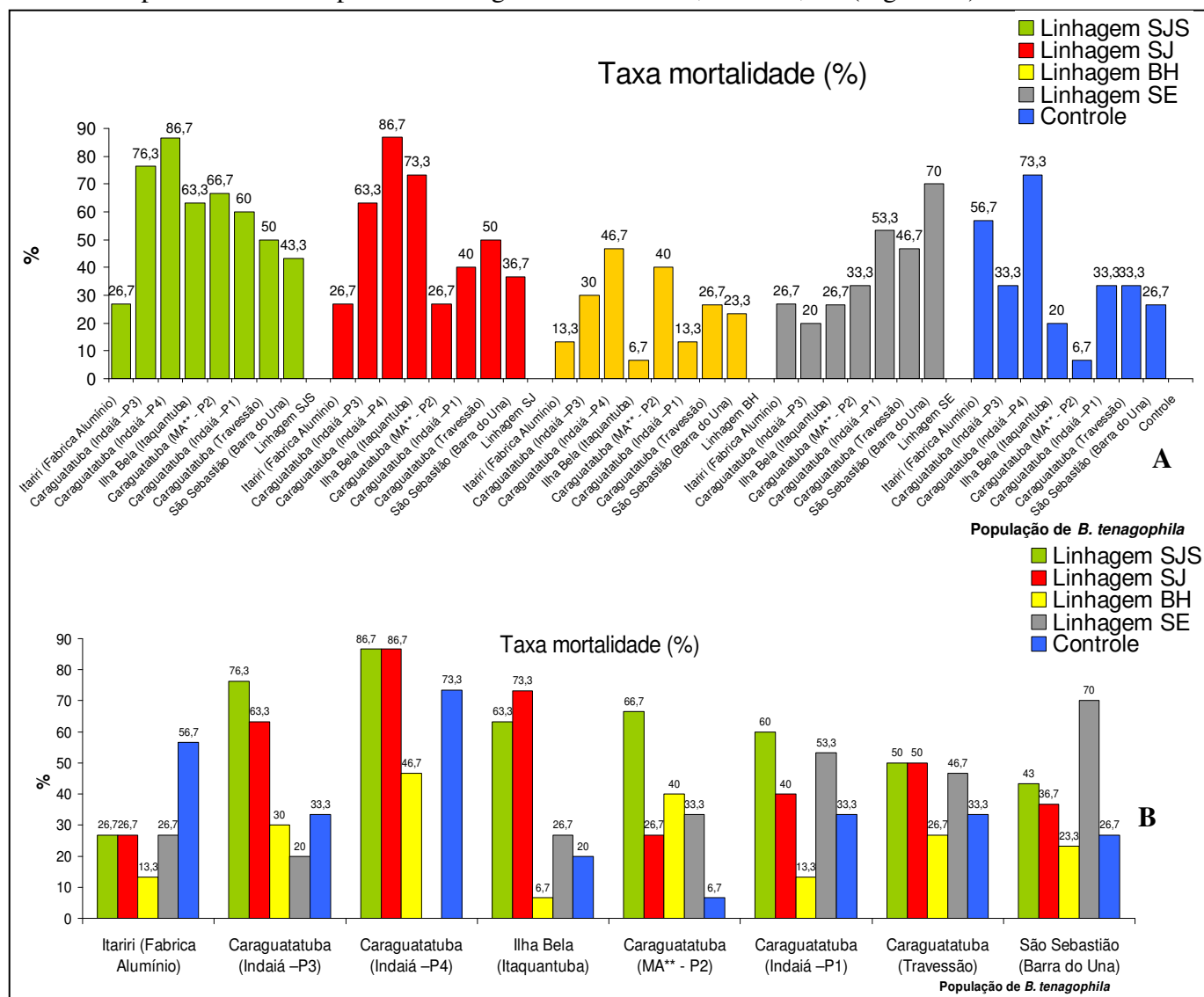


Figura 27 – Taxa de mortalidade dos caramujos após a exposição ao *Schistosoma mansoni* das linhagens BH, SE, SJ e SJS (A) agrupados por linhagem (B) agrupados por localidade.

Os caramujos de Caraguatatuba (Travessão) e São Sebastião expostos às linhagens SJ e SJS, que não liberaram cercárias, apresentaram taxa de mortalidade maior que os caramujos expostos às linhagens SE e BH, que também não liberaram cercárias (Figura 27).

A taxa de mortalidade dos caramujos de Caraguatatuba (Indaiá Pontos 1, 3 e 4 e Morro do Algodão) e de Ilha Bela infectados com a linhagem SJS, foi de 30% a 50% maior do que a taxa de mortalidade dos moluscos de Itariri expostos à mesma linhagem. Os caramujos de Caraguatatuba (Indaiá Pontos 3 e 4) e Ilha Bela expostos à linhagem SJ (Figura 27) apresentaram mortalidade mais elevada que os moluscos de Itariri e de Caraguatatuba (Morro do Algodão - Ponto 2).

Do total de moluscos mortos, foram separados aqueles que morreram liberando cercárias (mortos positivos) e aqueles que não eliminaram cercárias (mortos negativos) (Figura 28).

Na população de caramujos de Caraguatatuba infectados com a linhagem SJS, observamos que a taxa de mortalidade de caramujos que eliminaram cercárias foi maior que a dos caramujos que não liberaram. Em Caraguatatuba, bairro Indaiá (Pontos 1, 3 e 4) e bairro Morro do Algodão (Ponto 2), para a linhagem SJS, a infecção pode ser a causa dos valores de 78%, 82,6%, 73% e 90% respectivamente de mortalidade em caramujos que liberaram cercárias (positivos) em relação ao total de caramujos mortos (Figura 28).

Na população de Ilha Bela exposta à linhagem SJS, a taxa de mortalidade dos caramujos que liberaram cercárias foi de 57,9% (11 caramujos “positivos” mortos e 8 “negativos” mortos), ou seja um pouco maior do que aqueles que não liberaram cercárias.

Nas populações de Itariri expostas à linhagem SJS, a taxa de mortalidade dos moluscos que liberaram cercárias (“positivos”) foi de 37,50%, comparando com a mortalidade dos caramujos que não liberaram cercárias (“negativos”) foi menor (Figura 28).

A taxa de mortalidade dos caramujos de Itariri (Fábrica Alumínio), de Caraguatatuba (Indaiá Ponto 1 e Morro do Algodão, Ponto 2) e de Ilha Bela, expostos à linhagem SJ, e que se apresentaram positivos foi de 62,50%, 83,3% e 75% e 68%, respectivamente (Figura 28).

Para os moluscos de Caraguatatuba (Indaiá Ponto 3) expostos à linhagem SJ observamos 47,37% de taxa de mortalidade dos caramujos “positivos”. Os caramujos de Caraguatatuba (Indaiá Ponto 4) apresentaram taxa de mortalidade dos caramujos positivos de 53,85% (Figura 28).

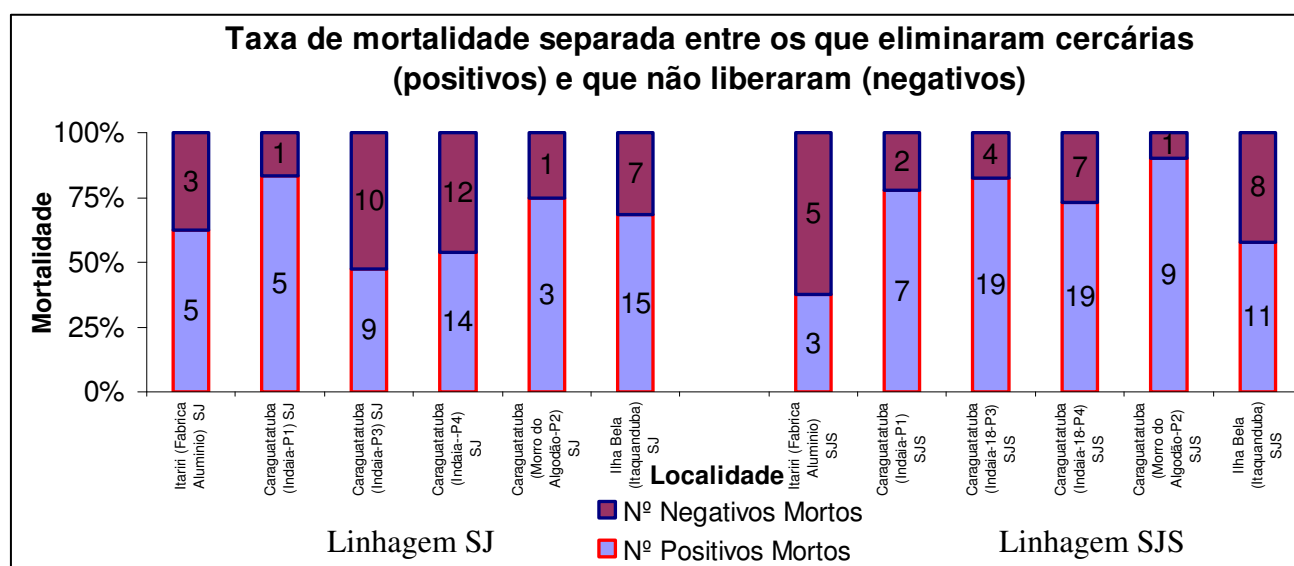


Figura 28 - Taxa de mortalidade de 6 populações de *Biomphalaria tenagophila* de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela infectados com as linhagens SJ e SJS, separados do total de moluscos mortos, aqueles que liberaram (positivos) ou que não liberaram cercárias (negativos).

Nas Figuras 29 e 30 estão demonstrados os dados de suscetibilidade, período pré-patente e mortalidade dos moluscos expostos às diferentes linhagens ao longo das quatorze semanas de infecção.

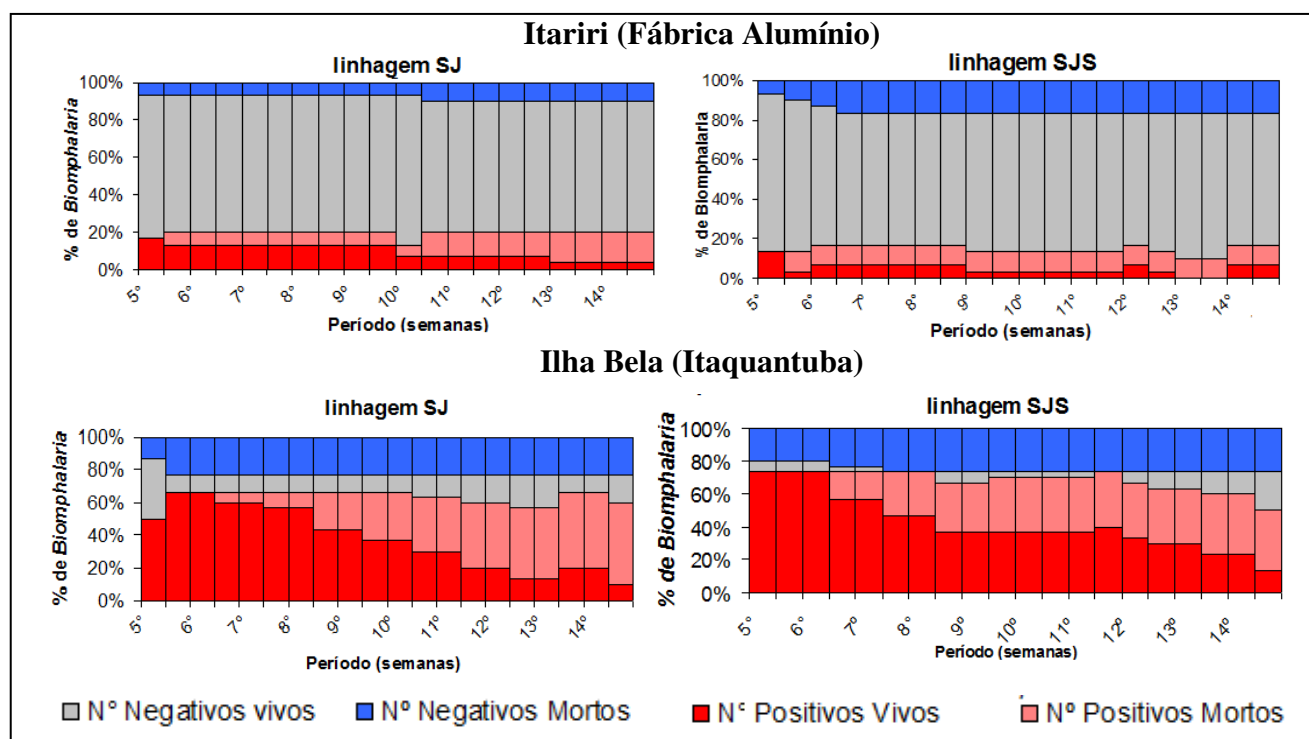


Figura 29 - Taxas de infecção e mortalidade por 14 semanas de *Biomphalaria tenagophila* de Itariri e Ilha Bela, expostas às linhagens SJ e SJS de *Schistosoma mansoni*.

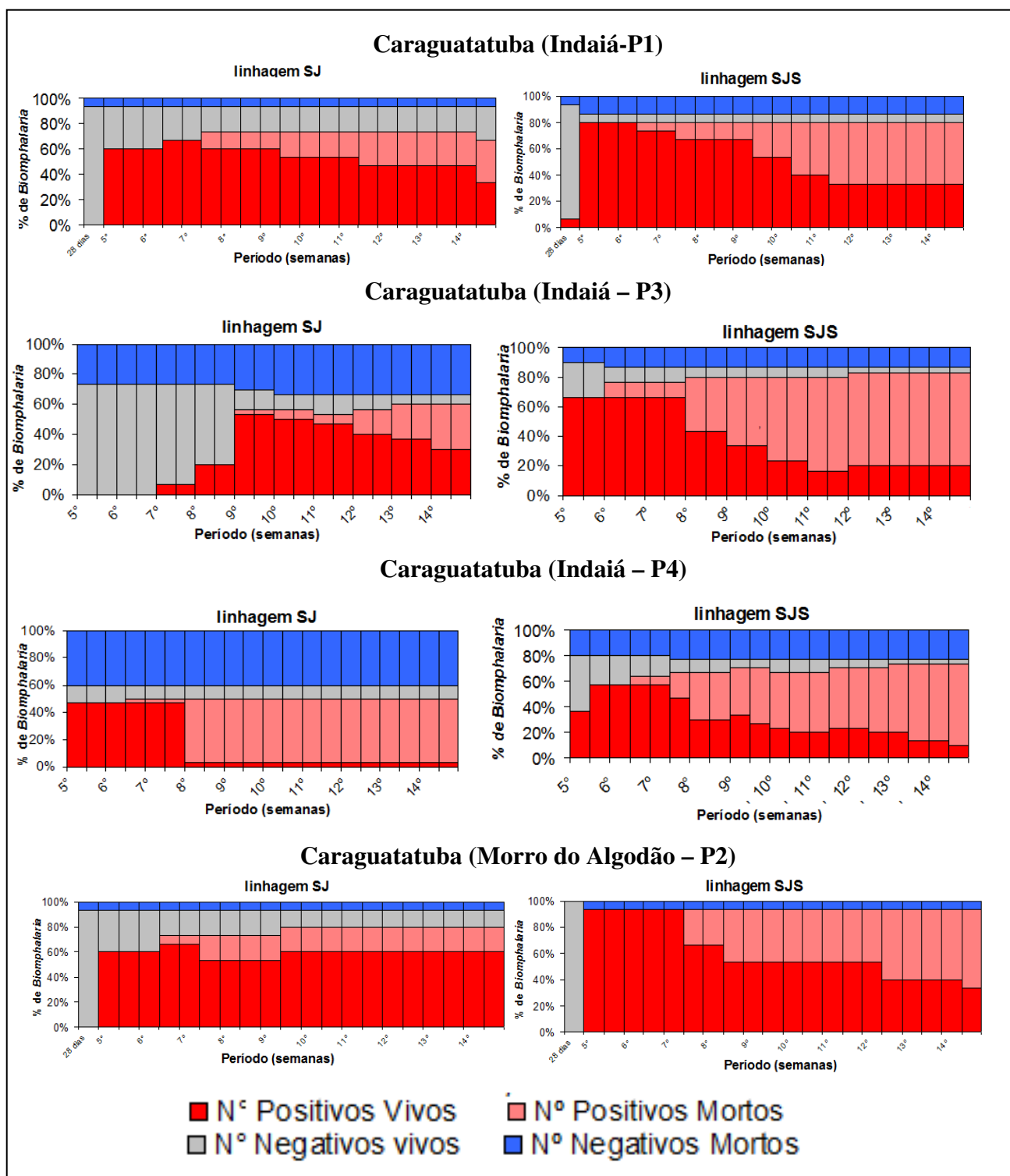


Figura 30 - Taxas de infecção e mortalidade por 14 semanas de *Biomphalaria tenagophila* de Caraguatatuba (Indaiá P1, P3 e P4 e Morro do Algodão P2) expostas às linhagens SJ e SJS de *Schistosoma mansoni*.

7. Discussão e Conclusão

Do total de caramujos do gênero *Biomphalaria* coletados nas coleções de água doce dos Litorais Norte e Sul do estado de São Paulo observamos a predominância de *B. tenagophila*, (84%) sobre *B. straminea* (16%), o que corrobora os dados de distribuição das espécies de caramujos nestas regiões. No município de Ilha Bela, chama a atenção, a alta abundância de *B. straminea* em relação a *B. tenagophila*, o que mostra uma alteração no perfil de distribuição destas duas espécies. Em 1971, poucos exemplares de *B. tenagophila* foram encontrados, em um tanque de jardim (Dias *et al.*, 1971). Em 1996, foram coletados no Bairro de Barra Velha exemplares de *B. tenagophila* e *B. straminea* (Contino, 2004). Em 2003, colonizavam o córrego de Barra Velha, *B. straminea* e *B. tenagophila*, sendo que o número de exemplares de *B. straminea* foi 2 vezes maior (Teles *et al.*, 2003). Em coletas de 2003 a 2005 realizadas pela SUCEN (Relatório da SUCEN, SUCEN, 2005), foi encontrada *B. tenagophila*, em Barra Velha e Itaquanduba. Nossos resultados mostram que atualmente apenas *B. straminea* sobrevive no córrego de Barra Velha (Anexo/Figura XA).

No caso de Caraguatatuba, os resultados corroboram os dados de coleta de caramujos feitos entre 1996 e 2003 (Contino, 2004) e coletas feitas entre 2002 a 2005 (SUCEN, 2005; Relatório da SUCEN cedido pela M. Guimarães) sobre a abundância e manutenção de *B. tenagophila* em córregos de Indaiá, Porto Novo, Morro do Algodão, Rio Claro e Travessão.

Na região do Litoral Sul/Vale do Ribeira, os resultados confirmam que *B. tenagophila* está amplamente distribuída nas coleções de água doce de Itariri, Registro, Juquiá, com registro de *B. straminea* em alguns pontos específicos de Itariri e Registro.

A extensa malha hídrica, composta por córregos e rios conectados entre si, as condições ambientais, a alta pluviosidade, e o fato das áreas baixas da faixa litorânea estarem inseridas em áreas naturalmente inundáveis são fatores que potencializam o risco de expansão de caramujos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*. A porção Norte da faixa litorânea do estado de São Paulo concentra ainda um alto fluxo humano durante o verão, e um crescente potencial de expansão econômica devido ao incentivo à exploração de petróleo, que aumentará o fluxo humano e a densidade populacional. Seria importante incluir o Litoral Norte do estado de São

Paulo às regiões com alto potencial de risco de transmissão de esquistossomose brasileira (Scholte *et al.*, 2012) devido a vulnerabilidade de transmissão da doença.

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditos simultâneos e podem reproduzir-se por autofecundação após drástica redução da população local. Na natureza as populações de *Biomphalaria* se caracterizam pela baixa capacidade de locomoção, favorecendo o fracionamento populacional em pequenos demes, com probabilidade destas sub-populações apresentarem alta homogeneidade genética dentro delas, em função do acasalamento entre animais aparentados (Hoffman *et al.*, 1998, Sire *et al.*, 2001).

Estudos com outros marcadores indicaram que as populações de *B. glabrata* retêm polimorfismo de 15% devido a deriva genética ou a limitada taxa de migração (Mulvey & Vryenhoek, 1982). Reduções populacionais são também fatores relacionados com a diferenciação genética de caramujos em escala macrogeográfica (Arnaud *et al.*, 1999; Langand *et al.*, 1999). Populações de caramujos do gênero *Biomphalaria* estão sujeitas a influencia de gargalos populacionais locais causados por aplicação de moluscidas e alta suscetibilidade aos parasitas, que podem levar a redução da variabilidade genética. São dados que explicam padrões variáveis de polimorfismo genéticos encontrados ao mesmo tempo em populações da mesma espécie de *Biomphalaria* numa mesma área geográfica ou em áreas adjacentes (Hoffman *et al.*, 1998; Tuan & Bortolato, 2001; Tuan & Santos, 2007).

Nas análises feitas para o gene mitocondrial 16S rRNA foi possível verificar a estruturação da espécie *B. tenagophila* em clados diferenciados, com acentuada diferenciação das populações de Registro e Itariri. A amostra de Itariri merece destaque, pois deriva de um dos focos de esquistossomose mais ativos do Vale do Ribeira do Iguape, que ao longo dos anos vem sofrendo modificações pelo uso de Baylucid (moluscicida). Os dados sugerem que algumas das populações de *B. tenagophila* do Litoral Norte podem ter derivado de Itariri. Isto poderia explicar o quadro epidemiológico da esquistossomose em Caraguatatuba que teve um aumento de 1 caso para 68 casos autóctones, entre 1991 e 2010 (Tabela 23).

Tabela 23 - Número de casos autóctones de esquistossomose no Litoral Norte e Vale do Rio Ribeira nos períodos de 1981 a 2010 (CVE, 2008, 2011b).

Município	Períodos			Total
	1981–1990	1991–2000	2001–2010	
Ilha Bela	0	1	2	3
Ubatuba	11	7	8	26
São Sebastião	1	3	45	49
Caraguatatuba	1	33	68	102
Total Litoral Norte	13	44	123	180
Registro	4	2	4	10
Juquiá	22	1	5	28
Miracatu	187	16	24	227
Pedro de Toledo	2787	236	56	3079
Itariri	3598	1027	263	4888
Outros	4	3	22	29
Total Ribeira do Iguaçu	6602	1285	374	8261

A análise de haplótipos mitocondriais do gene 16S rRNA mostra valores menores de divergência genética entre sequências analisadas aos pares do que os valores obtidos para o locus ITS2. A hipótese para explicar este resultado está diretamente relacionada com a prática de autofecundação. Marcadores mitocondriais têm maior probabilidade de reter taxas maiores de polimorfismos genéticos em função da ausência de reparo das bases de DNA. Por outro lado, a autofecundação pode imprimir na descendência um alto grau de homogeneidade genética, devido ao alto grau parentesco entre os caramujos. A autofecundação potencializaria o efeito da herança exclusivamente materna dos genes mitocondriais, reduzindo os valores de diversidade genética entre as sequências de genes mitocondriais. O polimorfismo genético estaria subestimado, pois seriam produzidos por uma única matriz-mãe genômica.

Apesar desta redução dos valores de 16S em relação ao ITS2, observamos o mesmo padrão de distribuição de haplótipos entre as populações analisadas: alta frequência de haplótipos únicos numa mesma população e haplótipos raros em Itariri, Registro e Juquiá.

Na rede de haplótipos é possível verificar que o haplótipo H1 é central e apresenta o maior número de ramos conectados, indicando que este grupo contém sequências com polimorfismo ancestral (Watterson & Guess, 1977). Neste caso, não é possível relacionar as sequências com uma única origem geográfica, pois as sequências ancestrais estão distribuídas em Caraguatatuba, Itariri, São Sebastião, Juquiá e Ilha Bela. Como explicar que uma mesma

sequência ancestral esteja presente nas amostras do Litoral Norte e Litoral Sul? Teria acontecido uma radiação simultânea de linhagens mitocondriais? Sabemos que a população de Ilha Bela, é resultado de colonização recente e da ação do próprio homem. Do ponto de vista lógico, podemos então concluir que a migração passiva dos caramujos seria um fator fundamental na distribuição geográfica destes polimorfismos ancestrais.

Em ITS2 observamos que 45% dos haplótipos estão representados por polimorfismos que aparecem em um único indivíduo dentro de uma mesma localidade. As populações de Juquiá e Registro são, por exemplo, formadas quase que exclusivamente por haplótipos únicos e diferenciados. É preciso lembrar que o Rio Ribeira do Iguape nasce no interior do estado do Paraná e deságua no oceano Atlântico, sendo o único rio do estado de São Paulo que corre em direção ao Atlântico sem conexão com grandes rios de outras bacias. Por causa desta configuração, as coleções de água doce ligadas ao Rio Ribeira do Iguape poderiam ser refúgios naturais de diversidade de *B. tenagophila*.

A taxa de mutação é um valor que depende do tempo de fixação das novas mutações e do número de indivíduos de uma população: quanto menor o tamanho populacional maior a probabilidade de fixação de uma mutação ao acaso (Lynch, 2007). Nossos resultados mostram que, tanto em 16S quanto em ITS-2, o número de mutações fixadas é nulo na maioria das populações analisadas. A experiência na coleta de populações de campo de *B. tenagophila* ensina que os caramujos estão espalhados no espaço geográfico em pequenos agregados populacionais, e não em grandes populações. As taxas nulas de mutação nas populações de Caraguatatuba, São Sebastião, Ilha Bela, as duas primeiras com significativo número de exemplares analisados, podem uma história de colonização recente nestas regiões. Há, no entanto, uma exceção nesta regra: para o gene ITS2 a população de Registro apresenta uma mutação fixada que explica o haplótipo raro, conforme demonstrado na Figura 15.

A hipótese sobre a fragmentação genética de *B. tenagophila* em duas populações distintas havia sido formulada a partir de evidências de diferenciação do gene nuclear ITS2 em escala microgeográfica (Tuan & Santos, 2007) e do gene mitocondrial COI em escala macrogeográfica (Zanna, 2010, Tuan *et al.*, 2012). As análises filogenéticas de *B. tenagophila* baseadas no marcador nuclear ITS2 geraram árvores filogenéticas em que os haplótipos de Registro e Itariri e Juquiá estão agrupadas num mesmo clado. Esta nítida diferenciação genética, não caracteriza, a

princípio, diferenças taxonômicas de *B. tenagophila*, pois os dados morfológicos corroboram que os animais pertencem ao táxon *B. tenagophila*.

Não observamos parasitismo por larvas de *S. mansoni* nos 1635 exemplares de *Biomphalaria* coletados nas coleções hídricas do Litoral Norte e do Vale do Ribeira do Iguape no estado de São Paulo, embora nestas regiões tenha sido relatada a presença de moluscos parasitados e/ou casos autóctones de esquistossomose (Ramos *et al.*, 1969; Teles *et al.*, 2003; Contino, 2004; Sucen, 2005). Este resultado reflete as características biológicas da *B. tenagophila* como hospedeira do *S. mansoni*: a baixa suscetibilidade ao *S. mansoni* quando comparada com a *B. glabrata* (Paraense & Corrêa, 1978) e consequentemente a inconstância na manutenção dos focos de esquistossomose.

A presença do parasitismo por larvas de digenéticos que não o *S. mansoni* em alguns exemplares dos moluscos, indica a presença de uma fauna de vertebrados, hospedeiros definitivos destes trematódeos, oriunda da mata circunvizinha. Segundo Machado *et al.* (1988) moluscos parasitados com larvas de digenéticos podem impedir parcialmente (equinostomocercárias, e distomocercárias com acúleo) ou totalmente (furcocercárias longifurcadas com ocelo ou furcocercárias longifurcadas sem ocelos) o desenvolvimento das larvas de *S. mansoni*.

Das oito populações de *B. tenagophila* testadas para infecção com *S. mansoni*, observamos liberação de cercarias em seis populações e somente quando foram expostas às linhagens SJ e SJS. Os caramujos de Caraguatatuba (Travessão) e São Sebastião (Barra do Una) não se infectaram com as quatro linhagens do trematódeo utilizadas nos testes. Um ajuste fisiológico entre o parasita e o molusco tem sido atribuído por diversos autores (Paraense & Corrêa, 1978) para explicar os diferentes graus de suscetibilidade apresentados pelas diferentes populações de moluscos frente ao *S. mansoni*, sendo o índice de infecção condicionado pela variação na frequência de genes responsáveis pela suscetibilidade e/ou resistência presentes na população do molusco. Para Magalhães (1966) a suscetibilidade representa a aptidão de um molusco com genótipo favorável, frente a um miracídio que apresenta um genótipo pré-adaptado as suas condições.

A suscetibilidade da população de Itariri (Fábrica Alumínio) foi de aproximadamente 20%, quando exposta às linhagens SJ e SJS. Paraense e Corrêa (1978) verificaram taxa de infecção de 91,5%, para *B. tenagophila* de Itariri, distrito de Ana Dias, exposta a 10 miracídios da

linhagem SJ. Figueiredo *et al.* (1992) obtiveram taxa de infecção de 60%, quando a exposição dos moluscos foi frente a linhagem simpátrica. Posteriormente, Guimarães (2007) obteve taxa de infecção de 58,8% em testes experimentais com moluscos de Itariri e a linhagem SJ. Os índices de infecção natural da *B. tenagophila* em Itariri, Distrito de Ana Dias, relatados por Ramos *et al.* (1969) para o período de 1953 a 1969 foi de 3,7% a 51,3%. Figueiredo *et. al.* (1992) obtiveram para os moluscos de Itariri, expostos a linhagem simpátrica do *S. mansoni*, período pré-patente de 55 dias a 71 dias. Guimarães (2007) verificou período pré-patente de 49 dias a 58 dias, quando os moluscos de Itariri foram expostos a linhagem SJ. Neste trabalho, o período pré-patente foi de 30 dias para os caramujos de Itariri, Caraguatatuba e Ilha Bela, a exceção dos caramujos de Caraguatatuba (Indaiá Ponto 3) cujo período pré-patente foi de 40 a 86 dias. O período pré-patente de caramujos de Itariri e Ilha Bela prolongou-se até 37 e 81 dias, respectivamente.

No município de Caraguatatuba, no Bairro Olaria, em condições naturais *B. tenagophila* apresentou taxa de infecção de 6,6% (Teles *et al.*, 2003). No bairro Porto Novo foram coletados exemplares infectados naturalmente por *S. mansoni* em 2003, 2004 e 2005 (Tabela 24) (Contino, 2004; SUCEN, 2005). Os exemplares coletados por nós em 2010 e 2012, não estavam infectados.

Tabela 24 - Distribuição de *Biomphalaria tenagophila* examinadas e positividade para *S. mansoni* no período de 2001 a 2005, no Litoral Norte. (SUCEN, 2005; Relatório da SUCEN cedido pela M. Guimarães).

Município	Localidade	2001	2002		2003		2004		2005	
		Bt	Bt(+SM)	%	Bt (+SM)	%	Bt (+Sm)	%	Bt(+SM)	%
Caraguatatuba	Jardim Porto Novo				520 (3)	0,6	574(14)	2,4	157(1)	0,6
	Bairro Tinga				145(2)	1,4	345		103	
	Bairro Indaia				282(2)	0,7	648(3)	0,5	118	
	Bairro Rio Claro				60		375		6	
	Bairro Travessão				18		521		113	
	Bairro Poyares				25		156		32	
	Bairro Casa Branca	59	110(3)	2,7	141		1280(2)	0,2	185	
Ilha Bela	Barra Velha				197		335		94	
	Itaquanduba				102(10)	9,8	1173(4)	0,3	229	
São Sebastião	Bairro Jaragua				107		476		178	
	Bairro Enseada				845		1737		193	
Ubatuba	Bairro Sesmarias				41		265		56	
Total		59	110(3)	2,7	2483(17)	0,7	7885(23)	0,3	1464(1)	0,1

Bt=*B. tenagophila*; +Sm= Exemplares eliminando cercárias de *S. mansoni*. Fonte – Sucen – Sr03

A infecção experimental de *B. tenagophila* de Caraguatatuba do bairro de Indaiá mostrou taxa de infecção de 50% a 73,3% após a exposição à linhagem SJ e 60 a 76,7%, quando a exposição foi pela linhagem SJS. Altas taxas de infecção foram verificadas nos caramujos de Caraguatatuba no bairro Morro do Algodão: 80% para a linhagem SJ e 93,3% para a linhagem SJS. Embora casos autóctones de esquistossomose tenham sido relatados no período de 1997 a 2003, em Caraguatatuba, Morro do Algodão (7 casos autóctones em 1998, 2002 e 2003, Contino, 2004), para o mesmo período não foram encontrados moluscos parasitados com cercárias de *S. mansoni*. Para o bairro Indaiá além do caso autóctone, (1 caso autóctone em 1999) foram encontradas em 2003 e 2004, *B. tenagophila* naturalmente parasitada por *S. mansoni* (Contino, 2004; SUCEN, 2005-Tabela 24).

Exemplares de *B. tenagophila* e *B. straminea* foram coletados por Teles *et al.* (2003) em Ilha Bela, bairro Barra Velha não estavam naturalmente infectados. Neste trabalho coletamos apenas *B. straminea*, que também não estavam infectadas. Na localidade de Ilha Bela, (Barra Velha) foram encontrados 2 casos autóctones em 1999 (Contino, 2004), e em 2003, houve o relato de 10 exemplares de *B. tenagophila* parasitados por *S. mansoni* (Contino, 2004). O bairro de Barra Velha é próximo ao bairro Itaquantuba, onde coletamos apenas a espécie *B. tenagophila*, que apresentou alta taxa de infecção experimental (70% para a linhagem SJ e 73,3% para a linhagem SJS). Em 2003 e 2004 no bairro Itaquantuba foi encontrada *B. tenagophila* naturalmente infectada por *S. mansoni* (SUCEN, 2005 - Tabela 24).

Essa alta taxa de infecção dos caramujos do Litoral Norte (Caraguatatuba e Ilha Bela), que demonstra uma grande adaptação do molusco à linhagem do parasita, pode em hipótese, estar relacionada com a proximidade ao Vale do Rio Paraíba, de onde a linhagem SJ se originou. Corroborar com esta hipótese, os resultados obtidos por Tuan *et al.*, (2012) que verificaram que as sequências moleculares dos moluscos de Caraguatatuba, estavam mais próximas às sequências observadas nos moluscos do Vale do Rio Paraíba.

Os resultados dos testes de suscetibilidade das oito populações de *B. tenagophila* provenientes de Caraguatatuba (Indaiá Ponto 1, Ponto 3, Ponto 4 e Morro do Algodão Ponto 2) e de Ilha Bela (Itaquantuba), que apresentaram taxas de infecção mais elevadas em comparação com os moluscos de Itariri, localizado na bacia do Vale do Ribeira do Iguape, corresponderam a uma elevação do número de casos autóctones no Litoral Norte e a observação de uma redução do

número de casos de esquistossomose na região do Vale do Ribeira do Iguape (Tabela 23, Figura 31).

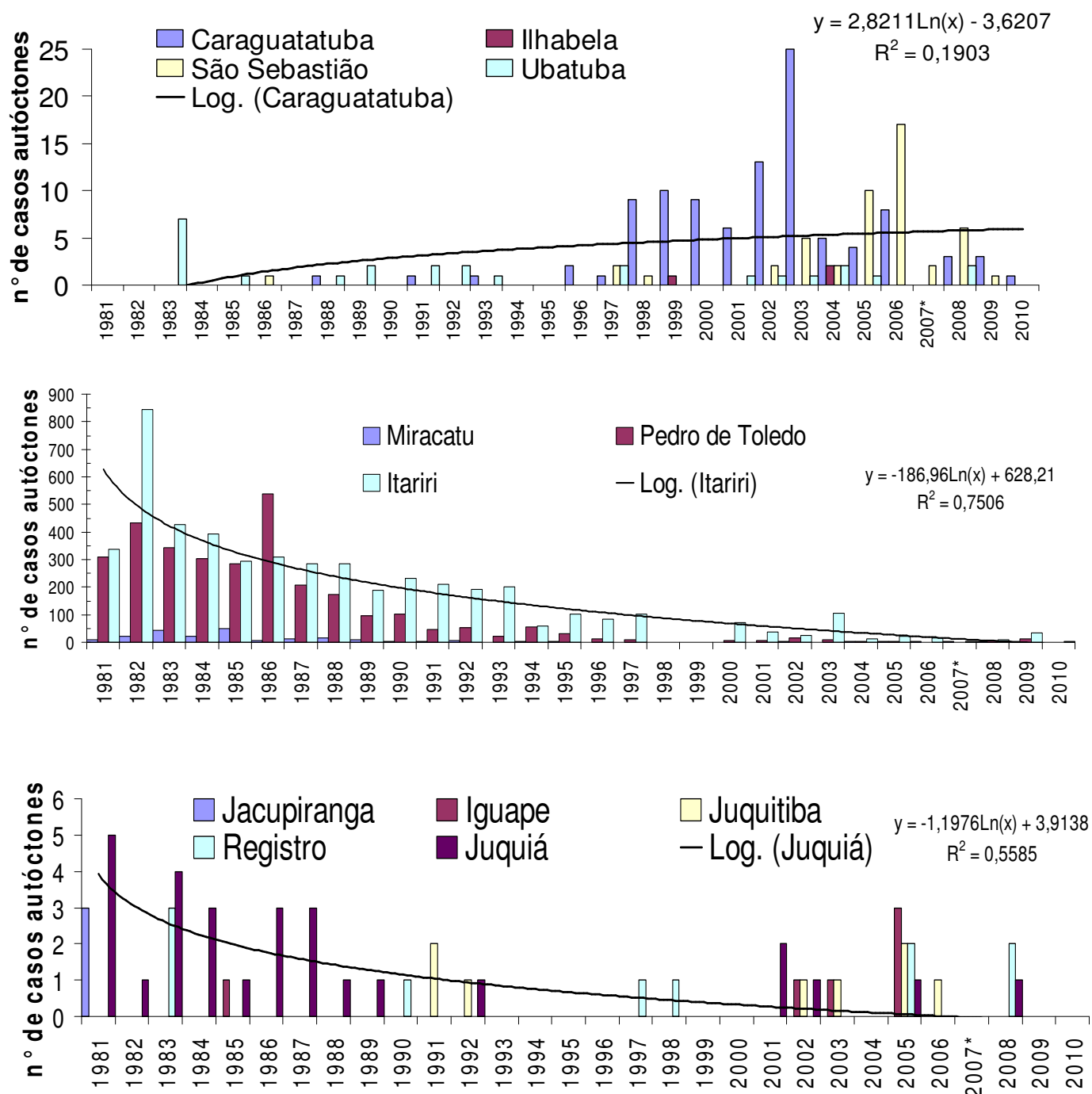


Figura 31 - Distribuição de casos autóctones de esquistossomose, por ano de notificação por municípios, do Litoral Norte e Vale do Ribeira do Iguape, 1981 a 2010 (CVE, 2008, 2011b).

Os caramujos de Caraguatatuba (Travessão) e São Sebastião (Barra do Una) não foram suscetíveis às linhagens de *S. mansoni* testadas. Observamos que o ponto Travessão de Caraguatatuba está na divisa de São Sebastião. Teles *et al.*, (2003) e Sucen (2005) coletaram *B. tenagophila* em São Sebastião (Bairro Enseada), que não estavam naturalmente infectados por *S. mansoni*, assim como os caramujos coletados em Caraguatatuba (Travessão) (Tabela 24) (Coutinho, 2004; Sucen, 2005). Entretanto, Coutinho (2004) relatou casos autóctones em São Sebastião (Enseada).

Os resultados deste trabalho mostram que todas as populações testadas foram resistentes às linhagens BH e SE mantidas em laboratório em *B. glabrata* simpátricas. Paraense & Corrêa (1963) verificaram resistência à infecção em *B. tenagophila* do Vale do Rio Paraíba exposta a 20 e 100 miracídios da linhagem BH. Em estudo da susceptibilidade de 20 diferentes populações de *B. tenagophila*, Paraense & Corrêa (1978) observaram também resistência à infecção pela linhagem BH.

Em relação a esquistossomose, a doença foi introduzida no estado de São Paulo no século dezoito e disseminada em função dos processo de agricultura e urbanização (Silva, 1985). A história evolutiva da *B. tenagophila* no estado de São Paulo é, contudo muito mais antiga do que a distribuição da doença. De fato a expansão populacional humana contemporânea de *B. tenagophila* constitui um risco à disseminação do parasita. Qual seria o efeito da diferenciação genética dos caramujos aqui diagnosticada no potencial de desenvolvimento do parasita? As diferenças genéticas e evolutivas poderiam apressar ou retardar o nível de interação entre parasita-hospedeiro? A região do Ribeira do Iguape, por exemplo, mostra um quadro atual que pode ser considerado de baixa transmissão da esquistossomose e, nesta região, Juquiá e Registro somam o menor número de casos autóctones identificados numa série histórica de 1981 a 2010, (Tabela 23) (CVE, 2008, 2011b).

Os resultados sugerem haver uma relação positiva entre a suscetibilidade ao *S. mansoni* e a redução da variabilidade genética nas populações de caramujos testadas, uma vez que as maiores taxas de suscetibilidade de caramujos estão associadas aos menores índices de diversidade genética do gene 16S rRNA. Nas populações com alta diversidade genética, Travessão (Caraguatatuba) e Barra do Una (São Sebastião), não houve eliminação de cercárias por estes caramujos (Tabela 25).

Tabela 25 - Comparação entre os índices de diversidade genética para o gene 16S rRNA das populações de Travessão, Indaiá e Morro de Algodão, Barra do Una e Fábrica Alumínio com as taxas máximas (%) de suscetibilidade às linhagens de *S. mansoni* testadas neste estudo. (h= número de haplótipos, Hd= diversidade gênica, π =diversidade de nucleotídeos, k= número médio de diferenças de nucleotídeos entre as sequências)

População testada	Parâmetros genéticos					% de caramujos suscetíveis	
	N	h	Hd	π	K	SJ	SJS
Travessão (Caraguatatuba)	5	3	0,700	0,00392	1,200	0	0
Barra do Una (São Sebastião)	2	2	1,0000	0,00654	2,000	0	0
Fábrica Alumínio (Itariri)	3	2	0,667	0,00436	1,333	20,0	16,7
Itaquantuba (Ilha Bela)	2	1	0,0000	0,0000	0,000	70	73,3
Morro do Algodão (Caraguatatuba)	5	2	0,600	0,00392	1,200	80,0	93,3
Indaiá (Caraguatatuba)	8	2	0,429	0,00280	0,857	*61,1	*78,9

* Média de Indaiá ponto 1, 3 e 4.

Os resultados com ambos os marcadores convergem ao identificar duas populações geneticamente distintas cuja distribuição pode estar relacionada com diferentes paisagens biogeográficas (Tuan *et al.*, 2012), com a transmissão da esquistossomose e às sucessivas aplicações de moluscidas. Parasitas e moluscidas causam flutuações populacionais drásticas, constituindo um “*bottleneck*” genético determinante para a fragmentação de populações naturais.

O modelo que relaciona homogeneidade genética à maior vulnerabilidade dos hospedeiros a infecção é conhecido como efeito de monocultura. Devido a alta homogeneidade genética de seus indivíduos, as monoculturas são mais vulneráveis à redução populacional por patógenos. Por outro lado, a diversidade genética de hospedeiros de parasitas funcionaria como um tampão que agiria na prevenção da infecção (King & Lively, 2012). As populações de *Biomphalaria tenagophila* estão sujeitas a reduções populacionais naturais severas e cíclicas. As populações contemporâneas de *B. tenagophila* são em muitos casos resultados também da intensiva aplicação de moluscidas químicos. Nestes casos, a autofecundação seria o modo de reprodução efetivo. Somados os dois eventos - “*bottleneck*” mais autofecundação - haveria uma significativa redução na variabilidade genética, aumentando o risco de infecção dos hospedeiros por *S. mansoni*. Ao propor que o maior risco de transmissão da esquistossomose esteja relacionado às populações de

caramujos com um padrão genético mais homogêneo, estamos propondo também que a aplicação de moluscicidas em longo prazo, agiria a favor da própria manutenção da esquistossomose. Ao incrementar a homogeneidade genética das populações de caramujos, as medidas de controle químico estariam aumentando as chances de um mesmo local manter o ciclo do *Schistosoma mansoni*. Em assim sendo, o saneamento básico seria o meio mais importante e efetivo para o controle da esquistossomose mansonica.

8. Considerações Finais

A análise das sequências do gene mitocondrial 16S rRNA mostra que dentro de uma mesma faixa geográfica, a espécie *Biomphalaria tenagophila*, apresenta nível significativo de heterogeneidade genética. Em escala microgeográfica, as populações de *B. tenagophila* do Litoral Sul do estado de São Paulo são mais heterogêneas entre si do que as populações do Litoral Norte de São Paulo. Esta estruturação em escala microgeográfica pode decorrer da migração de um número reduzido de caramujos, e da colonização por meio da autofecundação como modo de reprodução preferencial, com consequente efeito da deriva genética ao nível local.

Caramujos da espécie *B. tenagophila* de coleções de água doce de São Sebastião e Ilha Bela são próximos geneticamente da população de *B. tenagophila* de Itariri, esta última com alta adaptação ao *Schistosoma mansoni*.

Os resultados moleculares dos genes 16S e ITS2 convergem, pois inferem haplotipos únicos e distintos para caramujos de Juquiá e Registro.

A análise das sequências do gene nuclear ITS-2 confirmam dados anteriores que indicam a possibilidade da estruturação da espécie *B. tenagophila* em duas subespécies geneticamente distintas.

As taxas de infecção experimental de *B. tenagophila* de Caraguatatuba e Ilha Bela por linhagens simpátricas do *S. mansoni* confirmam a alta adaptabilidade entre parasita e hospedeiro de uma mesma origem geográfica. A alta mortalidade de *B. tenagophila* de Caraguatatuba e Ilha Bela após infecção com o parasita sugerem adaptação recente entre hospedeiro e parasita.

Existe uma relação inversa entre o nível de diversidade genética dos caramujos e a distribuição de casos de esquistossomose na região estudada. A manutenção da transmissão da esquistossomose em áreas endêmicas pode ser resultado da homogeneização genética de *B. tenagophila*. As inúmeras aplicações de moluscicidas químicos causam um decréscimo populacional, e consequentemente a colonização destas áreas por caramujos derivados de autofecundação, o que reduz a heterogeneidade genética das populações da espécie. Por este motivo, seria contraindicada a aplicação de moluscicidas químicos para o controle da esquistossomose. Medidas de saneamento básico deveriam prevalecer como medidas de controle da doença.

9. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, F.F.M. de & CARNEIRO, C.D.R. **Origem e evolução da Serra do Mar**. Revista Brasileira de Geociências. v. 28, n. 2, p. 135-150. 1998.
- AMORIM, J.P. **Infecção experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni*** [nota prévia]. *Rev. bras. Malar.* **5**:219-22, 1953.
- ARANTES, A. **Sobre 2 casos de schistosomose autóctone em Santos**. An. Paulista Medicina e Cir., 14 (9): p 95-96. 1923.
- ARNAUD J-F; MADEC L & DAGUZAN J. **Spatial differentiation of allozyme frequencies in a subdivided population of the land snail *Helix aspersa***. J Moll Stud 65: 267–271. 1999.
- AVISE, J.A.; ARNOLD, J; BALL, R.M; BERNINGHAM, E; NEIGEL, J.E; REEB, C.A. & SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylo-geography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Rev. Ecol. Syst.** **18**: 489-522, 1987.
- AVISE, JC. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, Chapman and Hall, New York (NY); p. 511.1994.
- BARATA, R.B. **Cem anos de endemias e epidemias**. Ciênc. saúde coletiva. vol.5, n.2, pp. 333-345. 2000.
- BARBOSA, J.P.M. **Caracterização do regime pluviométrico do litoral do estado de SP segundo repartições propostas por monteiro (1973)**. XVII Simp. Brás. de Rec. Hídricos. Disponível em:<<http://www.abrh.org.br/novo/xviisimpbrasrechidricsaopaulo013.pdf>>. 2007.
- BASTOS, O.C. **Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humanas e silvestres do *Schistosoma mansoni*** Sambon, 1907. São Paulo, [Dissertação de Mestrado — Instituto de Biologia da UNICAMP]. 1975.
- BUCKLING, A; KASSEN, R; BELL, G. & RAINEY, P.B. **Disturbance diversity in experimental microcosms**. Nature, 408(6815): p 961-964. 2000.
- CALDEIRA, R.L; VIDIGAL, T. H; PAULINELLI, S. T; SIMPSON, A. J. & 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. Oswaldo Cruz [online], vol.93, suppl.1, pp. 219-225. 1998.
- CALDEIRA, R.L; VIDIGAL, T. H; MATINELLA, L; SIMPSON, A. J. & CARVALHO, O. S. **Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of internal transcriber spacer of the RNA ribosomal gene**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. vol.95, n.2, pp. 171-177. 2000.
- CALDEIRA, R.L; JANNOTTI-PASSOS, L.K; LIRA, P.M. & CARVALHO, OS. **Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. vol.99, n.5, pp. 499-502. 2004.
- CARNAVAL, A. C; MORITZ, C; HICKERSON, M; HADDAD, C. & RODRIGUES, M. **Stability predicts diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot**. Science, Vol. 323, No. 5915, pp.785-789. 2009.

CARVALHO, O. S. & CALDEIRA, R. L. **Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte: Centro de pesquisas René Rachou/Fiocruz, 1 CD. (Série Esquistossomose; n.6). 2004.

CARVALHO, O.S; JANNOTTI-PASSOS, L.K. & CALDEIRA, R.L. **Importância Epidemiológica e Biologia Molecular Aplicada ao Estudo dos moluscos de gênero *Biomphalaria***. In OS Carvalho, PM Zech Coelho, HL Lenzi (eds.), *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p 311-346. 2008a.

CARVALHO, O.S; AMARAL, R.S; DUTRA, L.V; SCHOLTE, R.G.C. & GUERRA, M.A.M. **Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil**. In OS Carvalho, PM Zech Coelho, HL Lenzi (Eds.), *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p 395-418. 2008b.

CASTRO, L.M.F.B. **Mudança climática, riscos e vulnerabilidade: um estudo dos eventos ocorridos em 1967 e 1996 na planície litorânea de Caraguatatuba/SP**. CLIMEP – Climatologia e Estudos da Paisagem. Rio Claro, SP. Disponível em: <http://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/climatologia/index>. Vol.6 , n.1-2, p. 30. 2011.

CBH LN, Comitê da bacia hidrográfica do Litoral Norte. **IPT / Plano bacia hidrográfica do Litoral Norte, Fundamentação da Cobrança pelo Uso da Água – UGRHI 03 – Litoral Norte**, Disponível em: <<http://www.cbhln.com.br>>. 2010.

CBH LN, Comitê da bacia hidrográfica do Litoral Norte. **Mapa Bacias Hidrográficas do Litoral Norte - UGRHI 03**. Sistema de Projeção: UTM - datum SIRGAS, [Dowloading-Mapa] Disponível em: http://www.cbhln.com.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=23&Itemid=26. 2011.

CBH-RB, Comitê da bacia hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul, **Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da UGRHI 11, SIG-RB - Sistema de Informações Geográficas da Bacia do Ribeira de Iguape e Litoral Sul** [Relatório Situação-2007]. Disponível em: http://www.sigrb.com.br/app/pdf/Rel_de_%20Situacao_RB_%202007.pdf. 2007.

CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas de Climáticas Aplicadas à Agricultura. **Unicamp. Clima dos municípios Paulistas**. Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_269.html. Acessado em: 2013.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL- **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo –2005**. São Paulo. (Série Relatórios). Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua>. 2006.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de águas interiores do estado de São Paulo de 2008, p 317**. Acesso em: Abril de 2010. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp. 2008.

CHAN, C.H.C; CALVALCANTI, I.F.A; VENDRAME, I; SATYAMURTI, P; MACHADO, L.A; NOBRE, C; TOMASELLA, J. & LOPES, E. **Estudo da previsibilidade de eventos meteorológicos extremos na serra do mar. Relatório Final.** INPE, ITA, IPT, UFRJ, UNICAMP. Disponível em: serradomar.cptec.inpe.br/~rserra/pdf/Relatorio_Final.pdf. 2009.

CHIEFFI, P.P. & WALDMAN, E.A. **Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no estado de São Paulo, Brasil.** *Cad. Saúde Pública* [online]. vol.4, n.3, p. 257-275. 1988.

CLEMENT, M; POSADA, D. & CRANDALL, K.A. **TCS: A computer program to estimate gene genealogies.** *Mol Ecol*; 9: p 1657-1659. 2000.

COLEMAN, A.W. **ITS-2 is a double-edged tool for eukaryote revolutionary comparisons.** *Trends Genet.* 19 (7): 370-5, 2003.

CONTINO, M.L. **Foco de esquistossomose – Litoral Norte do estado de São Paulo – Nobembro 2003,** Sucen - SR-03 - Taubaté , Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA) , Ano 1 Número 1, pp 9. 2004.

CSAN – Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos de São Paulo. **Planos Integrados Regionais De Saneamento Básico Para As Unidades De Gerenciamento De Recursos Hídricos Da Serra Da Mantiqueira, Paraíba Do Sul E Litoral Norte – UGRHI's 1, 2 e 3.** Prefeitura de Caraguatatuba. Disponível em: www.caraguatatuba.sp.gov.br. 2011.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Normas e Instruções, [Documento técnico].** 2007.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Esquistossomose - [Dados estatísticos].** São Paulo, Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. 2008.

CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Esquistossomose. II Semana da Esquistossomose – [Documento Técnico].** São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>, 2010.

CVE-CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Trans. Hídrica e Alimentar. **Esquistossomose. III Semana da Esquistossomose [Documento Técnico].** SP. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>, 2011a.

CVE-CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Esquistossomose [Dados estatísticos, 2008-2010].** SP, Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/esquistodados.html>, 2011b

DAEE, Portal do Departamento de Água e energia Elétrica, Governo do estado de São Paulo. **Banco de dados pluviométricos.** Disponível em: <http://www.daee.sp.gov.br> ou http://geolig.igc.usp.br/geoproc/rs_ugrhi_rb/app/RS-5_2_1_DisponibilidadeH%EDdricar_pag276_280.pdf. Acesso em: 2013.

- DE JONG, R.J; MORGAN J.Á; PARAENSE W.L; POINTIER J.P; AMARISTA M & AYEHE-KUMI, P.F. **Evolutionary relationships and biogeography of Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke; *Schistosoma mansoni*.** Mol Biol Evol; 18: p 2225-2239. 2001.
- DE JONG, R.J; MORGAN, J.Á; WILSON, W.D; AL-JASER, M.H; APPLETON, C.C & COULIBALY, G. **Phylogeography of Biomphalaria glabrata and Biomphalaria pfeifferi, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics.** Mol Ecol; 12: p 3041-3056. 2003.
- DESLANDES, N. **Técnica de dissecação e exame de planorbídeos.** Rev. Serv. Espec. Saúde Publica, 4(2):p 371-382. 1959.
- DEANE, M.P. **Adolfo Lutz, helmintologista.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 15, n. 73, 1955.
- DIAS, L.C.S; CAMARGO, M.E; HOSHINO-SHIMIZU, S; RAMOS, A.S; PIZA T.J. & SILVA L.C. **Inquéritos populacionais de esquistossomose mansoni por técnicas sorológicas de imunofluorescência e de hemaglutinação.** Rev Inst Med Trop São Paulo 13: 37-44. 1971.
- EDUARDO, M.B.P; SOUZA, D; CIARAVOLO, R.M.C; KANAMURA, H.Y; GARGIONI, C. & FALCÃO, A.C.M.G. **Esquistossomose Mansônica no estado de São Paulo: Aspectos Epidemiológicos.** Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa). Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Ano 2, N° 18, p 2-8. 2005.
- FEASEY, N; WANSBROUGH-JONES, M; MABEY, D. C. W. & SOLOMON, A. W. **Neglected tropical diseases.** Published Online. Disponível em: <http://bmb.oxfordjournals.org/>. British Medical Bulletin. 93: 179–200. 2009.
- FIGUEIREDO, A.C; DIAS, L.C.de S. & MARQUES, E.H. de F. **Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil: I - susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* snail to sympatric *S. mansoni* strain.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo[online]. vol.34, n.3, pp. 199-203. 1992.
- GLICK, B.R. & PASTERNAK, J.J. **Principles and applications of recombinant DNA.** ASM, Washington DC, p. 683, 1998.
- GUIMARÃES, M.C.A. **Avaliação de controle e vigilância do hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Ribeira, e Observações do seu parasitismo** [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. 2007.
- GUIMARÃES, M.C.A. MUNIZ, C; TAKAHASHI, F.Y; OHLWEILER, F.P; KAWANO, T. & NATAL, D. **The effects of the experimental infection from a focus of transmission of *Schistosoma mansoni* in a population of *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) in the region of "Vale do Ribeira de Iguape", Brazil.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]. vol.52, n.2, pp. 101-105. 2010.
- HALL, T.A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl Acids Symp Ser 41:p 95-98. 1999.

- HASEGAWA, M; KISHINO, H. & YANO, T. **Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA.** Journal of molecular evolution, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.
- HILLIS, D.M. & DIXON, M.T. **Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference.** Q. Rev. Biol. 66: 411-53, 1991.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C. & MABLE, B.K. **Molecular Systematics.** Massachusetts: Sinauer Associates, 655 p. 1996.
- HOFFMAN, J.I; WEBSTER, J.P; NDANBA, J. & WOOLHOUSE, M.E.J. **Extensive genetic variation revealed in adjacent populations of the schistosome intermediate host *Biomphalaria pfeifferi* from a single river system.** Ann. Trop. Med. Paras., 92: 693-698. 1998.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. **MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny.** Bioinformatics 17: p 754-755. 2001.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Sistemas de Informações Territoriais.** Acesso em: outubro de 2009. Disponível em: <<http://sit.mda.gov.br/territorio.php>>. 2007.
- IPT, Instituto de Pesquisa Tecnológica. **Plano de Gerenciamento dos Recursos Hídricos do Litoral Norte [RELATÓRIO NO 57.540],** Disponível em: <http://www.fflorestal.sp.gov.br/media/uploads/bertioga/Legislacao/Plano%20de%20Bacia%20Hidrografica%20LN/PLANOD~4.PDF>. Acessado em: 2013. 2001.
- JANNOTTI-PASSOS, L.K; MAGALHÃES, K.G; CARVALHO, O.S. & VIDIGAL, T.H.D.A. **Multiplex PCR for both Identification of Brazilian Biomphalaria Species (Gastropoda: Planorbidae) and Diagnosis of Infection by Schistosoma mansoni (Trematoda: Schistosomatidae).** Journal of Parasitology: April 2006, Vol. 92, No. 2, pp. 401-403. 2006.
- KATZ, N. & ALMEIDA, K.. **Esquistossomose, xistosa, barriga d'água.** Cienc. Cult. [online]. vol.55, n.1, pp. 38-43. 2003.
- KAWAZOE, U; DIAS, L.C.S. & PIZA, J.T. **Infecção natural de pequenos mamíferos por *Schistosoma mansoni*, na represa de Americana (São Paulo, Brasil).** Rev. Saúde Públ., S. Paulo, 12:200-8, 1978.
- KAWAZOE, U. & PINTO, A.C.M. **Importância epidemiológica de alguns animais silvestres na esquistossomose mansônica.** Rev. Saúde Públ., S. Paulo, 17:345-66, 1983.
- KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** Journal of molecular evolution, 16: p 111-120. 1980.
- KING, K.C. & LIVELY, C.M. **Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations?** Heredity 109 (4): 199-203. 2012.
- LANGAND, J; THERON, A; POINTIER, J.P; DELAY, B. & JOURDANE, J. **Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe island, using RAPD markers.** J. Moll. Stud., 65: 425-433. 1999.

- LIBRADO, P. & ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics. 25 (11), p 1451-1452. 2009.
- LIMA, L. C; SOARES, D. M. & GUIMARÃES, C. T. ***Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 in the state of Minas Gerais, Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol.88, No.2, pp.289-292. 1993.
- LIMA, V.L.C. **A Esquistossomose Urbana e a Heterogeneidade Social e Epidemiológica da População do Município de Campinas, São Paulo, Brasil.** *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (1): p 45-56, Jan/Mar, 1995.
- LOTIFY, W.M; DEJONG, R.J; ABDEL-KADER A. & LOKER E.S. **A molecular survey of biomphalaria in egypt: is b. Glabrata present?.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(1), pp. 131–139. 2005.
- LYNCH, M. **Why population size matter.** In: **The origins of genome architecture.** Sinauer Associates, Sunderland massachussets: 69-100. 2007.
- MACHADO, S.M.P; MAGALHÃES, L.A; ARTIGAS, P.T; CORDEIRO, N.S. & CARVALHO, J.F. **Verificação do antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros Digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil.** *Revista de Saúde Pública S. Paulo*, 22(6): 484-488. 1988.
- MAGALHÃES, L.A. **Moluscos planorbídeos do Distrito Federal, Brasília. São Paulo,** [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas. 1966.
- MAJOROS, G; FEHÉR Z; DELI T. & FÖLDVÁRI, G. **Establishment of *Biomphalaria tenagophila* Snails in Europe.** *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 11. pg 1812-1814. 2008.
- MALEK, E.A. **Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted Diseases in Tropical America: a manual.** Washington: PanAmerican Health Organization/WHO. Scientific Publication, 468. 1985
- MANDAHL-BARTH, G, **INTERMEDIATE HOSTS OF SCHISTOSOMA. African Biomphalaria and Bulinus: I.** *Bull. Org. mond. Sante I Bull. Wld Hlth Org.* 16, pp. 1103-1163. 1957.
- MARTINELLI, M. **Relevo do estado de São Paulo.** Consultado em: junho 2010. Disponível em: <http://confins.revues.org/index6168.html> . [Online], 7 | 2009.
- MARTINS-SOUSA, R.L; NEGRAO-CORREA, D; BEZERRA, F.S.M & COELHO, P.M.Z. **Anesthesia of *Biomphalaria* spp. (Mollusca, Gastropoda): sodium pentobarbital is the drug of choice** . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. vol.96, n.3, pp. 391-392. 2001.
- MATIOLI, R.S. **Biologia Molecular e Evolução.** Ribeirão Preto. Editora Holos, p 84-85. 2001.
- MÁVAREZ, J; STEINER, C; POINTIER, J.P. & JARNE, P. **Evolutionary history and phylogeography of the schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences.** *Heredity*; 89: p 266-272. 2002.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: Esquistossomose Mansônica: guia de bolso.** Brasília, Editora Ministério da Saúde, 8. ed. rev, p 171-175. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; **Situação epidemiológica da esquistossomose mansonii no Brasil.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansonii_30_05_2011.pdf. 2011.

MOREL, C.M. **Innovation in health and neglected diseases.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(8):1522-1523. 2006.

MULVEY, M. & VRIJENHOEK, R.C. **Population structure in *Biomphalaria glabrata*: examination of an hypothesis for the patchy distribution of susceptibility to schistosomes.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 31, n. 6, p. 1195, 1982.

NYLANDER, J.A.A. **Bayesian phylogenetics and the evolution of gall wasps.** Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, p 937. 2004.

OHLWEILER F.P; TAKAHASHI, F.Y; GUIMARÃES, M.C.A; GOMES, S.R. & KAWANO, T. **Manual de Gastrópodes límnicos e terrestres do estado de São Paulo associados às helmintoses.** Porto Alegre: Redes Editora, p 38-59, 141-147. 2010.

PALASIO, R.G.S. & TUAN, R. **Análise do padrão de variação intra e interespecífica dos genes mitocondriais COI e rRNA 16S em caramujos do gênero *Biomphalaria* para o uso como DNA Barcode.** I Simpósio Sobre Evolução & Diversidade Da UFABC, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP. Disponível em: <<http://simposioevolucao.ufabc.edu.br/Palasio.html>>. 2010.

PALUMBI, S.R. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) **Molecular Systematics**, Sinauer Associates, Inc: Sunderland. p 205-247. 1996.

PARAENSE, W.L. **Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 53, p 285-291, 1955.

PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. **Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*.** Rev. Inst. Med. trop. SP, 5:23-9, 1963.

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

PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. **Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*.** J Parasitol 64: 822-826. 1978.

PARAENSE, W.L. ***Biomphalaria occidentalis* sp.n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata).** Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. vol.76, n.2, p 199-211. 1981.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp.n. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae) I Morphology. Mem. Inst.Oswaldo Cruz; v. 74, n 4; p 465-469. 1984.

PARAENSE, W.L. **The schistosome vectors in the Americas.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. vol. 96, suppl., p 7-16. 2001.

PASKEWITZ, S.M; WESSON, D.M. & COLLINS, F.H. **The internal transcribed spacers of ribossomal DNA in five members of *Anopheles gambiae* species complex.** Insect Molecular Biology. 2 (4): 247-57, 1993.

PIZA, J de T & RAMOS, A da S. **Os focos de esquistossomose no estado de São Paulo.** Arquivo de Higiene e Saúde Pública. 25 (86), p 261-271, 1960.

POINTIER, JP; DAVID, P. & JARNEA, P. **Biological invasions: the case of planorbid snails.** Journal of Helminthology.79: P 249-256. 2005.

RAMOS, A.da S. PIZA, J.T; PINTO, G.H; TION, T; FLEURY, G.C; MORAIS L.V.C. & CAMPOS, L.L. **Focos ativos de esquistossomose mansoni no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Saúde Pública [online]. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101969000100008>. vol.3, n.1, pp. 59-65. 1969

RAMOS, A.S. & PIZA, J.T. **Sôbre os trabalhos da campanha de combate à esquistossomose no estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Saúde Pública [online]. vol.5, n.2, pp. 263-272. 1971.

REDE DAS AGUAS. **Bacia do Vale do Ribeira.** Acessado em: dezembro de 2009. Disponível em: www.rededasaguas.org.br/.../projeto/bacia.htmf. 2009.

REY, L. **Parasitologia** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p 349. 1992.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P. **MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** Bioinformatics 19: p 1572-1574. 2003.

SAFFORD, H.D. & MARTINELLI, G. Southeast Brazil. In: **Inselbergs.** Springer Berlin Heidelberg, p. 339-389. 2000.

SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular biology and evolution, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTANA, J.V; MAGALHÃES L.A. & RANGEL, H.A. **Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *schistosoma mansoni*.** Rev. Saúde publ.; SP 12:67-77. 1978.

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

SEADE, Fundação SEADE. **Perfil Município [dados internet] São Paulo.** Disponível em: <http://www.seade.gov.br/produtos/perfil/perfilMunEstado.phpj>. Acessado em: jan de 2013.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE. **Novas estratégias para a vigilância epidemiológica da esquistossomose no estado de São Paulo**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças. Rev. Saúde Pública [online]. vol.43, n.4, p 728-730. 2009.

SILVA, L.J. da. **Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil)**. Rev. Saúde Pública [online]. vol.19, n.1, p 1-7. 1985.

SINAN Net. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde/SVS. **Casos confirmados por Evolução e por Autóctone Mun. Res. segundo UF Notificação** [Tabulações de dados]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 2012.

SIRE, C; LANGAND, J; BARRAL, V. & THERON, A. **Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape**. *Parasitology*, 122(05), 545-554. 2001.

SIT, **SISTEMAS DE INFORMAÇÕES TERRITORIAIS**. Disponível em: <http://sit.mda.gov.br/images/mapas/tc/tr_100_vale_do_ribeira_sp_abr_2009.jpg> Acesso em: 2010.

SOUZA, C.R.G. & SOUZA, A.P. 2 cap: **Geologia e geomorfologia da área da estação ecológica Jureia-Itatins**. In Marques & Duleba. Estação Jureia-Itatins, p16-33. 2012.

SPATZ, L; VIDIGAL, T.H.D.A; CALDEIRA, R.L; NETO, E.D; CAPPA, S.M.G & CARVALHO, O.S. **Study of *Biomphalaria Tenagophila Tenagophila*, *B. t. Guaibensis* and *B. Occidentalis* by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Enzyme Digestion of the Ribosomal RNA Intergenic Spacer Regions**. J. Mollus. Stud. 65 (2): p 143-149; 1999.

SUCEN Superintendência de Controle de Endemias. **Controle da esquistossomose no estado de São Paulo**. São Paulo.1980.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. **Relatório de Esquistossomose no estado de São Paulo. II Encontro sobre esquistossomose. Secretaria de Estado da Saúde**. São Paulo. [documento técnico] 1982.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. **Fichas Distribuição de Planorbídeos capturados, examinados e positivos para *Schistosoma mansoni*, segundo localidade, no período de 2001 á 2005**. SR 03. 2005.

SWOFFORD D.L, PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*And Other Methods). Version 4**. Sinauer Associates, Sunderland. 2002.

TELES, HMS; MITSUYOSHI, HR; OLIVEIRA, JCN De & AVEIRO, JA De. **Ocorrência de vetores da esquistossomose mansônica no litoral norte do estado de São Paulo**, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19(6): p 1887-1891, nov-dez, 2003.

TELES, H.M.S. **Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no estado de São Paulo**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online], vol.38, n.5, p 426-432. 2005.

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).** Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 57, n.1, p 144-151. 2010.

THOMPSON, J.D; GIBSON, T.J; PLEWNIAK, F; JEANMOUGIN, F & HIGGINS, D.G. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Res., 25, 4876–4882.. 1997.

TUAN, R; SIMÕES, L.C.G. & KAWANO, T. **Estudo sobre poliploidia e meiose em *Biomphalaria glabrata*.** Cienc. Cult. (Supl.) 36: p 843. 1984.

TUAN, R. & L.C.G. SIMÕES. **Spermatogenesis and desiccation in *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Planorbidae).** Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 12 (4): p 881-885. 1989.

TUAN, R. & BORTOLATO, P.C. **Genetic markers from *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) obtained by the double stringency polymerase chain reaction technique.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]., vol.96, n.3, pp. 435-436. 2001.

TUAN, R. & SANTOS, P. dos. **ITS2 variability of *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae) species from the Paranapanema Valley (São Paulo State, Brazil): diversity patterns, population structure, and phylogenetic relationships.** Genet. Mol. Biol. [online]. vol.30, n.1, p 139-144. 2007.

TUAN, R; ZANNA R.D; PALASIO, R.G.S. & KAWANO, T. **Correlação entre a diversidade genética de *Biomphalaria tenagophila* e a transmissão da esquistossomose no estado de São Paulo.** Livro de Resumos do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia (EBRAM), Sociedade Brasileira de Malacologia, Rio de Janeiro, RJ, 21: p 280. 2009a.

TUAN, R; GUIMARÃES, M.C.A; ZANNA, R.D. & PALASIO, R.G.S. **Marcadores Moleculares e Reprodutivos na caracterização da heterogeneidade populacional de *Biomphalaria tenagophila*.** Livro de Resumos do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia (EBRAM), Sociedade Brasileira de Malacologia, Rio de Janeiro, RJ, 21: p 281. 2009b.

TUAN, R; OHWEILLER, F; PALASIO, R.G.S.; ZANNA, R. & GUIMARÃES, M.C.A. Chapter 15: **Pattern of genetic divergence of mitochondrial DNA sequences in *Biomphalaria tenagophila* complex species under barcoding perspective.** Book title: Schistosomiasis. Book edited by: Dr. Mohammad Bagher Rokni, Department of Medical Parasitology & Mycology, School of Public Health & Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Intech, 2012.

VIDIGAL, T.H.D.A; SPATZ, L; NUNES, D.N; SIMPSON, A.J.G; CARVALHO, OS & DIAS, E.N. ***Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer.** Exp Parasitol 89: 180-187. 1998.

VIDIGAL, T.H.D.A; KISSINGER, J.C; CALDEIRA, R.L; PIRES, E.C; MONTEIRO, E; SIMPSON, A.J. & CARVALHO O.S. **Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences.** Parasitology 121: p 611-620, 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 cytochrome oxidase subunit I used for differentiation of Brazilian Biomphalaria species intermediate host of Schistosoma mansoni.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. vol.97, suppl.1. 2002.

VIDIGAL, T.H.D.A; MAGALHÃES, K.G. & CARVALHO, O. dos S. **Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian Biomphalaria intermediate hosts of the Schistosoma mansoni.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37(4) : p 351-353, jul-ago, 2004a

VIDIGAL, T.H.D.A; SPATZ, L; KISSINGER, J.C; REDONDO, R.A; 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. Oswaldo Cruz; 99: p 153-158. 2004b.

WALDMAN, E.A; SILVA, L.J. & MONTEIRO, C.A. **Trajetória das Doenças Infecciosas: da Eliminação da Poliomielite à Reintrodução da Cólera.** Informe Epidemiológico do SUS 1999; 8(3):5-47. 1999.

WATTERSON G.A, & GUESS, H.A. **Is the most frequent allele the oldest?** *Theoretical Population Biology*,11, 141-160. 1977.

WHO, World Health Organization. **Weekly epidemiological Record/Relevé épidémiologique hebdomadaire.** 2013, 88th year, Disponível em: <http://www.who.int/wer>. No. 8, 88, 81-88. 2013.

ZANNA, R.D. **Diversidade genética de B. tenagophila (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Planorbidae) no estado de São Paulo, Brasil.** [Dissertação]. SP: CCD Secretaria de Estado da Saúde; 2010.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. **Relação entre a patogenicidade de Schistosoma mansoni em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. I.** Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. *Rev. Saúde públ.*, 25: 359-66, 1991.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M; MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. **Relação entre a patogenicidade do Schistosoma mansoni em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II.** Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras, *Rev.de Saúde Publica*, 27(6): 412-420, 1993.

ZANOTTI-MAGALHAES, E.M.; MAGALHAES, L.A. & CARVALHO, J.F. **Relação entre a patogenicidade do Schistosoma mansoni em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor: III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras.** *Rev. Saúde Pública* [online]., vol.29, n.4, pp. 265-270. 1995.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M; MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. **Relação entre patogenicidade do Schistosoma mansoni em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. IV-** Infeciosidade dos miracidios. *Rev. Saúde Pública*, 31 (5): 488-494, 1997

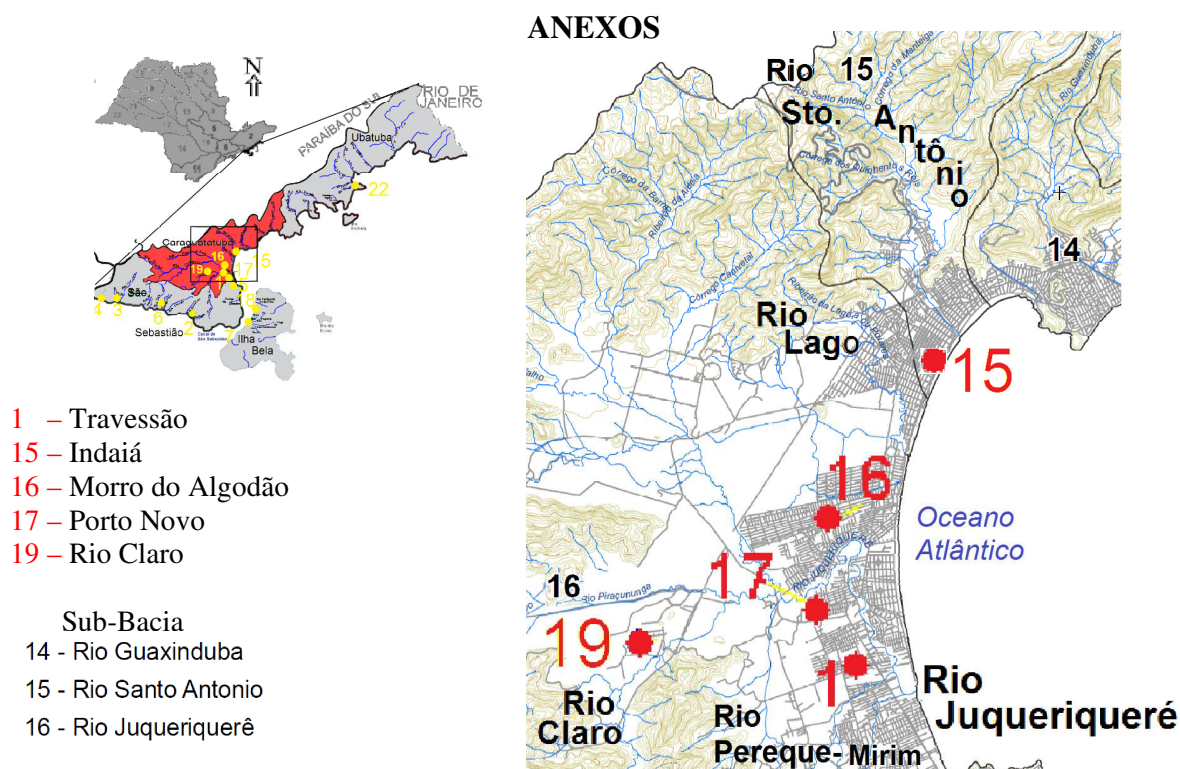


Figura I - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (nº ●) em Caraguatatuba (adaptado a partir de CETESB, 2008; SIT, 2010, CBH LN, 2011).

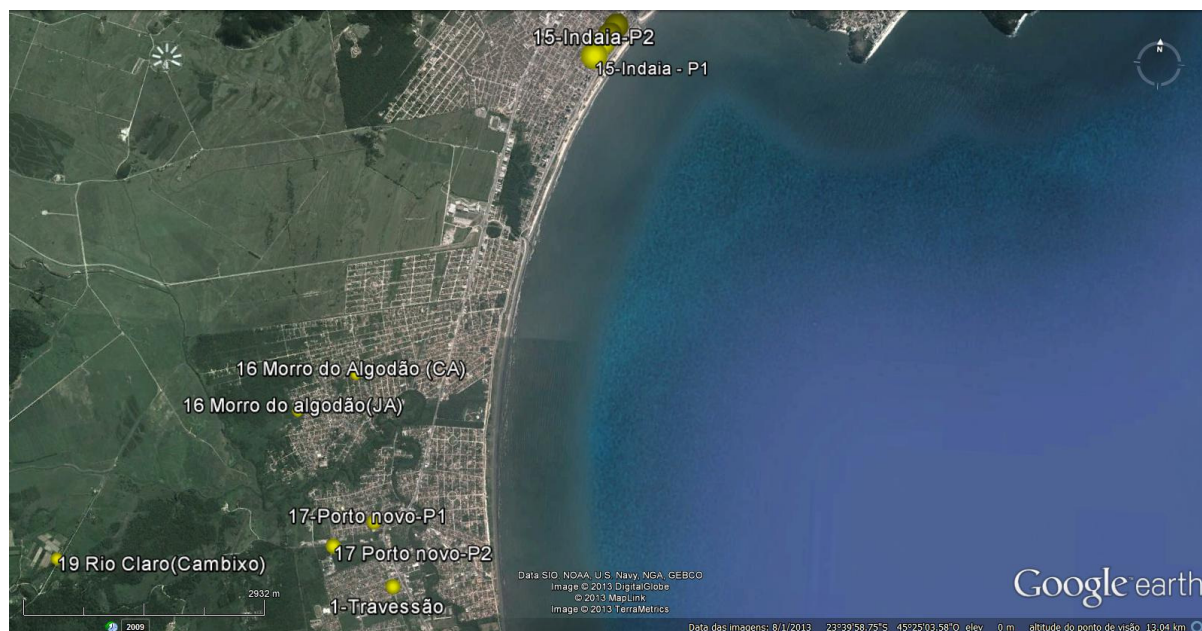
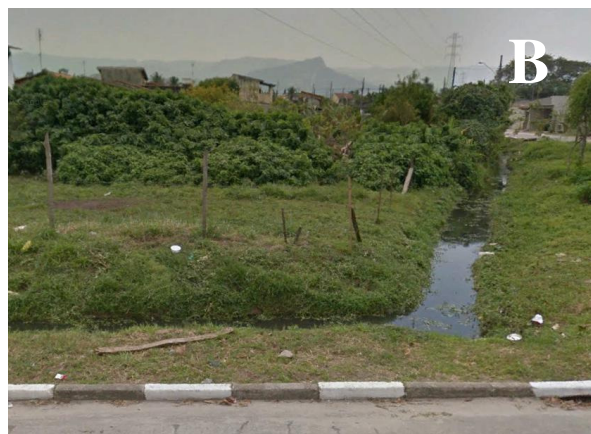


Figura II - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados (nº ●) no município de Caraguatatuba no bairro (15) Indaiá, (16) Morro do Algodão (CA) (ponto 1 -Casimiro de Abreu) e (JA) (ponto 2 - Jose Antonio Ferreira), (17) Porto Novo, ponto 1 e 2 (P1 e P2), (1) Travessão e (19) Rio Claro (Cambixo) (Fonte: Google Earth, 2013).



Figuras III - Locais de coleta em Caraguatatuba, no bairro Porto Novo. (A) estrada do Rio Claro – P2 e (B) Barranco Alto – P1, em valas próximas ao rio Juqueriquerê.

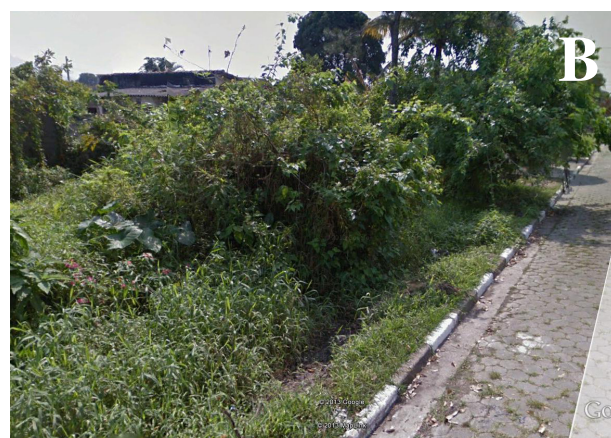


Figura IV - Locais de coleta em Caraguatatuba, no bairro Morro do Algodão. (A) Rua Casimiro de Abreu – P2 e (B) Rua Jose Antonio Ferreira – P1.



Figura V - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados (nº ●) no município de Caraguatatuba, no bairro Indaia em 4 pontos (Fonte: Google Earth, 2013).



Figura VI - Local de coleta em Caraguatatuba, no Bairro Indaiá no ponto 1, afluentes do Rio Santo Antônio, vala próxima da praia.

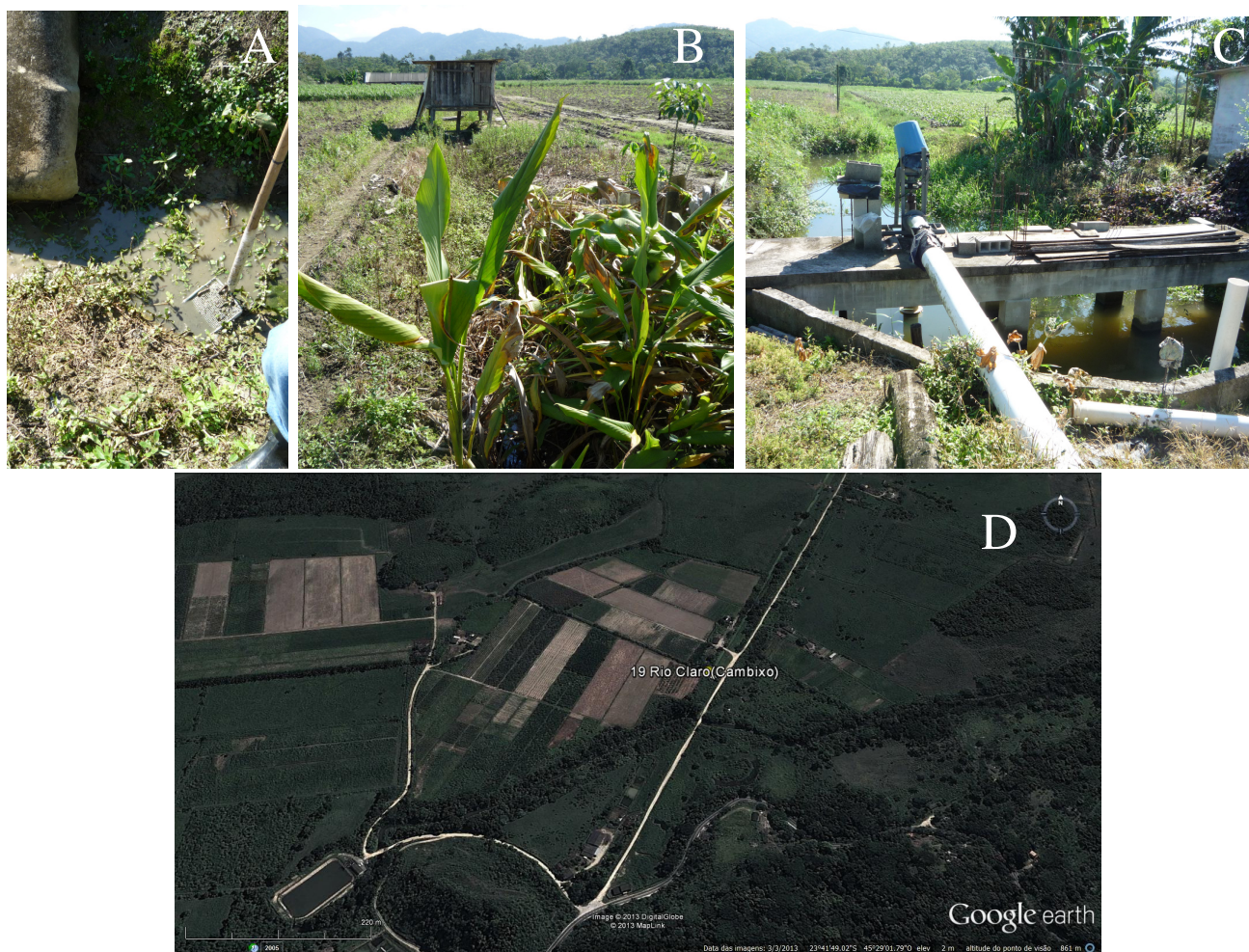


Figura VII - Locais de coletas em Caraguatatuba, no Bairro Rio Claro e na Rua Cambixo em dois locais da fazenda no lado Esquerda (A e B) e lado Direita (C) e imagem de satélite (D) delimitando área e pontos amostrados (nº ●) (Fonte: Google Earth, 2013).



Figura VIII - Locais de coleta em Caraguatatuba (Bairro Travessão).

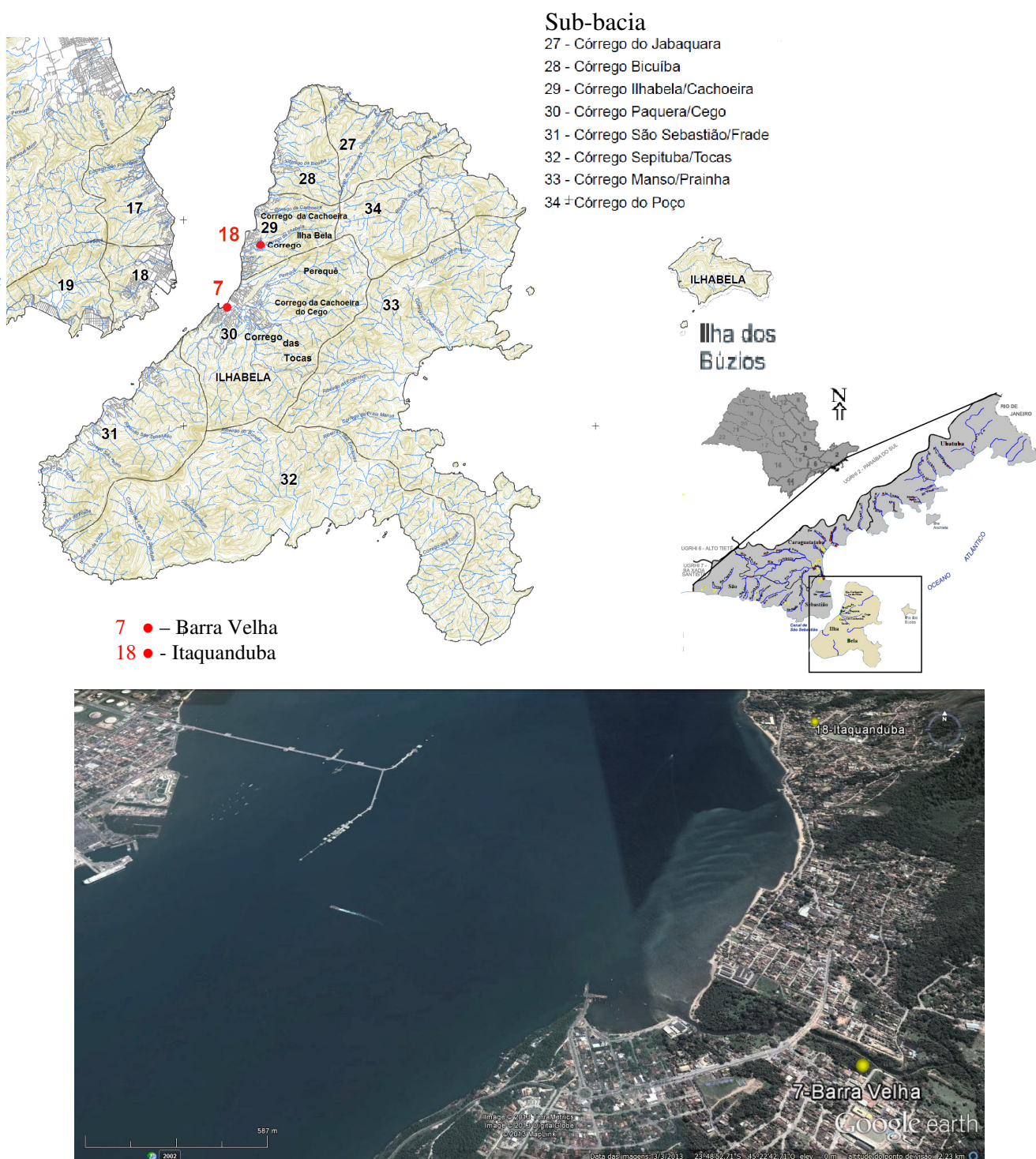


Figura IX - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (nº ● ou ●) em Ilha Bela (adaptado a partir de CETESB, 2008; SIT, 2010, CBH LN, 2011) e Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no bairro Itaquanduba e Barra Velha (Fonte: Google Earth, 2013).



Figura X - Local de coleta em Ilha Bela – (A) Barra Velha e (B) Itaquanduba.

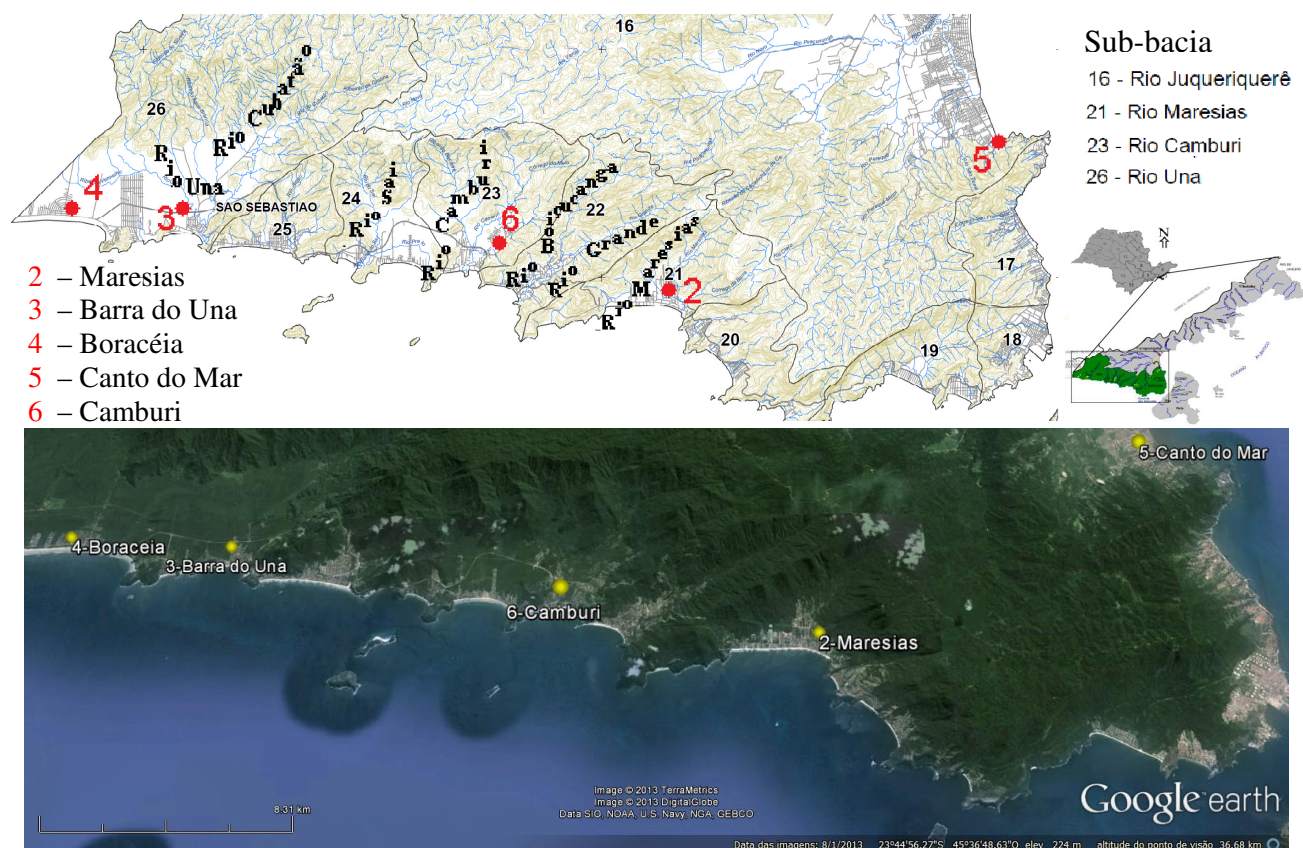


Figura XI - Mapa hidrográfico delimitando os pontos de coleta (nº ●) em São Sebastião (adaptado a partir de CETESB, 2008; SIT, 2010; CBH LN, 2011) e Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no bairro Camburi, Maresias, Boracéia, Canto do Mar e Barra do Una (Fonte: Google Earth, 2013).



Figura XII - Imagem de satélite dos locais de coletas em São Sebastião, nas valas no bairro Canto do Mar (A), Camburi (B), Maresias (C), Boracéia (D) e Barra do Una (E) (Fonte: Google Earth, 2013).

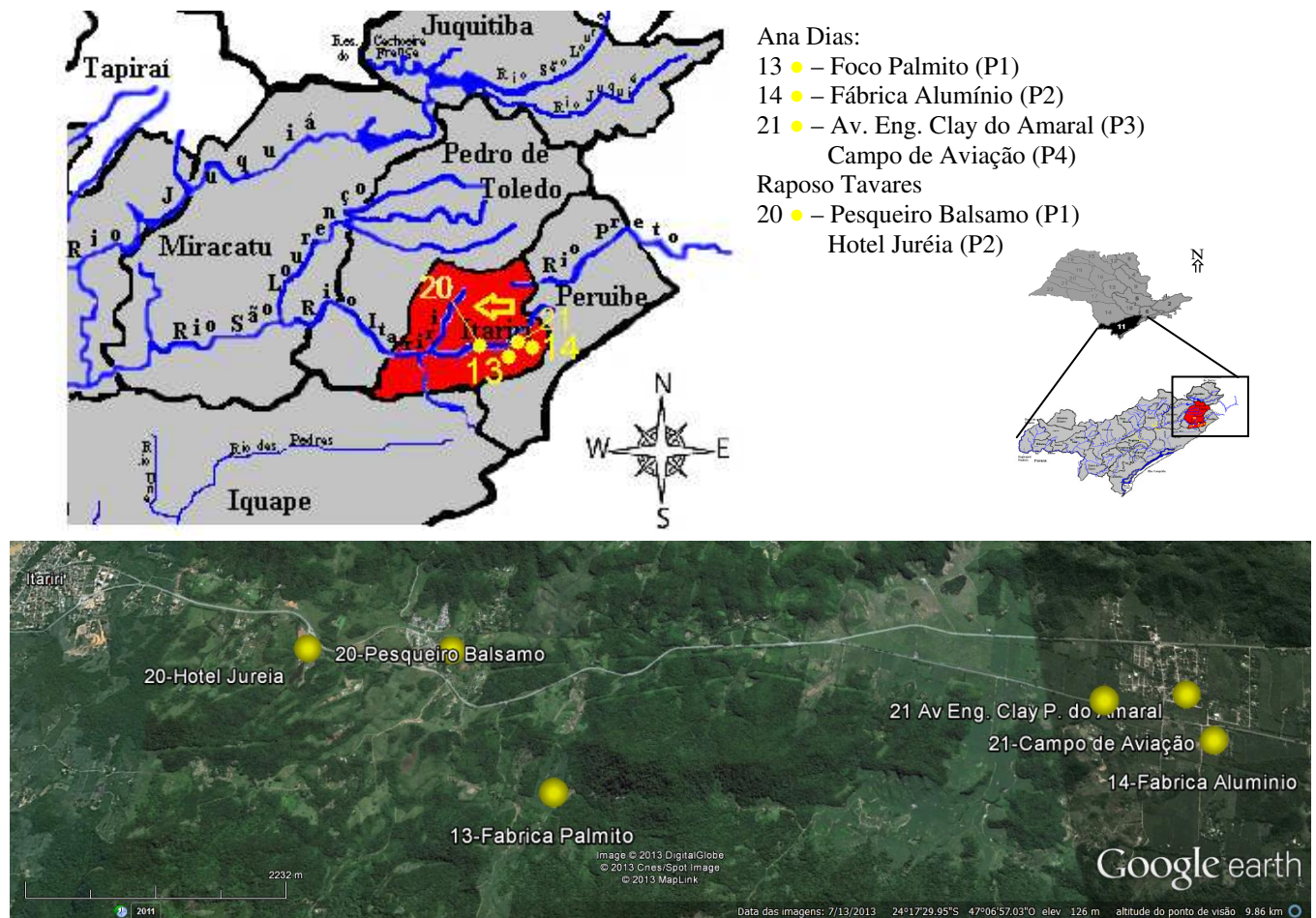


Figura XX - Mapa hidrografico delimitando os pontos de coleta (N°●) do município de Itariri (adaptado a partir de CETESB, 2008; SIT, 2010) e imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no distrito de Ana Dias (13 - Foco Palmito, 14 – Fábrica Alumínio, 21 Av. Eng. Clay do Amaral e Campo de Aviação) e no distrito Raposo Tavares (20 – Pesqueiro Balsamo e Hotel Juréia) (Fonte: Google Earth, 2013).

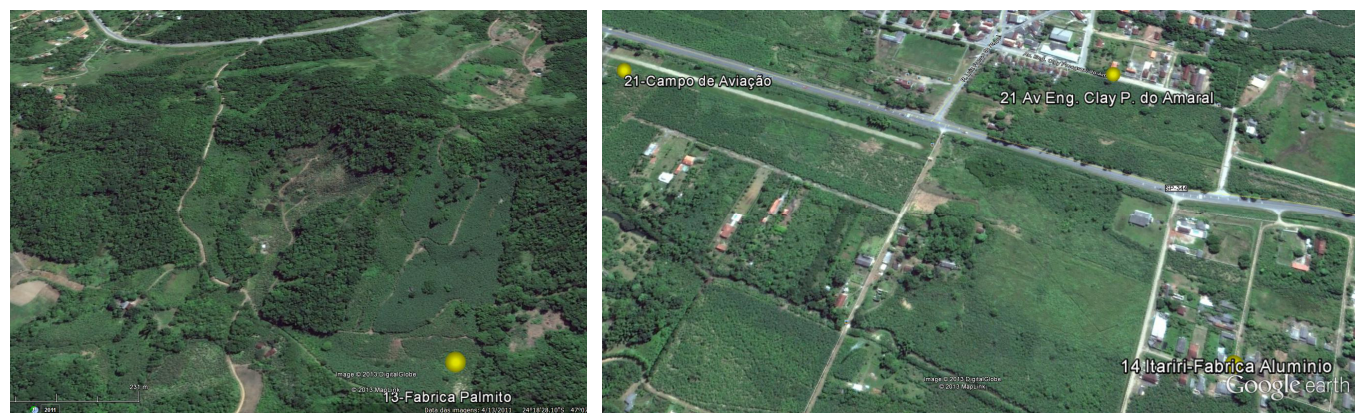


Figura XXI - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no distrito de Ana Dias (13 - Foco Palmito, 14 - Fábrica Alumínio, 21 - Av. Eng. Clay do Amaral e Campo de Aviação) (Fonte: Google Earth, 2013).



Fonte: Marisa C. A. Guimarães/SUCEN.

Figura XXII - Local de coleta em Itariri, Distrito Ana Dias, na Av. Eng. Clay do Amaral.

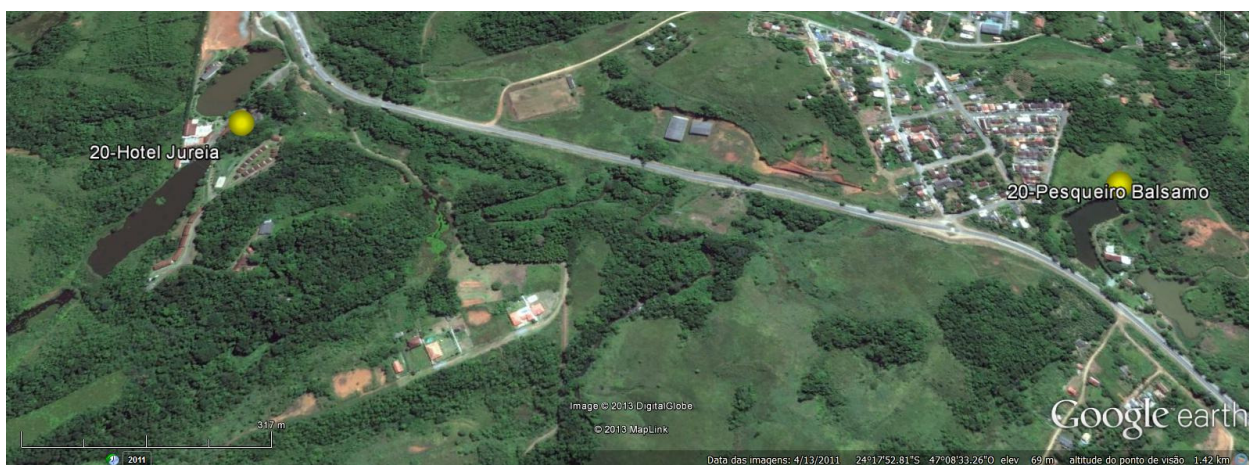


Figura XXIII - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no distrito Raposo Tavares (20 – Pesqueiro Balsamo e Hotel Juréia) (Fonte: Google Earth, 2013).



Fonte: Marisa C. A. Guimarães/SUCEN.

Figura XXIV – Local de Coleta em Itariri, Distrito Raposo Tavares, no Pesqueiro Balsamo (A) e no Hotel Juréia (B).

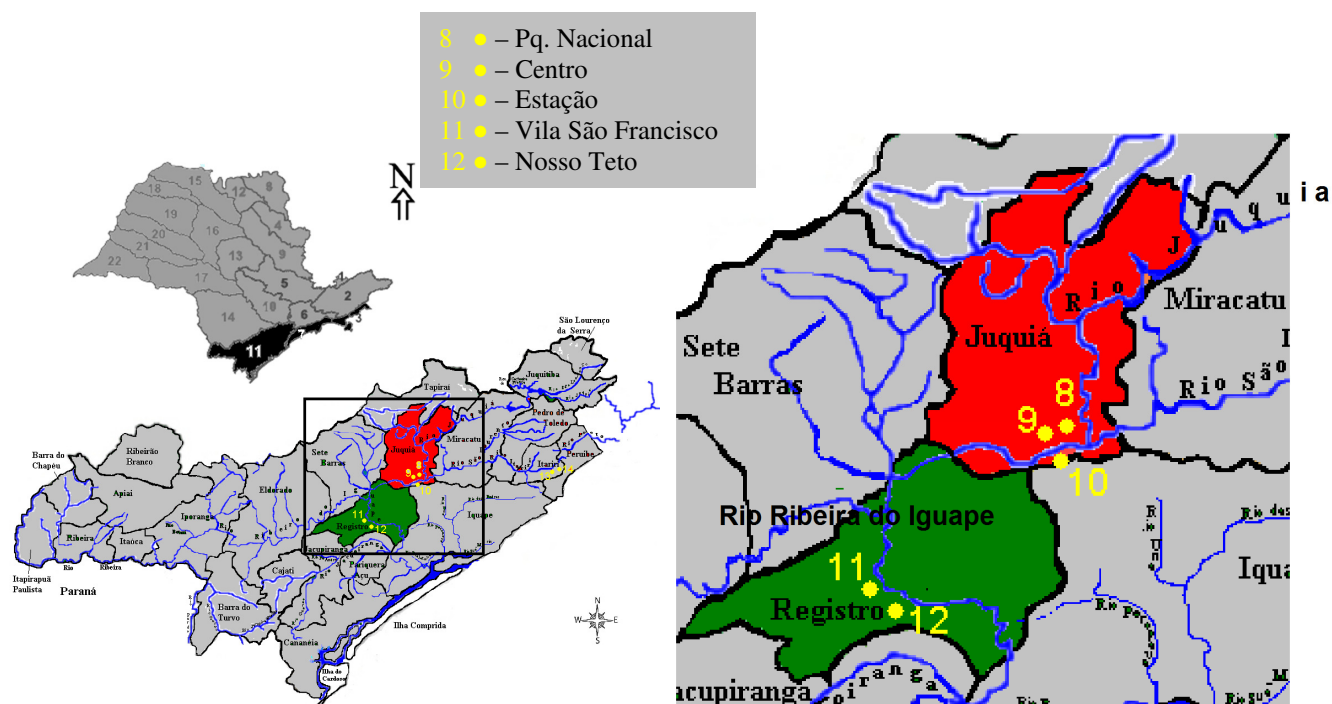


Figura XXV - Mapa hidrografico delimitando os pontos de coleta (Nº ●) do município de Registro e Juquiá (adaptado a partir de CETESB, 2008; SIT, 2010).



Figura XXVI - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados do município de Registro (11-Vila São Francisco e 12-Bairro Nosso Teto) (Fonte: Google Earth, 2013).



Fonte: LBBM – SUCEN, 2008.

Figura XXVII - Local de coleta em Registro, na Vila São Francisco.



Fonte: LBBM – SUCEN, 2008.

Figura XXVIII - Local de coleta em Registro, no Bairro Nosso Teto.



Figura XXIX - Imagem de satélite delimitando área e pontos amostrados no município de Juquiá (8-Parque Nacional, 9-Centro e 10-Bairro Estação) (Fonte: Google Earth, 2013).



Fonte: LBBM – SUCEN, 2008.

Figura XXX - Local de coleta em Juquiá, (A) Bairro Estação e (B) Parque Nacional.



Fonte: LBBM – SUCEN, 2008.

Figura XXXI - Local de coleta em Juquiá, no Centro (Vila Florida).

Anexo 1 - Protocolo de extração de tecido animal:

1. Cortar o pé da *Biomphalaria*, com estilete, colocar em um tubo de 1,5 ml e adicionar 180 µL de ATL.
2. Adicionar 20 µL de proteinase K, vortexar e incubar a 55°C por 1 hora e 30 min até a lise total.
3. Adicionar 4 µL de Rnase por 2 min a 15-20°C;
4. Vortexar por 15 segundos, adicionar 200 µL de Buffer AL, vortexar e incubar por 10 minutos a 70°C, vortexar.
5. Adicionar 200 µL de Etanol (96-100%) e vortexar;
6. Passar todo o conteúdo do tubo de 1,5 ml para a coluna de 2ml, centrifugar a 8000rpm/ 1 min, e descartar o fundo;
7. Acrescentar 500 µL de Buffer AW1, centrifugar a 8000rpm/ 1 min, e descartar o fundo;
8. Acrescentar 500 µL de Buffer AW2, centrifugar a 14000rpm/3 min, e descartar o fundo;
9. Centrifugar novamente a 14000rpm/ 1 min, descartar o fundo e passar a coluna para o tubo de 1,5mL;
10. Eluir com 50 µL de Buffer AE (cuidado para adicionar no meio do filtro);
11. Incubar por 1 min em temperatura ambiente, centrifugar a 8000rpm/ 1 min, NÃO DESCARTAR O FUNDO.
Voltar ao passo 10.

648_Btt_Car27_Ind4 TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
494_Btt_Sse3_Brc TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
523_Btt_Car9_TrAV TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
491_Btt_Sse5_Camb TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
356_Btt_Juq6_Est2 TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
560_Btt_Car14_MaCa TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
593_Btt_Ibe2_Itaq TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
501_Btt_Sse4_BrU TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
363_Btt_Juq3_Vflo TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
519_Btt_Car7_MaCA TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
361_Btt_Juq2_PqN TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
354_Btt_Juq4_Est1 TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
359_Btt_Juq7_PqN TTGGGGCGAC-AAGTAAACATTTTGAACTTTACTAATTA-ATT-TAATCGATTTTATAATAAGAATAAAAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
349_Bst_Reg2_NT TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
555_Bst_Ibe2_BV TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
537_Bst_Ita1_Hjre TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
348_Bst_Reg3_NT TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
347_Bst_Reg1_NT TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
515_Bst_Ibe1_BV TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT
534_Bst_Ita2_Clay TTGGGGCGAC-AGGTAAACA-TAT-AACTTTACGAATTATCAT-TGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAA-CTACCTTAGGGATAACAGCATTATAT

310 320
.....|.....|.....|.....|.....|.....
372_Btt_Car2_Trav TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
495_Btt_Sse2_BrU TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
498_Btt_Car4_Trav TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
492_Btt_Sse1_Mrs TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
571_Btt_Car24_RCA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
618_Btt_Ita7_FA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
569_Btt_Car23_PN2 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
566_Btt_Car21_RCB TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
568_Btt_Car22_MaJa TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
562_Btt_Car16_PN2 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
559_Btt_Car13_RCB TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
561_Btt_Car15_MaJa TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
557_Btt_Car11_Ind1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
558_Btt_Car12_RCA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
518_Btt_Car20_PN1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
517_Btt_Car6_Ind2 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
556_Btt_Car10_Ind1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
516_Btt_Car5_Ind3 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
378_Btt_Car1_Trav TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
579_Btt_Car19_Ind1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
522_Btt_Car8_PN1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
580_Btt_Car18_Ind1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
373_Btt_Car3_Trav TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
352_Btt_Reg2_Sfran TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
351_Btt_Reg1_Sfran TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
350_Btt_Reg3_Sfran TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
535_Btt_Ita5_Av TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
532_Btt_Ita4_Clay TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
360_Btt_Juq1_PqN TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
355_Btt_Juq5_Est1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
563_Btt_Car17_Ind4 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
604_Btt_Car26_Trav TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
554_Btt_Ibe1_Itaq TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
503_Btt_Ita2_FPal TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
346_Btt_Reg2_NT TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
533_Btt_Ita6_cIay TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
497_Btt_Ita1_FA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
493_Btt_Sse6_CtMar TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
619_Btt_Ita8_FA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
536_Btt_Ita7_PesB TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
592_Btt_Car25_MaCa TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
504_Btt_Ita3_Fpal TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
648_Btt_Car27_Ind4 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
494_Btt_Sse3_Brc TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
523_Btt_Car9_TrAV TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
491_Btt_Sse5_Camb TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
356_Btt_Juq6_Est2 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
560_Btt_Car14_MaCa TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
593_Btt_Ibe2_Itaq TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
501_Btt_Sse4_BrU TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
363_Btt_Juq3_Vflo TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
519_Btt_Car7_MaCA TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
361_Btt_Juq2_PqN TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
354_Btt_Juq4_Est1 TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
359_Btt_Juq7_PqN TTTTAT-ATGATTGTGACCTC
349_Bst_Reg2_NT TTTTTTTTATGATTGTGACCTC
555_Bst_Ibe2_BV TTTTT-TATGATTGTGACCTC
537_Bst_Ita1_Hjre TTTTT-TATGATTGTGACCTC
348_Bst_Reg3_NT TTTTT-TATGATTGTGACCTC
347_Bst_Reg1_NT TTTTT-TATGATTGTGACCTC
515_Bst_Ibe1_BV ATTTTCT-ATGATTGTGACCTC
534_Bst_Ita2_Clay ATTTTT-TATGATTGTGACCTC

Anexo 3 - Alinhamento em Clustal X dos 410 nucleotídeos A, T, C, G das sequências de ITS2 dos 31 indivíduos da espécie *B. tenagophila* mais duas sequência de *B. straminea*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
360_Btt_Juq1_PqN	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
352_Btt_Reg2_Sfran	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
497_Btt_Ita1_FA	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
354_Btt_Juq4_Est1	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
356_Btt_Juq6_Est2	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
359_Btt_Juq7_PqN	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
346_Btt_Reg4_NT	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
492_Btt_Sse1_Mrs	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
495_Btt_Sse2_BrU	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
350_Btt_Reg3	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
363_Btt_Juq3_VFlo	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
522_Btt_Car8_PN1	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
491_Btt_Sse5_Camb	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
498_Btt_Car4_Trav	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
503_Btt_Ita2_Fpal	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
501_Btt_Sse4_BrU	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
523_Btt_Car9_Trav	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
378_Btt_Car1_Trav	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
493_Btt_Sse6_CtMar	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
504_Btt_Ita3_FPal	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
532_Btt_Ita4_Clay	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
373_Btt_Car3_Trav	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
494_Btt_Sse3_Brc	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
519_Btt_Car7_MaCa	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
516_Btt_Car5_Ind3	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
558_Btt_Car12_RCA	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
593_Btt_Ibe2_Itaq	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
562_Btt_Car16_PN2	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
579_Btt_Car19_Ind1	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
536_Btt_Ita6_PB	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
535_Btt_Ita5_AV	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTCCCGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGGGCCCT	CCCCGTGTTACG					
347_Bst_Reg1_NT	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTACTGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGAGCCCCG	TCCCGTATTACG					
515_Bst_Ibe1_BV	CTCGTAAGGGCAAGCGGATTGTC	CGTCTCTCGCTCTACTGGAGAGTTT	GACGAACTCGAGCCTGCTGGT	GTTATGGGAGCCCCG	TCCCGTATTACG					
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
360_Btt_Juq1_PqN	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
352_Btt_Reg2_Sfran	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
497_Btt_Ita1_FA	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
354_Btt_Juq4_Est1	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
356_Btt_Juq6_Est2	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
359_Btt_Juq7_PqN	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
346_Btt_Reg4_NT	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
492_Btt_Sse1_Mrs	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
495_Btt_Sse2_BrU	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
350_Btt_Reg3	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
363_Btt_Juq3_VFlo	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
522_Btt_Car8_PN1	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
491_Btt_Sse5_Camb	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
498_Btt_Car4_Trav	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
503_Btt_Ita2_Fpal	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
501_Btt_Sse4_BrU	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
523_Btt_Car9_Trav	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
378_Btt_Car1_Trav	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
493_Btt_Sse6_CtMar	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
504_Btt_Ita3_FPal	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
532_Btt_Ita4_Clay	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
373_Btt_Car3_Trav	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
494_Btt_Sse3_Brc	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
519_Btt_Car7_MaCa	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
516_Btt_Car5_Ind3	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
558_Btt_Car12_RCA	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
593_Btt_Ibe2_Itaq	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
562_Btt_Car16_PN2	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
579_Btt_Car19_Ind1	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
536_Btt_Ita6_PB	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
535_Btt_Ita5_AV	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAGGT	CAGCTCGTCCATCTAGGATGGCATGGCATGT	CTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
347_Bst_Reg1_NT	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAG	TCAGTCGTTCCATCTAGGATGGC	TGGCATGTCTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							
515_Bst_Ibe1_BV	AGTGGCGCATGGACCGTCGCGGATAG	TCAGTCGTTCCATCTAGGATGGC	TGGCATGTCTCCGTGGTCTCAAGTACAGGATGCGCCGTCGTCTCTCTG							


```

.....|.....
360_Btt_Juq1_PqN      TATCTCCGA
352_Btt_Reg2_Sfran   TATCTCCGA
497_Btt_Ita1_FA      TATCTCCGA
354_Btt_Juq4_Est1    TATCTCCGA
356_Btt_Juq6_Est2    TATCTCCGA
359_Btt_Juq7_PqN     TATCTCCGA
346_Btt_Reg4_NT      TATCTCCGA
492_Btt_Sse1_Mrs     TATCTCCGA
495_Btt_Sse2_BrU     TATCTCCGA
350_Btt_Reg3         TATCTCCGA
363_Btt_Juq3_Vflo    TATCTCCGA
522_Btt_Car8_PN1     TATCTCCGA
491_Btt_Sse5_Camb    TATCTCCGA
498_Btt_Car4_Trav    TATCTCCGA
503_Btt_Ita2_Fpal    TATCTCCGA
501_Btt_Sse4_BrU     TATCTCCGA
523_Btt_Car9_Trav    TATCTCCGA
378_Btt_Car1_Trav    TATCTCCGA
493_Btt_Sse6_CtMar   TATCTCCGA
504_Btt_Ita3_FPal    TATCTCCGA
532_Btt_Ita4_Clay    TATCTCCGA
373_Btt_Car3_Trav    TATCTCCGA
494_Btt_Sse3_Brc     TATCTCCGA
519_Btt_Car7_MaCa    TATCTCCGA
516_Btt_Car5_Ind3    TATCTCCGA
558_Btt_Car12_RCA    TATCTCCGA
593_Btt_Ibe2_Itaq    TATCTCCGA
562_Btt_Car16_PN2    TATCTCCGA
579_Btt_Car19_Ind1   TATCTCCGA
536_Btt_Ita6_PB      TATCTCCGA
535_Btt_Ita5_AV      TATCTCCGA
347_Bst_Reg1_NT      TATCTCCGA
515_Bst_Ibe1_BV      TATATCCGA

```