

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

Padrão de distribuição da diversidade genética
molecular e espacial de *Biomphalaria* spp. e sua relação
com a ocorrência da esquistossomose na região do Médio
Paranapanema, estado de São Paulo

Raquel Gardini Sanches Palasio

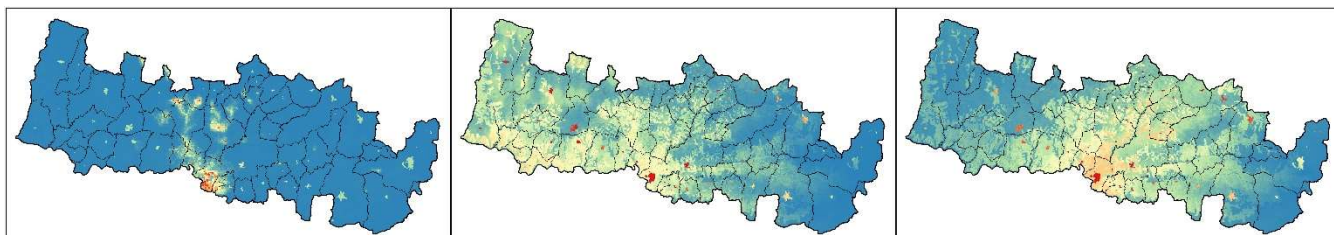
Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo ao
Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia,
para obtenção do título de Doutor em ciência.

Orientador:
Dr. Prof. Francisco Chiaravalloti Neto
Co-orientadora:
Dra. Roseli Tuan

Versão revisada

São Paulo

2019



Padrão de distribuição da diversidade genética
molecular e espacial de *Biomphalaria* spp. e sua relação
com a ocorrência da esquistossomose na região do Médio
Paranapanema, estado de São Paulo

Raquel Gardini Sanches Palasio

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo/FSP-
USP ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia, para obtenção do título de Doutor
em ciência.

Orientador:

Dr. Prof. Francisco Chiaravalloti Neto ¹

Co-orientadora:

Dra. Roseli Tuan²

¹ Faculdade de Saúde Pública da USP, Departamento de
Epidemiologia.

² Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular,
Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria da
Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Palasio, Raquel G. S.

Padrão de distribuição da diversidade genética molecular e espacial de *Biomphalaria* spp. e sua relação com a ocorrência da esquistossomose na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo / Raquel G. S. Palasio; orientador Francisco Chiaravalloti Neto; coorientadora Roseli Tuan. -- São Paulo, 2019.

216 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

1. *Biomphalaria*. 2. esquistossomose. 3. COI e 16S. 4. Filogenia. 5. Análise espacial. I. Chiaravalloti Neto, Francisco, orient. II. Tuan, Roseli, coorient. III. Título.

Aos meus pais Valter S. Palasio e Vanderli Gardini Palasio,
meus irmãos Rafael e Carolina G. S. Palasio e
meu noivo Diogo Heitor do Nascimento,
pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Epidemiologia, da Faculdade de Saúde Pública da USP e seus professores, pela formação acadêmica e científica.

À Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pela infraestrutura oferecida, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular que permitiu a realização dos experimentos moleculares e das coletas malacológicas (Projeto nº 1819/2016).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus orientadores: Dra. Roseli Tuan e Dr. Prof. Francisco Chiaravalloti Neto, pela paciência, empenho, dedicação e orientação durante o doutorado.

Aos funcionários da SUCEN da Regional de Marília, setor de Assis: Ms. Iara Giordano Rosa Xavier e Valrides Buzzetti Ernesto e aos funcionários da base de Ourinhos: Edvaldo Justino Batista, Nelson Marcelo Bernardo, Vilmar do Nascimento, Carlos Castro, Francisco Anastácio, Jackson Wilson Souza, Jesuel Benitti Oliveira, Jorge Lúcio Pinto, Mário Augusto Gozzo, Milton Rocha, Paulo Aparecido da Rosa, José Adão dos Santos, José Adilson dos Santos Lima, Marcos Celestino, Vanderlei Liôncio da Silva com a disponibilização da equipe de campo, para a realização das coletas.

Ao Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjak (CVE) por disponibilizar os dados dos casos de esquistossomose.

Aos aprimorandos do Laboratório de Biologia molecular da SUCEN: Thamiris C. Rodrigues, Marcia O. Casotti, Igor L. Sicchi, Beatriz U. Guimaraes, Andrea V. de Souza por toda ajuda nos experimentos e digitação dos dados epidemiológicos. À Thays J. Rossignoli, pela grande ajuda nos experimentos e parceria nos congressos. Aos colegas da pós-graduação: Patrícia M. M. Bermudi e Fabiana M. S. de Souza do laboratório de análises espaciais da FSP/USP, pelas conversas e disposição em me ajudar.

À Aline Nazaré Bortoleto aluna de Iniciação Científica da Faculdade de Saúde Pública da USP pela ajuda nas análises e geocodificação dos endereços, escrita e conferências do artigo de análise espacial.

À Dra. Monica Ammon Fernandez do Laboratório de Malacologia - Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Mangueiras, RJ, Brasil, pela identificação dos exemplares não planorbídeos.

À Letícia Cavalari Pinheiro e Dr. Rafael Gonçalves Teixeira Neto, da FIOCRUZ MINAS por disponibilizar o script da análise do K12 Ripley no programa R.

À Renilda Shimono pela atenção, ajuda nos processos administrativos e de financiamento durante o doutorado.

À Dra. Karin Kirchgatter, Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek e Dr. Thiago Salomão de Azevedo, por todas as críticas e sugestões na avaliação da pré-banca e defesa.

Aos meus pais Valter Sanches Palasio e Vanderli Gardini Palasio, meus irmãos Rafael e Carolina Gardini Sanches Palasio, cunhado Guilherme Lucena, meu noivo Diogo Heitor do Nascimento por sempre estarem ao meu lado e não me deixarem desistir no meio do caminho, que me ajudaram tanto financeiramente quanto emocionalmente, principalmente quando a bolsa de doutorado acabou. Aos meus familiares Lucas Heitor do Nascimento e Roque José do Nascimento por todo incentivo.

Aos meus amigos da faculdade: Cibelly Goulart, Catia Melo, Richard Cardoso e Eduardo Lima Cogheto. À galera da esquina: Ingrid Freitas, Bruna M. Costa, Carla Marchioni, Jaques Guimarães, Douglas Guimarães, Higor Faires Ferreira, Rafael Araujo, por toda amizade, conversas que me acalmaram em momentos de ansiedade. Aos colegas do judô pelo apoio que sempre permitiram relaxar, distrair para continuar.



Equipe da SUCEN; da Regional de Marília, setor de Assis, da base de Ourinhos e do Laboratório de Biologia molecular da sede de São Paulo.

A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.
Albert Einstein

Somente se aproxima da perfeição
quem a procura com constância,
sabedoria e sobretudo humildade.
Jigoro Kano

Palasio, R. G. S. **Padrão de distribuição da diversidade genética molecular e espacial de *Biomphalaria* spp., sua relação com a ocorrência da esquistossomose na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo.** [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

RESUMO

A UGRHI-17 da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema (São Paulo, Brasil) é reconhecidamente uma área de alta biodiversidade de espécies de *Biomphalaria* e possui grande vulnerabilidade a acometimentos ambientais e em saúde, no caso da esquistossomose. O objetivo do estudo foi identificar áreas de maior risco para a ocorrência da esquistossomose utilizando dados de transmissão da esquistossomose e de diversidade genética molecular, associando-os às ferramentas geoespaciais, e com isso estabelecer áreas potenciais para a vigilância malacológica e da infecção em coleções de água doce na região do Médio Paranapanema. Os moluscos do gênero de *Biomphalaria* foram identificados por meio de características morfológicas e moleculares; enquanto os outros grupos taxonômicos (*Drepanotrema*, *Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa* e *Pomacea*) foram identificados por características conchiológicas ou morfológicas. A análise filogenética das espécies de *Biomphalaria* foi realizada por meio da análise de sequências dos genes mitocondriais COI, 16S rRNA e COI+16S. As sequências do gene COI referentes ao trecho DNA *Barcode* foram testadas quanto à similaridade com sequências depositadas no GenBank e analisadas em ABDG, bPTP e GMYC para delimitação de espécies putativas. Na análise espacial foram utilizadas as estatísticas de varredura, Gi e de fluxo. Foram utilizadas as fichas notificação e investigação dos casos de esquistossomose na região de estudo entre 1978-2016. Foi calculado as taxas de incidência e foi avaliado a dependência espacial entre os casos autóctones e importados com a função K12 de Ripley. Foram gerados mapas da distribuição espacial dos caramujos do gênero *Biomphalaria*; dos casos de esquistossomose ocorridos na região de estudo; e da diversidade genética em haplótipos do gene 16S. Além disso, foi realizada modelagem de nicho para estimar cenários futuros de alteração na distribuição dos caramujos, utilizado o algoritmo de máxima entropia. Foram utilizados os dados de variáveis climáticas e topográficas obtidas no WorldClim, HydroSHEDS e TOPODATA e o modelo climático regional HadGEM2-ES do período de 2041-2060, considerando dois cenários de mudança climática possíveis: RCP2.6 e RCP8.5. Foram identificados aglomerados de alto risco para ocorrência de esquistossomose em Ourinhos, Assis e Ipaussu. Entretanto, ao longo dos anos, os casos passaram a ocorrer em baixa densidade em Ourinhos e deixaram de ocorrer nos demais

municípios da região. Dos caramujos coletados, 75.5% eram *Biomphalaria*, 11.2% *Drepanotrema* e 13.3% de outros gêneros não planorbídeos. O modelo de máxima entropia mostrou que há probabilidade futura da espécie *B. glabrata* permanecer nos municípios de Ourinhos e Assis, e uma probabilidade em torno de 50% de a espécie expandir sua colonização a corpos de água doce de outros municípios da região de estudo, isto em função das mudanças climáticas. Os resultados para *B. straminea* mostram que esta espécie tem maior probabilidade de expansão de colonização no futuro, especialmente nos municípios próximos a Ourinhos. A análise filogenética mostrou árvores com cinco ramos monofiléticos com alto suporte estatístico. A diversidade de haplótipos está distribuída de forma diferente em cada um dos cinco *taxa* analisados. Conclui-se, em um dos resultados deste trabalho, que atualmente a esquistossomose, como problema de saúde pública no Médio Paranapanema, está restrita a Ourinhos. Tal fato pode estar relacionado à presença de *B. glabrata* em pontos específicos e à cobertura deficiente do saneamento básico. Desta forma, o estudo contribuiu para eleger áreas prioritárias para o combate aos caramujos e à doença para evitar ou reduzir transmissões futuras nesta região.

Palavras-chave: *Biomphalaria*, esquistossomose, Fluxo gênico, COI, 16S, Filogenia, Modelagem de nicho, Análise espacial, mudança climática.

Palasio, R. G. S. "**Distribution pattern of the molecular and spatial genetic diversity of *Biomphalaria* and its relation with the occurrence of schistosomiasis, region of the Middle Paranapanema, State of São Paulo**" [Doctoral thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019.

ABSTRACT

The UGRHI-17 of the Middle Paranapanema watershed (São Paulo, Brazil) is recognized as an area of high biodiversity of *Biomphalaria* species and great vulnerability to environmental and health impacts for schistosomiasis. The objective of the study is to identify areas of greatest risk for the occurrence of schistosomiasis using transmission data from schistosomiasis and molecular genetic diversity, associating them with the geospatial tools, and thereby establishing potential areas for malacological surveillance and infection in collections of freshwaters in the region of Middle Paranapanema. Molluscs of the genus *Biomphalaria* were identified by morphological and molecular characteristics; while the other taxonomical groups (*Drepanotrema*, *Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa* and *Pomacea*) were identified through conchological or morphological characteristics. Molecular genetic analysis of the species was done through sequence analysis of the mitochondrial genes COI, rRNA16S and COI+16S. The COI gene sequences related to DNA Barcode portions were tested for similarity to sequences deposited in GenBank and analyzed ABDG, BPTP and GMYC for delimiting putative species. In the spatial analysis we used the scan statistics, Gi and flow maps. Reporting and investigation records of cases schistosomiasis in the study regions between 1978 and 2016 were used. Incidence were calculated and the existence of spatial dependence between autochthonous and imported cases was evaluated using Ripley's K12-function. Maps of the spatial distribution of snails of the genus *Biomphalaria*; cases of schistosomiasis occurred in the study region; and the genetic diversity in haplotypes of the 16S gene were generated. In addition, the ecological niche modeling to estimate future scenarios of alteration in the distribution of snails, used the maximum entropy algorithm in MaxEnt software. Climate and altitude data obtained from WorldClim, HydroSHEDS and TOPODATA and the regional climate model HadGEM2-ES from the period of 2041-2060 were used, considering two possible scenarios of climate change: Representative Concentration Pathways - RCP2.6 and RCP8.5. High-risk clusters were identified for the occurrence of schistosomiasis in Ourinhos, Assis and Ipaussu. However, over the years, cases occurred in low density in Ourinhos and ceased to occur in other municipalities in the region. Of the snails collected, 75.5% were *Biomphalaria*, 11.2% *Drepanotrema* and 13.3% of other non-planorbid genera. The maximum entropy model showed that *B. glabrata* is

a future likely to remain in the municipality of Ourinhos and Assis and a probability around 50% of species to expand their colonization to freshwater bodies of other municipality of the study region, due to the climatic changes. The results for *B. straminea* showed that this is the species most likely to expand colonization in the future, especially in the municipalities near Ourinhos. The phylogenetic analysis showed trees with five monophyletic branches with high statistical support. The diversity of haplotypes is distributed differently at each of the five *taxa* analyzed. As one of the results of this work it was concluded that, currently, schistosomiasis as a public health problem in the Middle Paranapanema is restricted to Ourinhos. This may be related to the presence of *B. glabrata* at specific point and poor coverage of basic sanitation. In this way, the study contributed to the selection of priority areas for combating snails and disease in order to avoid or reduce future transmissions in this region.

Key-words: *Biomphalaria*, Schistosomiasis, gene flow, COI, 16S, Phylogeny, MaxEnt, Spatial analysis, climate change.

APRESENTAÇÃO

A estrutura desta tese contém uma introdução sobre a esquistossomose e seus hospedeiros intermediários, com uma visão molecular e de análise espacial, seguida de justificativa, objetivos, material e métodos. O regulamento do programa de Pós-graduação em Epidemiologia (PPG-Epi) reconhece o formato para o trabalho final em coletânea de artigos científicos (resolução CoPGr 6878). Por isso, os resultados e discussão deste trabalho estão estruturados em cinco manuscritos, compostos de introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências, os quais estão nas normas editoriais de cada revista a que foram submetidos. Em seguida das considerações finais da tese, das referências e dos anexos.

O primeiro manuscrito “A esquistossomose na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, é atualmente um problema de Saúde Pública?”, descreve a ocorrência histórica espaço temporal da esquistossomose nas unidades GeoSentinelas na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, em quatro períodos entre 1978 e 2016, e de hospedeiros intermediários (*Biomphalaria* spp.) do período de 2015-2018 em áreas de risco para a infecção. O objetivo principal foi avaliar a importância atual da esquistossomose como problema de Saúde Pública na região do Médio Paranapanema. Este manuscrito foi aceito para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (ANEXO A II).

O segundo manuscrito tem como título “Diversidade de *Biomphalaria* spp. e moluscos límnicos associados em áreas suscetíveis à transmissão da esquistossomose na região do Médio Paranapanema, utilizando ferramentas de análises moleculares e espaciais”. Neste trabalho, o objetivo foi atualizar a carta malacológica da área de estudo com base com identificação morfológica e molecular (DNA *Barcode*) dos caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, além dos exemplares dos gêneros *Drepanotrema*, *Physa*, *Pomacea*, *Melanoides* e *Lymnaea*. Este manuscrito foi submetido à revista Biota Neotropica (ANEXO A IV).

O terceiro manuscrito “Modelagem espacial da distribuição de *Biomphalaria* Preston, 1910, caramujos de água doce, na região do Médio Paranapanema (São Paulo, Brasil)”, objetivou avaliar a distribuição contemporânea com parâmetros ecológicos e prever a distribuição futura das espécies de *Biomphalaria* com base nas mudanças climáticas, utilizando o algoritmo de máxima entropia, com dados de variáveis ambientais (climáticas e topográficas).

O quarto manuscrito “Diversidade genética de espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil” teve como objetivo analisar as variações nos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase I (COI) e 16S rRNA para caracterizar

a diversidade populacional e a distribuição geográfica da diversidade genética de espécies do gênero *Biomphalaria*.

O quinto manuscrito “Associação entre a distribuição das espécies de caramujos hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* e a ocorrência histórica dos casos autóctones, em Ourinhos, SP, Brasil. O objetivo foi reconhecer áreas suscetíveis para a transmissão da esquistossomose a partir da associação entre a distribuição das espécies de *Biomphalaria* hospedeiros intermediários de *S. mansoni* coletados nos anos de 2015 e 2016 e os casos de esquistossomose notificados em Ourinhos entre 2007 a 2016, através de estatística espacial Gi. Do terceiro ao quinto manuscrito não foram ainda submetidos para análise de publicação em revistas científicas, por isso estão no formato da tese.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 ESQUISTOSSOMOSE E OS CARAMUJOS DO GÊNERO <i>BIOMPHALARIA</i>	23
1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISE ESPACIAL EM ESQUISTOSSOMOSE	26
1.3 MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO ESTUDO DE <i>BIOMPHALARIA</i>	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 TIPO DE ESTUDO	35
4.2 ÁREA DE ESTUDO	35
4.3 ANÁLISE ESPACIAL DOS CASOS DE ESQUISTOSSOMOSE	38
4.3.1 Análise de varredura espacial	38
4.3.2 Função cruzada K12 de Ripley	40
4.4 COLETA DE CARAMUJOS.....	41
4.4.1 Caracterização dos Municípios de Coleta Malacológica	42
4.4.2 Identificação Malacológica.....	44
4.4.3 Mapa de distribuição malacológica	45
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DE COI E 16S	45
4.6 SEQUENCIAMENTO.....	46
4.7 ANÁLISE FILOGÊNÉTICA.....	46
4.8 DNA <i>BARCODE</i>	47
4.9 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL	48
4.10 MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICO	49
4.11 TESTE KRUSKAL-WALLIS E ÍNDICES DE DIVERSIDADE DE ESPÉCIES.....	51
4.12 ASSOCIAÇÃO ENTRE HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO E OS CASOS AUTÓCTONES.....	52
5 ÉTICA	54
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 MANUSCRITO 1: A ESQUISTOSSOMOSE NA REGIÃO DO MÉDIO PARANAPANEMA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL, É ATUALMENTE UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA?	55
6.1.1- RESUMO	55
6.1.2- ABSTRACT	56
6.1.3- INTRODUÇÃO.....	57
6.1.4- MATERIAL E MÉTODOS	58
6.1.4.1 Área do estudo	58
6.1.4.2 Fonte de dados	58
6.1.4.3 Análise de dados	59
6.1.5- RESULTADOS	60
6.1.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	68
6.1.7- REFERÊNCIAS	71
6.2 MANUSCRITO 2: BIODIVERSIDADE DE <i>Biomphalaria</i> spp. E OUTROS MOLUSCOS LÍMNICOS ASSOCIADOS EM ÁREAS SUSCETÍVEIS A TRANSMISSÃO DA ESQUISTOSSOMOSE NA REGIÃO DO MÉDIO PARANAPANEMA, UTILIZANDO FERRAMENTAS MOLECULARES E ESPACIAIS.....	77
6.2.1- RESUMO	77
6.2.2- ABSTRACT	78
6.2.3- INTRODUÇÃO.....	79
6.2.4- MATERIAL E MÉTODOS	81
6.2.4.1 Área do estudo e coleta de caramujos	81
6.2.4.2 Identificação morfológica e molecular dos caramujos.....	82

6.2.4.2 Mapa de distribuição malacológica.....	84
6.2.5- RESULTADOS	84
6.2.5.1 Composição taxonômica	84
6.2.5.2 Taxonomia morfológica e molecular integradas.....	86
6.2.5.3 Mapeamento e distribuição dos grupos taxonômicos identificados.....	91
6.2.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	95
6.2.7- REFERÊNCIAS	99
6.3 MANUSCRITO 3: MODELAGEM ESPACIAL DA DISTRIBUIÇÃO DE <i>Biomphalaria</i> PRESTON, 1910, CARAMUJOS DE AGUA DOCE, NA REGIÃO MÉDIA DO PARANAPANEMA (SÃO PAULO, BRASIL).....	105
6.3.1- RESUMO	105
6.3.2- ABSTRACT	106
6.3.3- INTRODUÇÃO.....	107
6.3.4- MATERIAL E MÉTODOS	108
6.3.4.1 Área do estudo	108
6.3.4.2 Teste Kruskal-Wallis e índices de diversidade de espécies.....	111
6.3.4.3 Modelagem de nicho ecológico	112
6.3.5- RESULTADOS	114
6.3.5.1 Análise da biodiversidade de espécies do gênero <i>Biomphalaria</i>	114
6.3.5.2 Mapeamento e modelagem da distribuição de espécies de <i>Biomphalaria</i>	119
6.3.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	122
6.3.7- REFERÊNCIAS	126
6.4 MANUSCRITO 4: DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Biomphalaria</i> (GASTROPODA: PLANORBIDAE) DO MÉDIO PARANAPANEMA, SÃO PAULO, BRASIL.	131
6.4.1- RESUMO	131
6.4.2- ABSTRACT	132
6.4.3- INTRODUÇÃO.....	133
6.4.4- MATERIAL E MÉTODOS	134
6.4.5- RESULTADOS	139
6.4.5.1 Análise da diversidade genética e Filogenética dos genes COI, 16S rRNA e COI+16S.	139
6.4.5.2 Estrutura genética populacional de <i>Biomphalaria</i> spp.....	144
6.4.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	148
6.4.7- REFERÊNCIAS	149
6.5 MANUSCRITO 5: “ASSOCIAÇÃO ENTRE A DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE CARAMUJOS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DO GÊNERO <i>Biomphalaria</i> E A OCORRÊNCIA HISTÓRICA DOS CASOS AUTÓCTONES EM OURINHOS, SP, BRASIL”	153
6.5.1- RESUMO	153
6.5.2- ABSTRACT	154
6.5.3- INTRODUÇÃO.....	155
6.5.4- MATERIAL E MÉTODOS	155
6.5.5- RESULTADOS	159
6.5.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	162
6.5.7- REFERÊNCIAS.....	164
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
8 REFERÊNCIAS	169
9 ANEXO.....	181
9.1 ANEXO A.....	181
9.2 ANEXO B.....	191
10 CURRÍCULO LATTES.....	216

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

- Tabela 1** - População residente em 2010 e população estimada de 2018, por situação do domicílio, com indicação da população urbana e rural, área total e densidade demográfica, segundo os municípios selecionados para a coleta malacológica.....42
- Tabela 2**- Variáveis usadas no modelo ecológico. As temperaturas são expressas em C * 10, precipitações em mm, elevação acima do nível do mar em metros e acúmulo de fluxo em número de células.49

MANUSCRITO 1

- Tabela 1** - Casos autóctones, importados e indeterminados de esquistossomose dos oito municípios autóctones e a soma dos casos dos demais municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema da esquistossomose, estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016).61
- Tabela 2** - Coordenadas geográficas e número de espécimes de *Biomphalaria* coletados em coleções hídricas nos municípios de Ourinhos, Assis e Ipaussu, SP, Brasil, entre 2015 e 2017. *Todos os espécimes de HI foram negativos para a eliminação de cercárias de *S. mansoni*.....63

MANUSCRITO 2

- Tabela 1** - Distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas (cinza escuro) de 275 sequências do gene COI de espécies de *Biomphalaria* coletadas no Médio Paranapanema (São Paulo, Brasil), no período de 2015-2018, usando o modelo Kimura de 2 parâmetros (K2p, Kimura 1980). Os valores foram obtidos em MEGA X..... 87
- Tabela 2** - Índices de similaridade entre as 275 sequências do gene COI (177 sequências identificadas por morfologia e 98 sequências de indivíduos imaturas e morfologia ambígua) de *Biomphalaria* coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018 e as sequências fornecidas pelo Genbank, conforme os métodos ABGD, bPTP e GMYC.88
- Tabela 3** - Diversidade de espécies de planorbídeos coletados em 92 coleções hídricas no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.90

MANUSCRITO 3

- Tabela 1** - Variáveis usadas no modelo ecológico. As temperaturas são expressas em C * 10, precipitações em mm, elevação acima do nível do mar em metros e acúmulo de fluxo em número de células. 113
- Tabela 2** - Quantidade de *Biomphalaria* coletados em 76 coleções hídricas pelo tamanho de coleção hídrica (Extensão da coleção hídrica) e tipo de urbanização, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, no estado de São Paulo, Brasil. 115
- Tabela 3** - Quantidade de *Biomphalaria* coletados em 178 pontos de coletas pelo tipo de habitat, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil..... 116
- Tabela 4** - Índices de diversidade ecológica, *Shannon* (H), *Richness* (R), *Simpson* (λ), para as cinco espécies de *Biomphalaria* para as 76 coleções hídricas que estas espécies foram encontradas, no período de 2015-2018 em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil..... 118

Tabela 5 - Variáveis ambientes de maior importância na análise de PCA. As variáveis que mais contribuirão estão em negrito e estas foram consideradas na modelagem do MaxEnt. .	119
Tabela 6 - Porcentagem da contribuição de cada variável ambiental para o teste final no modelo de MaxEnt (média) de cada espécie no presente, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.	120

MANUSCRITO 4

Tabela 1 - Coordenadas dos pontos de coleta nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. Código GenBank de 275 sequências de COI e 193 sequências de rRNA16S.	136
Tabela 2 - Tabelas com os valores da análise de polimorfismo genético estimado para as 275 sequências de COI, 193 de 16S e 169 dos genes COI e 16S concatenados das espécies de <i>Biomphalaria</i> , identificadas por morfologia, nos cinco municípios de estudo São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, calculados em DnaSP	140
Tabela 3 - Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial rRNA16S calculados em DnaSP a partir de 193 sequências (123 sequências identificadas por morfologia e 70 sequências de indivíduos imaturas e morfologia ambígua) de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> , coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.	145
Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos de 16S entre e dentro das populacional de <i>B. peregrina</i> , <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.	147

MANUSCRITO 5

Tabela 1 - Coordenadas geográficas e número de caramujos coletados/espécies/pontos de coleta nas oito coleções hídricas com o encontro de espécies de <i>Biomphalaria</i> hospedeiros intermediários do <i>S. mansoni</i> no município de Ourinhos, São Paulo, Brasil, no período de 2015-2016.	160
---	-----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Mapa com a distribuição dos países endêmicos para a esquistossomose em 2017.	23
Figura 2 - Ordem cronológica de alguns avanços moleculares.....	29
Figura 3 - Mapa do Brasil (A) do estado de São Paulo com a localização da área de estudo (B); os 55 municípios que possuem sua área total ou parcialmente inseridos na UGRHI – 17, a unidade GeoSentinelas, os cinco municípios onde foram coletados os caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> e os principais rios (C).	35
Figura 4 - Mapa do Brasil (A) do estado de São Paulo com a localização da UGRHI -17 (B); com o índice de tratamento (coletado e tratado) e estação de tratamento de esgotos (ETE) do ano de 2013 segundo os 55 municípios da região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil (C).	36
Figura 5 - Classificação climática da UGRHI -17 do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, segundo os critérios de Koppen.....	37
Figura 6 - Pontos de coletas malacológica em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.....	41
Figura 7 - Locais de coletas no município de Ourinhos, SP, Brasil (A), nas coleções hídricas de Chumbiadinha, Paraíso, Água da Veada, Christoni, Sobra, Furninhas e Furnas no período de 2015 a 2017 e no município de Assis, SP, Brasil (B) na coleção hídrica de Água do café no ano de 2017	43
Figura 8 - Organograma do perfil experimental.....	44

MANUSCRITO 1

Figura 1 - Taxas de incidências dos casos autóctones, importados e indeterminados dos oito municípios com autoctonia da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos de estudo (1978-2016). Taxa de incidência por 1 milhão de habitantes-ano.	62
Figura 2 - Mapas dos municípios de Ourinhos (A) e de Assis (B), São Paulo, Brasil com aglomerados espaciais de casos autóctones, nos períodos de 1978-1988 (A1, B1), 1989-1999 (A2, B2), e 2007-2016 (A3); e aglomerados de casos importados nos períodos de 1978-1988 (A4, B3), 1989-1999 (A5, B4) e 2007-2016 (A6)	64
Figura 3 - Gráfico da análise função K12 bivariada (A). A curva azul continua acima do envelope mostra uma dependência espacial positiva entre os casos importados e autóctones de esquistossomose, linha vermelha limite da dependência espacial e mapas da densidade de Kernel com raio de influência de ~3900 metros mostrando a distribuição dos casos importados (B) e autóctones (C) da unidade GeoSentinelas de esquistossomose do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, no período de 1978-2016.....	66
Figura 4 - Localização da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema no estado de São Paulo e Brasil e mapa com o fluxo dos casos importados de esquistossomose de outros Estados Brasileiros para a área de estudo (A); Municípios que compõem a unidade GeoSentinelas, prioritárias para a vigilância da esquistossomose, SP, Brasil e mapa com o fluxo de casos importados internamente à área de estudo (B) de 1978-2016.	67

MANUSCRITO 2

- Figura 1** - Pontos de coletas planorbídica e malaco fauna associada em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. 81
- Figura 2** - Resultados da amostragem e frequência observada das espécies de *Biomphalaria*, e caramujos dos gêneros *Drepanotrema*, *Physa*, *Pomacea*, *Melanoides* e *Lymnaea*, observados no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. 85
- Figura 3** - Distribuição das 275 sequências do gene COI de *Biomphalaria* coletadas no médio rio Paranapanema (São Paulo, Brasil), no período de 2015-2018, comparadas aos pares, conforme a distância K2p calculada em MEGA X. 87
- Figura 4** – Arvore filogenética Máxima Verossimilhança com o alinhamento de 275 sequências de COI de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas sequências de *outgroup* sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT. As barras em preto indicam as delimitações de espécies com base na distância (ABGD) e baseados em árvore (bPTP e GMYC), respectivamente. As barras coloridas as delimitações baseadas na similaridade das sequências com as sequências do GenBank e Morfologia. 89
- Figura 5** - Distribuição das três espécies hospedeiras intermediárias de esquistossomose do gênero *Biomphalaria*, com a média dos caramujos coletados por ponto, no período de 2015-2018 coletados em Assis (**A**), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (**B**), em Chavantes e Ipaussu (**C**), no estado de São Paulo, Brasil. 92
- Figura 6** - Distribuição das espécies de *B. occidentalis* e *B. peregrina* com a média dos caramujos coletados por ponto, no período de 2015-2018 coletados em Assis (**A**), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (**B**), em Chavantes e Ipaussu (**C**), no estado de São Paulo, Brasil. 93
- Figura 7** - Distribuição do número de caramujos coletados por ponto no período de 2015-2018, em Assis (**A**), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (**B**), em Chavantes e Ipaussu (**C**) no estado de São Paulo, Brasil, dos gêneros *Drepanotrema*, *Lymnaea*, *Physa*, *Melanoides* e *Pomacea* 94

MANUSCRITO 3

- Figura 1** - Mapa do Brasil e estado de São Paulo (**A**); com a localização da área de estudo (**B**); os municípios da UGRHI – 17 do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, presença das espécies de *Biomphalaria* segundo município, referente a levantamentos anteriores e atualizações deste estudo, os principais rios (**C**); e os pontos de coletas do gênero *Biomphalaria* em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis (**D**). 109
- Figura 2** – Gráfico com o número de indivíduos de *Biomphalaria* coletados por coleção hídrica segundo a espécie identificada, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo, Brasil. 115
- Figura 3** - Histograma de frequência dos números de *Biomphalaria* atribuídos as amostras por coleções hídricas (**A**) e por pontos de coleta (**B**) e curva estimada da probabilidade amostral. Curva de rarefação para a riqueza de espécies de *Biomphalaria* (**C**) e o índices de Shannon e Simpson por cada coleção hídrica (**D**), no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil. 117

- Figura 4** – Gráfico com a análise dos componentes principais (PCA) para as cinco espécies do gênero *Biomphalaria*. 119
- Figura 5** - Os mapas mostram a distribuição potencial em formato logístico no presente e no futuro em dois cenários de mudanças climáticas: RCP 2.6 (menor aumento nas emissões de gás de efeito estufa (GEE)) RCP 8.5 (maior aumento nas emissões de GEE), com base no GCM HadGEM2-ES, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil 121

MANUSCRITO 4

- Figura 1** - Pontos de coletas de *Biomphalaria* em 65 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil..... 135
- Figura 2** – Árvore filogenética Máxima Verossimilhança com o alinhamento de 275 sequências de COI de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas sequências de *outgroup* sob modelo GTR em PhyML 141
- Figura 3** - Árvore filogenética correspondentes às 193 sequências rRNA16S de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletados em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018 e duas sequências de *Outgroup* obtidas por Máxima Verossimilhança e modelo de substituição de nucleotídeos GTR..... 142
- Figura 4** - Árvore filogenética construída por máxima verossimilhança sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT para 169 sequências concatenadas do gene de COI e 16S rRNA mais duas sequências do *outgroup*. 143
- Figura 5** - Mapas da distribuição dos haplótipos do gene 16S rRNA gerados no DnaSP das espécies de *B. occidentalis*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. peregrina* nos municípios de Assis, Ribeirão do Sul (Rib. Sul), Ourinhos (Our), Chavantes (Chv) e Ipaussu (Ipa), São Paulo, Brasil no período de 2015-2018. 146
- Figura 6** - Rede de relações entre as sequências 16S rRNA de *B. glabrata* coletadas em Ourinhos (córregos Christoni-Chr, Jacu-Jc, Lageadinho-Lgd e Sobra-Sb) e Assis (córrego Fortuninha-Ftn), no período de 2015-2018, geradas em TCS..... 148

MANUSCRITO 5

- Figura 1** - Mapa da América do Sul, Brasil e o estado de São Paulo (A), destacando em (B) o município de Ourinhos e em (C) a distribuição das espécies de hospedeiros intermediários (HI) do *S. mansoni* identificados em 2015-2016, as coleções hídricas de Ourinhos (D), os principais LPs (PIS), porcentagem de moradores atendidos com rede de esgoto segundo setor censitário e estação de tratamento de esgotos (ETE)..... 156
- Figura 2**- Número de espécimes de hospedeiros intermediários coletadas entre 2015-2016 em 8 coleções hídricas, segundo localização nas áreas urbana, periurbana e rural, no município de Ourinhos, SP, Brasil. 159
- Figura 3** – (A) Mapa da densidade de Kernel (raio de influência de 759m) mostrando a distribuição dos casos autóctones de esquistossomose e aglomerados significantes na estatística G_i de casos autóctones em torno de pontos com o hospedeiro intermediário (focos), no período de 2007-2016, na área urbana de Ourinhos, São Paulo, Brasil. (B) Gráfico com os valores dos aglomerados significantes de casos autóctones em torno dos pontos do córrego Christoni (1- \triangle , 2- \circ , 3- \bullet , 4 - \blacktriangle) e do ponto do córrego Água da Veada (5- $+$) com presença de hospedeiros intermediários. Gráfico da análise função K12 bivariada (C), em Ourinhos, São Paulo, Brasil, no período de 2007-2016; valores significantes acima da linha horizontal ($G_i[d] > 3.28, P < 0.05$)..... 161

ANEXOS

ANEXO A	
ANEXO A I - Carta de ética	181
ANEXO A II - Comprovante submissão e aceite para publicação do Artigo 1	182
ANEXO A III - Mapas do município de Ipaussu, São Paulo, Brasil com aglomerados espaciais de casos importados, no período de 1978-1988 (A) e de casos autóctones no período de 1989-1999 (B).	183
ANEXO A IV - Comprovante submissão do Artigo 2	184
ANEXO A V - Teste do DNA <i>Barcode</i> GMYC	185
ANEXO A VI - Curvas que representam um modelo diferente para os preditores ambientais com a maior contribuição (A), segunda maior contribuição (B) para cada espécie, com saída logística, uma medida da probabilidade de presença.	188
ANEXO A VI - Árvores filogenéticas construídas por máxima verossimilhança para 177 e 123 sequências do gene de COI e rRNA16S de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> , identificadas morfológicamente, coletadas em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.....	189
ANEXO A VII - Árvore filogenética construída por máxima verossimilhança para as 106 sequências concatenadas do gene de COI e rRNA16S de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> identificadas morfológicamente, coletadas em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018	190
 ANEXO B	
ANEXO B I - Área plantada ou destinada à colheita das lavouras temporárias, permanentes e áreas de agropecuária nos 55 municípios da UGRHI-17 do Médio Paranapanema, ano 2017.	191
ANEXO B II – Pontos de coleta sempre negativos para malacofauna no total de 396 pontos nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.	192
ANEXO B III - Coletas de <i>Biomphalaria</i> e Malaco Fauna associada em 258 pontos de 92 coleções hídricas nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.	196
ANEXO B IV - Quantidade de pontos e amostras das coletas de <i>Biomphalaria</i> em 114 córrego coletado nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.	200
ANEXO B V - Casos autóctones, importados e indeterminados de esquistossomose dos oito municípios autóctones da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016).....	202
ANEXO B VI - Casos importados e indeterminados de esquistossomose dos demais municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016).....	204
ANEXO B VII Coordenadas geográficas dos 258 pontos de coletas de <i>Biomphalaria</i> e Malaco Fauna associada em 92 coleções hídricas nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil e os numero de referência das sequências de COI do GenBank.	206
ANEXO B VIII - Teste do DNA <i>Barcode</i> , ABDG	210
ANEXO B IX - Teste do DNA <i>Barcode</i> , bPTP	212
ANEXO B X - Tabela dos grupos de haplótipos das 275 sequências do gene mitocondrial COI e 193 sequências de rRNA16S, calculada em DnaSP.	214
ANEXO B XI - Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial COI a partir das 275 sequências.....	215

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE E OS CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria*

A esquistossomose é uma infecção parasitária, que tem como agentes etiológicos os trematódeos que compõem o gênero *Schistosoma*, sendo que seis espécies desse gênero infectam o homem. A doença tem sido documentada desde o início do século XX em 78 países no mundo: na África, nas Américas do Sul e Central, na Europa, na Ásia e Oceania (WHO, 2013). Em 2017, 52 países foram apontados como alvos para necessidade de tratamento em massa para a esquistossomose, com impacto sobre aproximadamente 219 milhões de pessoas. Neste grupo está incluído o Brasil. A interrupção da transmissão da infecção foi confirmada em 19 países; sete países ainda requerem uma avaliação do *status* da transmissão (Figura 1) (WHO, 2018).

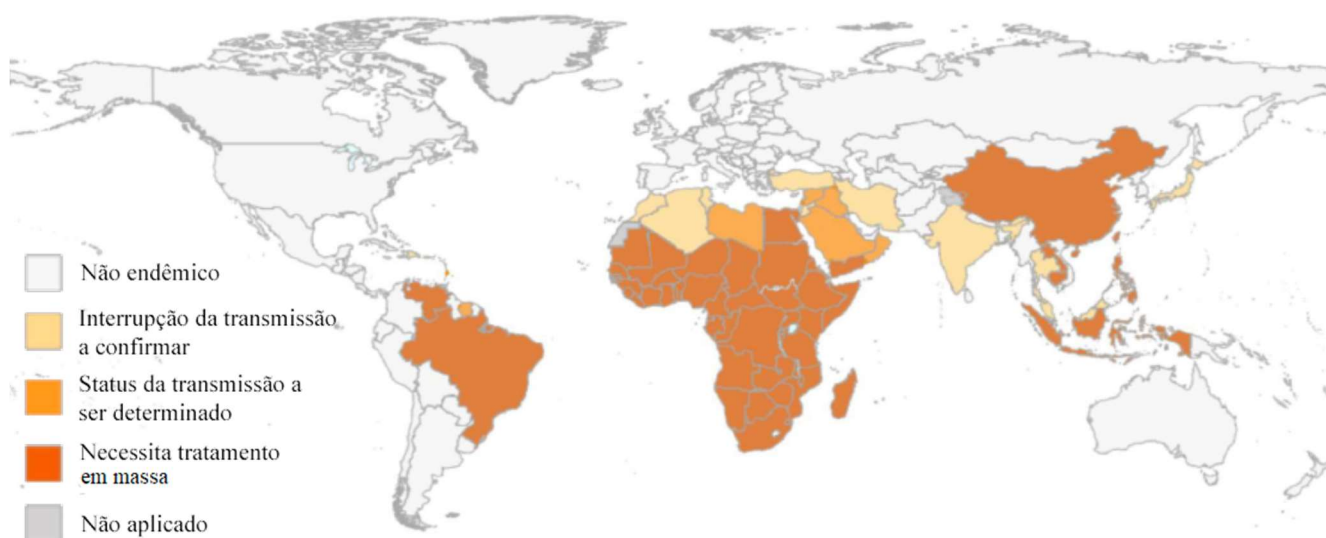


Figura 1 - Mapa com a distribuição dos países endêmicos para a esquistossomose em 2017.

Fonte: WHO, 2018.

Na América Central e Sul a única espécie de trematódeo responsável pela doença é *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), sendo estimado que 25 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de contrair a doença (PAHO, 2010; NOYA et al., 2015). Do total dos 10 países considerados endêmicos na América Central e Sul, apenas o Brasil e Venezuela ainda precisam de tratamento em massa para a esquistossomose (WHO, 2018).

A esquistossomose é uma doença considerada negligenciada, que ocorre em regiões relacionadas com as precárias condições de saneamento básico, com a presença de hospedeiro intermediário do parasita trematódeo, onde é considerada um grave problema de saúde em localidades de alta endemicidade (ROLLEMBERG et al., 2011).

No Brasil, em 19 Estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), aproximadamente 1,6 milhões de indivíduos estão infectados com *S. mansoni* (WHO, 2018). Em 2012 a positividade calculada para *S. mansoni* no Brasil foi de 4,5%, entretanto, estes valores são considerados uma aproximação da prevalência real, pois utiliza como denominador uma parcela representativa da população que realizou os exames coproscópicos (589.906 indivíduos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em 2015, no Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni (INPEG) a prevalência da proporção de positivos diminuiu para 0,99% no Brasil (IC95% - 0,20 a 1,78) (197.564 indivíduos analisados nas 27 Unidades de Federação e no Distrito Federal) e a proporção de positivos na região sudeste do Brasil foi de 2,35% (KATZ, 2018). Segundo NOYA et al. (2015), a prevalência calculada para unidades federativas do Brasil endêmicas para a esquistossomose, varia entre valores de 0.04% (Rio Grande do Norte) a 6.55% (Sergipe). Estes autores estimam para a população do estado de São Paulo (SP) prevalência de 0.11%, no período de 2011-2014 (NOYA et al., 2015). E em 2015 prevalência em SP foi considerada de 0.04% (KATZ, 2018).

Na América Latina estão descritas 26 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Pulmonata: Basommatophora: Planorbidae), sendo no Brasil, três delas suscetíveis a *S. mansoni* em condições naturais: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) (CARVALHO et al., 2008a; CALDEIRA et al., 2016).

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas simultâneos, que se reproduzem por meio de fecundação cruzada ou autofecundação (PARAENSE, 1955; JARNE et al., 1993, VIANEY-LIAUND, 1997). Possuem capacidade de sobrevivência em estado fisiológico basal (estivação/anidrobiose) após longos períodos de seca (TUAN et al., 1984; TUAN e SIMÕES, 1989) e capacidade de resistência e sobrevivência em ambientes muito poluídos (CVE, 2007). Além disso, tem facilidade de dispersão e colonização de novos habitats, especialmente a espécie *B. straminea* (WOODRUFF et al., 1985; POINTIER et al., 2005).

A biodiversidade de espécies deste gênero nas águas superficiais que acumulam ou escoam na superfície terrestre como por exemplo rios, riachos, lagos, lagoas, brejos, córregos, valetas, açudes e outros (MELO et al., 2008), do estado de São Paulo representa 67% da biodiversidade de espécies identificadas no Brasil: *B. peregrina* (d'Orbigny, 1835), *B. schrammi*

(Crosse, 1846), *B. intermedia* (Paraense e Deslandes, 1962), *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. occidentalis* Paraense, 1981, além das três espécies hospedeiras intermediárias naturais de *S. mansoni* (TEODORO et al., 2010; OHLWEILER et al., 2010).

O hospedeiro intermediário de *S. mansoni* melhor adaptado ao desenvolvimento e veiculação desse parasita é *B. glabrata* (MAGALHÃES e DIAS, 1973; PARAENSE, 2001). *B. tenagophila* e *B. straminea* têm índices de infecção natural e experimental a *S. mansoni* mais baixos em relação a *B. glabrata* (JANNOTTI-PASSOS e SOUZA, 2000).

No estado de São Paulo a esquistossomose ocorre com baixa endemicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Entre os locais endêmicos para esquistossomose no estado de São Paulo, destaca-se a região do Médio Paranapanema, em pontos específicos na fronteira com o estado do Paraná. Essa região é historicamente marcada pela transmissão da esquistossomose, com casos autóctones assinalados desde 1952 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu e Palmital (FERREIRA e MEIRA, 1952), tornando-se, desde então, um importante problema de saúde pública nesta área do Estado (CHIEFFI e WALDMAN, 1988). Os casos autóctones foram associados à ocorrência da espécie *B. glabrata*, encontrada naturalmente infectada com *S. mansoni* em Ourinhos (REY, 1952; MAGALHÃES e DIAS, 1973). Esta espécie foi assinalada pela primeira vez em Ourinhos em 1919 (PARAENSE, 1986) sendo que ainda hoje pode ser encontrada em abundância em coleções hídricas nesse município (TUAN, 2009). Também são encontradas no Médio Paranapanema as outras duas espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*: *B. tenagophila* e *B. straminea*, além das espécies *B. occidentalis* e *B. peregrina*, encontradas ocasionalmente em simpatria nesta região (PIZA et al., 1972; KAWAZOE et al., 1980; TELES e VAZ, 1987; TELES, 2005; TUAN, 2009).

Os municípios de Ourinhos, Assis e Ipaussu têm coleções de água doce que foram focos de esquistossomose importantes nas décadas de 70-80 (TELES, 2005; CVE, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em Ourinhos, no período de 1981-2013 foram diagnosticados mais de 88% dos casos de esquistossomose do total de casos da URGHI-17 do Médio Paranapanema (CVE, 2011ab; SINAN, 2018), o que representa tanto do ponto de vista da distribuição das espécies quanto aos aspectos epidemiológicos da esquistossomose, representa uma problemática complexa.

1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISE ESPACIAL EM ESQUISTOSSOMOSE

O mapeamento da distribuição de espécies de *Biomphalaria* no estado de São Paulo foi feito na década de setenta por meio de métodos de mapeamento tradicionais, cujos resultados estão sintetizados em um documento único denominado “Carta Planorbídica do estado de São Paulo” (PIZA et al., 1972). Foram identificados os gêneros da família Planorbidae, que inclui o gênero *Biomphalaria* e *Drepanotrema* Fisher e Crosse, 1880 em 571 dos 645 municípios existentes no Estado. E posteriormente foram feitos mapeamentos nos levantamentos da distribuição das espécies nas regiões administrativas do Estado que até 1984, eram divididas em onze regiões (VAZ et al., 1983, 1985, 1986, 1987, 1992; TELES et al., 1988).

O levantamento da região do Médio Paranapanema não chegou a ser sistematizado em uma única carta planorbídica regional, como feito para outras regiões do estado de São Paulo. Há na literatura trabalhos sobre a distribuição de planorbídeos na região do Médio Paranapanema, que são compostos por informações pouco precisas e restritas a poucas coleções hídricas da região. A espécie *B. occidentalis* foi registrada nos córregos de Christoni, Água da Veada, Furnas, Chumbeadinha e Jacu no município de Ourinhos; córrego Capim em Ribeirão do Sul; córrego no bairro Barbado em Florínea; margem de rio do bairro da Limeira em Salto Grande, além de registro em outros municípios como Assis, Ipaussu, Cândido Mota, Chavantes, Cruzália, Gália, Iepê, Maracaí, Marília, Palmital, Piratininga, Quatá, Rancharia, Santa Cruz do Rio Pardo e São Manuel (TELES, 1988, 1989; TUAN, 2009; OHLWEILER et al., 2010).

A espécie *B. peregrina* foi encontrada no córrego São Luiz em Ipaussu; vala no bairro São José, vala Mondecir, Chumbeadinha em Ourinhos; açude Tiradentes em Ribeirão do Sul (TELES, 1988; TUAN, 2009); e em mais 33 municípios da região do Médio Paranapanema: Águas da Santa Bárbara, Agudos, Assis, Avaré, Bernardino de campos, Botucatu, Cabrália Paulista, Campos Novos Paulista, Cândido Mota, Cerqueira César, Chavantes, Echaporã, Florínea, Gália, Ibirarema, Iepê, Itatinga, Lençóis Paulistas, Lutécia, Maracaí, Marília, Ocaçu, Óleo, Palmital, Paraguaçu Paulista, Piratininga, Platina, Quatá, Rancharia, Ribeirão do Sul, Salto Grande, Santa Cruz do Rio Pardo e São Manuel (VAZ, 1989; OHLWEILER et al., 2010).

A espécie *B. glabrata* foi descrita nas coleções hídricas Água de Jacu, Água do Matão, córrego da Figueira em Assis; córrego Cabiuna na divisa de Assis e Cândido Mota; córregos Christoni, Jacu, Jacuzinho, Furninhas e Fundo em Ourinhos (REY, 1952; PIZA e RAMOS, 1960; CORREIA et al., 1962; PEREZ e SANTOS, 1966; PEREZ et al., 1968; RAMOS e PIZA, 1971; SUCEN, 1980; TELES, 1988; TUAN, 2009); e nos municípios de Chavantes, Ibirarema, Ipaussu, Palmital, Ribeirão do Sul, Florínea, Santo Grande, Santa Cruz do Rio Pardo e São

Pedro do Turvo, mas sem informações específicas das localidades (PIZA e RAMOS, 1962; PIZA et al., 1972; TELES e VAZ, 1987; TELES, 2005). Interessante observar que a espécie *B. glabrata* no estado de São Paulo, está concentrada na região do Médio Paranapanema (CVE, 2007).

A espécie *B. straminea* foi registrada nos municípios no córrego Capim em Ribeirão do Sul; córrego de Águas da Sobra em Ourinhos, represa Capivara, fazenda Boa Vista em Iepê (TELES, 1988, 1996, 2005), na represa da rua Padre Diogo, Manuel da Cunha e tanque na fazenda São João no município de Salto Grande (TELES e VAZ, 1987; TELES, 1996), e nos municípios de Botucatu e Rancharia (OHLWEILER et al., 2010).

B. tenagophila teve registro nas coleções hídricas de Água da Veada, Christoni, Fundo e Barreirinha no município de Ourinhos e nas coleções hídricas de São Luiz e Bela Vista no município de Ipaussu (TELES, 1988; TUAN, 2009; SUCEN, 2012). Esta espécie também foi registrada nos municípios de Assis, Botucatu, Chavantes, Florínea, Gália, Garça, Ibirarema, Lençóis Paulistas, Lutécia, Marília, Palmital, Salto Grande, Santa Cruz do Rio Pardo e São Manuel sem registro preciso das coleções hídricas (VAZ, 1989; TELES, 1989, 2005, OHLWEILER et al., 2010).

Recentemente, os mapeamentos passaram a utilizar dados informatizados (GAZZINELLI e KLOOS, 2007). STENSGAARD et al. (2013, 2019) enfatizaram a importância da análise espacial como ferramenta de apoio ao controle da esquistossomose e na previsão de quadros de expansão ou redução da distribuição geográfica de caramujos em função das alterações climáticas globais.

As técnicas de análise espacial vêm sendo sistematicamente utilizadas para analisar padrões de distribuição de espécies de caramujos do gênero *Bulinus* e *Biomphalaria* que colonizam regiões específicas da África (SIMOONGA et al., 2009; MOSER et al., 2014). Os Sistemas de Informação Geográfica (SIGs) vêm sendo utilizados como ferramenta nos estudos em saúde pública desde a década de 90. Trata-se de uma tecnologia computacional que permite analisar uma grande quantidade de dados e permite identificar, dentro de inúmeras outras análises, os riscos ambientais em uma dada área geográfica (MEDRONHO, 1995; VINE et al., 1997; OPAS, 1996; CARVALHO et al., 2000; AUSTIN, 2002; WALLER e GOTWAY, 2004).

No Brasil, a utilização dos SIGs aplicados em estudos de distribuição de caramujos hospedeiros intermediários de *S. mansoni* em relação a ocorrência da esquistossomose, foram principalmente utilizados em áreas de alta endemicidade no estado da Bahia (BAVIA et al., 1999; CARDIM et al., 2011), Pernambuco (ALMEIDA et al., 2003; GOMES et al., 2012, 2018),

Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 2009, 2010, 2012; FONSECA et al., 2014) e Sergipe (BARBOZA et al., 2012; SANTOS et al., 2016).

Estudos utilizando os SIGs em áreas de baixa endemicidade para a transmissão da esquistossomose são raros, como no estado de São Paulo. Um exemplo a ser citado é o estudo realizado por ANARUMA FILHO et al. (2010) no município de Campinas. Os autores conseguiram por meio de interpretação fotografias aéreas, hierarquizar os sítios de transmissão da esquistossomose correlacionado a distribuição da doença, distribuição de caramujos, as características da paisagem e das variáveis socioambientais, resultando na identificação de *hotspots* endêmicos, indicando os locais ou sítios onde a vigilância e controle devem ser severos e constantes. E o trabalho de TELES et al. (2014) no município de Bananal no qual fizeram um mapeamento dos focos de parasitas com as coordenadas dos endereços de residência dos pacientes que foram diagnosticados, tratados e dos caramujos infectados.

Os SIGs podem utilizar como fonte de dados variáveis climáticas como temperatura e pluviosidade, além de dados de distribuição de *Biomphalaria* registrados na literatura, possibilitando, como por exemplo, o uso do modelo estatístico MaxEnt, formular e testar hipóteses explicativas para a distribuição dos três hospedeiros intermediários no Brasil baseados nas diferenças climáticas encontradas nas diversas regiões brasileiras (SCHOLTE et al., 2012; BARBOSA et al., 2016, CARVALHO et al., 2017; GOMES et al., 2018). Outros exemplos de sua aplicação são os estudos da distribuição da espécie *Biomphalaria* no Uruguai, Argentina (RUMI et al., 2017), China e na África (PEDERSEN et al., 2014; HABIB et al., 2016; YANG et al., 2018; FAN et al., 2018).

MARENGO et al. (2012, 2014) fizeram estudos de previsão de aumento de precipitação para as próximas décadas no Brasil, em função das alterações climáticas globais, que provavelmente terão como consequência o aumento do volume de água de todas as bacias hidrográficas brasileiras. Esta alteração no regime das chuvas pode agravar o problema das enchentes, modificando as planícies de inundação onde vivem os caramujos. Com isso, as espécies de *Biomphalaria* podem cruzar as áreas naturais de distribuição geográfica, que poderá ampliar as áreas de distribuição e com isso expandir para novas áreas o risco de transmissão da esquistossomose (GITHEKO et al., 2010), e assim modificar a situação de risco dessa enfermidade.

1.3 MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO ESTUDO DE *Biomphalaria*

Estudos sobre os polimorfismos genéticos vêm sendo utilizados de modo crescente em caramujos do gênero *Biomphalaria* (LANGAND et al., 1999; VIDIGAL et al., 2000, 2004ab, 2013; CAMPBELL et al., 2000; DEJONG et al., 2003; WETHINGTON et al., 2007; TUAN e SANTOS 2007; TUAN et al., 2012; STANDLEY et al., 2014; PALASIO et al., 2017, 2018).

Os primeiros trabalhos moleculares com *Biomphalaria* datam da década de 70 (MALEK e FILE, 1971; MULVEY e VRIJENHOEK, 1981), que foram feitos por meio da análise do padrão de migração eletroforética de isoenzimas. O crescente número de trabalhos com *Biomphalaria* se deve principalmente a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al. 1985; MULLIS e FALOONA, 1987) e da enzima termoestável denominada Taq Polimerase (SAIKI et al., 1988), entre outros avanços (Figura 2) que facilitaram o processo de identificação das sequências de DNA.

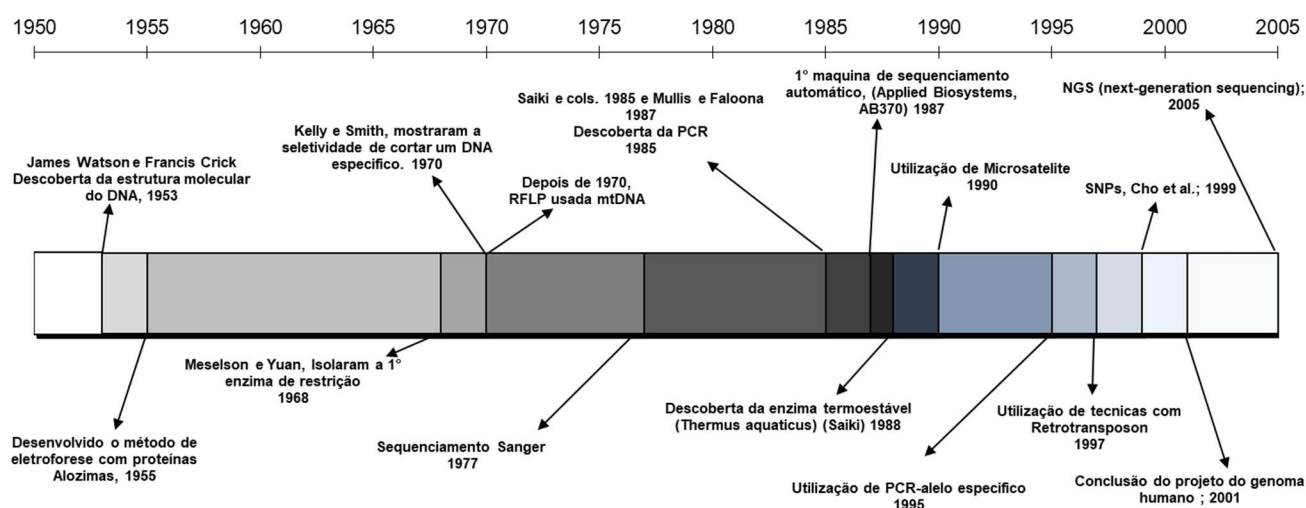


Figura 2 - Ordem cronológica de alguns avanços moleculares.

Na literatura existem trabalhos com *Biomphalaria* com marcadores aleatórios como a técnica de DNA polimórfico amplificado a partir de trechos da molécula de DNA (RAPD) (MULVEY e VRIJENHOEK, 1982; VIDIGAL et al., 1994; VERNON et al, 1995; KNIGHT et al., 1999; LANGAND et al., 1999) e técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (KNIGHT et al., 1998).

Posteriormente os trabalhos utilizavam marcadores específicos como por exemplo os espaçadores internos (ITS1 e 2) que são marcadores nucleares que codificam o RNA ribossômico associados ou não com a técnica RFLP (CALDEIRA et al., 1998, 2000, 2004; VIDIGAL et al., 1998, 2000, 2002, 2004ab; SPATZ et al., 1999; DEJONG et al, 2003;

JANNOTTI-PASSOS et al., 2006; TUAN e SANTOS, 2007; TEODORO et al., 2010; CALDEIRA et al., 2016; PINTO et al., 2016; PALASIO, 2018).

Em 1999 foi descrito o primeiro *Loci* de microssatélite de *Biomphalaria*, sendo sequências repetidas do DNA nuclear, que são marcadores polimórficos (JONES et al., 1999). Em seguida surgiram outros trabalhos com este marcador mostrando alta diversidade genética populacional do gênero *Biomphalaria* (CHARBONNEL et al., 2000; MAVÁREZ et al., 2000, 2002; WETHINGTON et al., 2007; BLOUIN et al., 2013; THIELE et al., 2013).

Também estão relatados na literatura estudos de *Biomphalaria* com marcadores mitocondriais: 16S rRNA e Citocromo C Oxidase I (COI) (CAMPBELL et al., 2000; DEJONG et al., 2001; POINTIER et al., 2005; STANDLEY et al., 2014; TUAN et al., 2012; PALASIO et al., 2017, 2018); e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (KNIGHT et al., 2009; TENNESSEN et al., 2015). A molécula completa de DNA mitocondrial foi sequenciada em *B. glabrata*, (DEJONG et al., 2004), *B. tenagophila* (JANNOTTI-PASSOS, 2007), *B. pfeifferi*, *B. sudanica* e *B. choanomphala* (ZHANG et al., 2018), com aproximadamente 13 mil nucleotídeos contendo 37 genes (CARVALHO et al., 2018b). Em relação ao DNA Nuclear, o genoma de *B. glabrata* foi estimado ser aproximadamente 916 Mb (GREGORY, 2003), com 18 cromossomos haplóides (GOLDMAN et al., 1984, TUAN e SIMÕES, 1989) e finalmente sequenciado em 2013 (Acesso do GenBank APKA01000001-APKA01408321) (ADEMA et al., 2017).

Os marcadores moleculares são ferramentas importantes para o entendimento da história populacional (migração, endogamia, seleção natural) e evolutiva das populações, auxiliando sobremaneira na compreensão dos mecanismos de manutenção e expansão da esquistossomose (VIDIGAL et al., 2013).

Além disso, técnicas moleculares são utilizadas para a identificação de espécies, pois muitas vezes os exemplares coletados no campo são muito jovens para realizar a identificação morfológica específica. Variações morfológicas de *B. tenagophila*, *B. peregrina* e *B. glabrata* responderam, por exemplo, por 21% de erros em *vouchers* depositados em coleção malacológica (AGUIAR-SILVA et al., 2014).

Estudos têm demonstrado a importância da análise de polimorfismos moleculares mitocondriais e nucleares na identificação espécie-específica e na caracterização de linhagens dentro de uma mesma espécie, os quais não são facilmente diagnosticadas por diferenças morfológicas (VIDIGAL et al. 2000; TUAN e BORTOLATO, 2001; DEJONG et al. 2003; WETHINGTON et al. 2007; TUAN e SANTOS, 2007; TUAN et al., 2012; PALASIO et al., 2017). A premissa do DNA *Barcode* é que a variação genética entre espécies diferentes exceda a variação genética dentro de uma mesma espécie (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007;

CASIRAGHI et al., 2010). Emprega-se um trecho do gene mitocondrial citocromo C oxidase I (COI), também conhecido como fragmento Folmer, com tamanho entre 500-600 pares de bases (HEBERT e RATNASINGHAM, 2003).

A análise molecular por DNA *Barcode* demonstra que os *taxa* de *Biomphalaria* que a taxonomia tradicional assume como únicos, apresentam divergência intraespecífica significativas o suficiente, sugerindo a subestruturação das espécies em clados genéticos diferenciados (PALASIO et al., 2017). Esta diferenciação genética contrasta com a similaridade fenotípica encontrada no estudo morfológico feito em paralelo à análise molecular, demonstrando que os caracteres morfológicos utilizados na delimitação de espécies de *Biomphalaria* são insuficientes para descrever a biodiversidade natural das espécies. Esses resultados abrem o campo para novos estudos para testar a hipótese de unidades genéticas distintas pertencerem a diferentes espécies ou subespécies.

Além disso estes marcadores moleculares também são adequados para investigar aspectos populacionais de *Biomphalaria* (CAMPBELL et al., 2010; RUMI et al., 2017). Marcadores moleculares mitocondriais e enzimáticos mostraram que em populações naturais de *B. glabrata* (MULVEY e VRIJENHOEK, 1982), *B. pfeifferi* (LANGAND et al., 1999; CAMPBELL et al., 2010), *B. peregrina* (RUMI, et al., 2017) e *B. tenagophila* (MASCARA e MORGANTE, 1991; TUAN e BORTOLATO, 2001; TUAN et al., 2012) a diversidade genética está distribuída em subpopulações, com diferenças genéticas significativas entre elas. Estudos genéticos desenvolvidos a partir de populações naturais de caramujos do gênero *Biomphalaria* coletados em São Paulo, mostram variação populacional relacionada com a área de amostragem e origem das linhagens colonizadoras (PALASIO et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é um agravo em saúde pública no mundo, distribuída em 78 países endêmicos no passado. Atualmente, em 19 países foram confirmados a interrupção da transmissão da esquistossomose, entretanto sete países ainda não foram avaliados. O Brasil é um dos 52 países em que ainda há transmissão da infecção (WHO, 2018), integrando o conjunto de países cujo roteiro proposto pela Organização Mundial de Saúde pode eliminar a doença até 2020 (WHO, 2013).

No estado de São Paulo, a região do Médio Paranapanema é uma área reconhecida historicamente com casos esquistossomose. O desenvolvimento da forma larvária do parasita *S. mansoni* infectante ao homem se dá em caramujos de água doce pertencente ao gênero

Biomphalaria. Como já mencionado as coleções hídricas situadas no curso médio do rio Paranapanema são favoráveis à proliferação das três espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, além de outras espécies refratárias ao parasita. São ecossistemas urbanos, peri-urbanos e rurais com alta concentração de córregos, valas, riachos e lagoas, algum deles associados com a transmissão da esquistossomose. Além disso, são áreas suscetíveis a enchentes, quando consideramos as mudanças climáticas futuras (MARENGO et al., 2014).

O levantamento das espécies de caramujos e seu mapeamento são fundamentais para o monitoramento malacológico na perspectiva do controle da doença. A identificação da biodiversidade de espécies no espaço geográfico tem interesse imediato para as ações de saúde pública e conhecimento acadêmico. A identificação das espécies, feita tradicionalmente por caracteres anatômicos, deixa em aberto várias questões de natureza taxonômica, criando a oportunidade de desenvolvimento e aplicação de novos métodos, principalmente moleculares, que hoje estão integrados à malacologia médica como ferramentas fundamentais de análise.

O DNA *barcode* é uma metodologia aplicada amplamente a vários organismos, com uma base de desenvolvimento sólida em *Biomphalaria*. A aplicação deste método à uma fauna malacológica diversificada e complexa, encontrou no Médio Paranapanema um cenário ideal para uma avaliação mais robusta, pois nesta região existem centenas de ecossistemas aquáticos continentais favoráveis à proliferação dos caramujos.

A dinâmica populacional de *Biomphalaria* é um aspecto crítico na modelagem e controle da esquistossomose e está relacionada com a drenagem dos sistemas de água doce, ecologia e adaptação dos caramujos ao ambiente aquático. A fragmentação dos habitats naturais de *Biomphalaria*, somada à capacidade fisiológica (TUAN e SIMÕES, 1989, TELES e MARQUES, 1989) e reprodutiva dos caramujos (ESCOBAR, 2011) em sobreviver às variações demográficas são fatores que podem explicar a estruturação da variabilidade genética total de *Biomphalaria* em grupos de sequências mitocondriais e nucleares geneticamente diferenciadas (MULVEY e VRIJENHOEK, 1982; LANGAND et al., 1999; MAVÁREZ et al., 2002, TUAN e SANTOS, 2007, TUAN et al., 2012).

Além disso, o Médio Paranapanema é uma região onde prolifera *B. glabrata*, espécie reconhecidamente como melhor adaptada ao desenvolvimento de *S. mansoni* (MAGALHÃES e DIAS, 1973; PARAENSE, 2001). As coleções hídricas colonizadas por *B. glabrata* foram associadas à transmissão da esquistossomose no passado; atualmente há uma lacuna de conhecimento sobre a distribuição da malacofauna. A cartografia tradicional usada para o mapeamento da distribuição das espécies exigia renovação, em função da grande quantidade de dados e do desenvolvimento das metodologias de análise espacial. E através das análises

espaciais e estatísticas atualmente é possível reconhecer as áreas de risco de esquistossomose e estabelecer áreas prioritárias para o desenvolvimento de ações de controle da doença.

Integrados à epidemiologia da esquistossomose, todos os aspectos contribuem para uma renovação do conhecimento sobre o risco de transmissão atual e futura da esquistossomose na região deste estudo.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Identificar áreas de maior risco para a ocorrência da esquistossomose utilizando dados de transmissão da esquistossomose e de diversidade genética molecular do gênero *Biomphalaria*, associando-os às ferramentas geoespaciais, e com isso estabelecer áreas potenciais para a vigilância malacológica e da doença em coleções de água doce na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, com histórico de transmissão da doença.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Atualizar a carta malacológica com base em parâmetros ecológicos, genéticos, epidemiológicos e geográficos.
2. Descrever e avaliar a relação entre a distribuição espacial de casos de esquistossomose e dos caramujos do gênero *Biomphalaria*.
3. Construir mapas de distribuição de nichos de espécies de *Biomphalaria*, por meio de modelos espaciais.
4. Descrever o padrão de distribuição genético-populacional de *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. occidentalis* e *B. glabrata*, por meio de sequências dos genes COI e 16S.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo que integra análise espacial, taxonomia e genética de populações de caramujos do gênero *Biomphalaria* da região do Médio Paranapanema aos aspectos ecológicos, geográficos e epidemiológicos dos casos de esquistossomose de modo a construir mapas temáticos e explicar o padrão de distribuição atual e futura de caramujos e da doença.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo pertence a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Médio Paranapanema (UGRHI-17) e está localizada na região Oeste e Sudoeste do estado de São Paulo e ao Norte do estado do Paraná, Brasil (Figura 3AB) A UGRHI-17 do Médio Paranapanema do estado de São Paulo é composta por 55 municípios, com 26 destes com área parcialmente inserida nesta área (CBH-MP, 1999, 2018a) (Figura 3C).

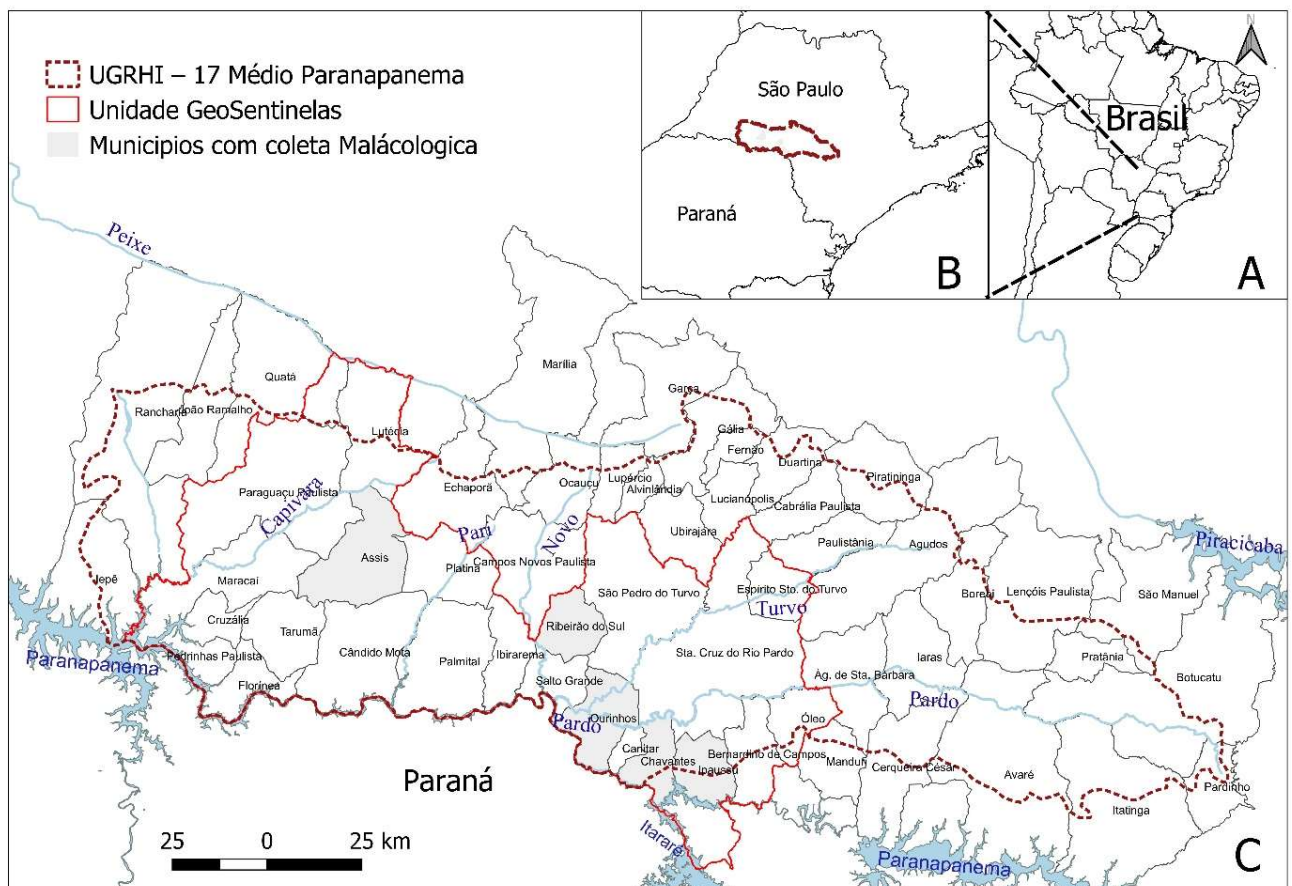


Figura 3 - Mapa do Brasil (A) do estado de São Paulo com a localização da área de estudo (B); os 55 municípios que possuem sua área total ou parcialmente inseridos na UGRHI - 17, a unidade GeoSentinelas, os cinco municípios onde foram coletados os caramujos do gênero *Biomphalaria* e os principais rios (C). Fonte: IBGE, 2010abc.

Esta região com o total dos 55 municípios possui área de 25.613 km², tendo 16.749 km² localizados somente dentro da UGRHI-17 (IBGE, 2010a; CBH-MP, 2018ab) e a população é de 690.692 habitantes (7.7% em áreas rurais). Destacam-se os municípios de Ourinhos e Assis que apresentam os maiores contingentes populacionais (IBGE, 2010a; ANA, 2016).

Quanto ao saneamento básico, segundo dados do ano 2013 da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA) em parceria com Agência Nacional de Água (ANA), 47 dos 55 municípios da região de estudo apresentam Índice de tratamento (Coletado e tratado) acima de 80% (ANA, 2017), as melhores condições de saneamento são dos municípios de Assis, Cruzália, Lutécio e São Pedro do Turvo (Figura 4ABC). Entretanto a cobertura da rede de esgoto está na sua maioria restrita às áreas urbanas da região. Apenas 8% dos moradores das áreas rurais são atendidos com a rede de esgoto e o restante dos moradores rurais o esgotamento sanitário é via: fossa séptica e rudimentar em 80%; vala, rio, lago ou outro escoadouro em 12% (IBGE, 2010a).

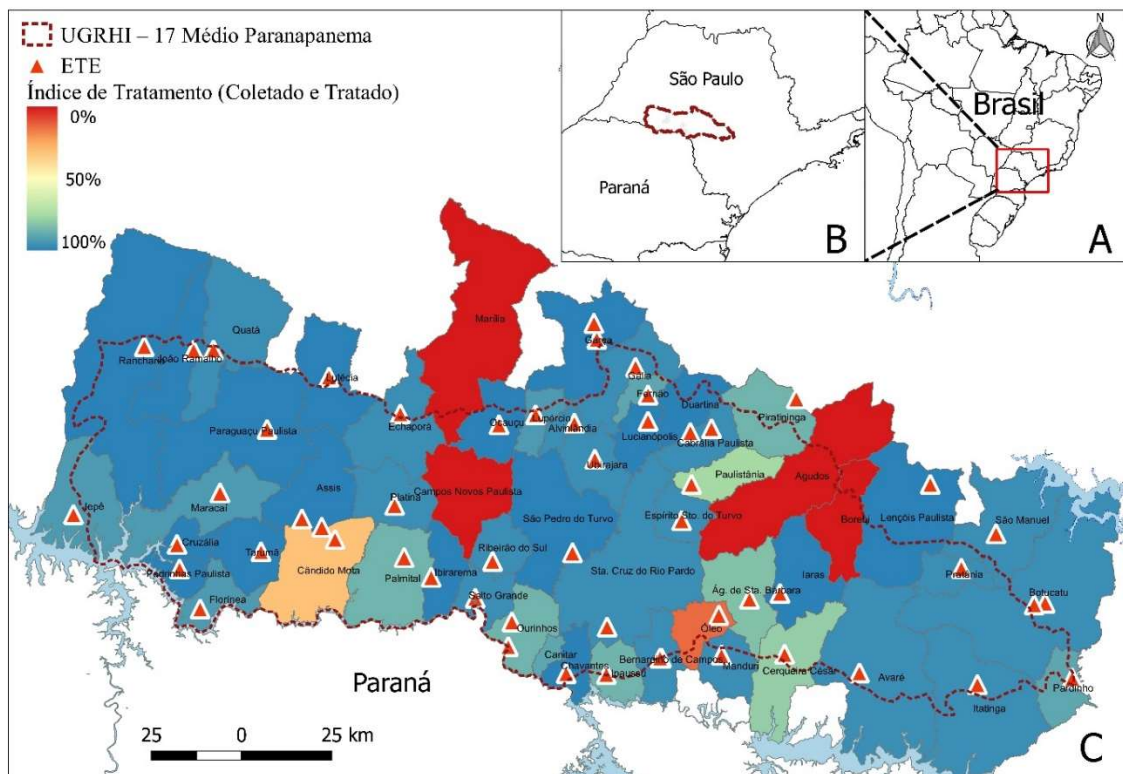


Figura 4 - Mapa do Brasil (A) do estado de São Paulo com a localização da UGRHI -17 (B); com o índice de tratamento (coletado e tratado) e estação de tratamento de esgotos (ETE) do ano de 2013 segundo os 55 municípios da região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil (C). Fonte: SNSA/ANA, 2017.

Esta área do Médio Paranapanema é banhada principalmente pelos rios Paranapanema e Pardo e seus afluentes rio Turvo, Pari, Novo e Capivara (Figura 3C). Ao longo dos rios Paranapanema e o rio Pardo há áreas inundadas pela construção de reservatórios (CBH-MP,

2018ab). O rio Paranapanema nasce na Serra de Agudos Grande percorre até a foz do rio Itararé dentro do território paulista, deste ponto em diante encontra-se na fronteira sudoeste entre os estados de São Paulo e Paraná até desembocar no rio Paraná (ANA, 2016), com o total 929 km extensão, este rio percorre 328 km de extensão na região Médio Paranapanema (CBH-MP, 2018c). O rio Pardo possui 264 km de extensão e seus principais afluentes são o rio Turvo (130 km de extensão) seguido pelo rio Novo (77 km de extensão) (SAFRE e MANZIONE, 2015). O rio Pari tem extensão de 60 km e o rio Capivara 76 km de extensão (CPTI, 1999).

Além de uma extensa hidrografia, a área de estudo possui uma paisagem bastante antropomorfizada, com 79.7% do território com áreas destinadas à agropecuária. Cerca de 50% das áreas são ocupadas por lavouras temporárias e permanentes. As culturas predominantes são cana-de-açúcar (22,6%), soja (10,9%), milho (9,9%) e café (1,1%) (IBGE, 2017ab) (ANEXO B I, pg. 191). A vegetação natural remanescente ocupa aproximadamente 8% de área da UGRHI-17. São remanescentes de cerrado próximos aos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis (PERON e PIROLI, 2011; CBH-MP, 2018abc).

Segundo a classificação climática de Koppen, na região de estudo é predominante o clima tipo “Cfa”, temperado brando, chuvoso com verão quente, porém algumas áreas do UGRHI-17 foram classificadas como tipo “Cfb”, com verão fresco (CBH-MP, 1999; PIROLI, 2013; ALVARES et al., 2013) (Figura 5). Os meses considerados mais secos são os meses de junho a agosto e os mais úmidos são os meses de dezembro a fevereiro (ANA, 2016).

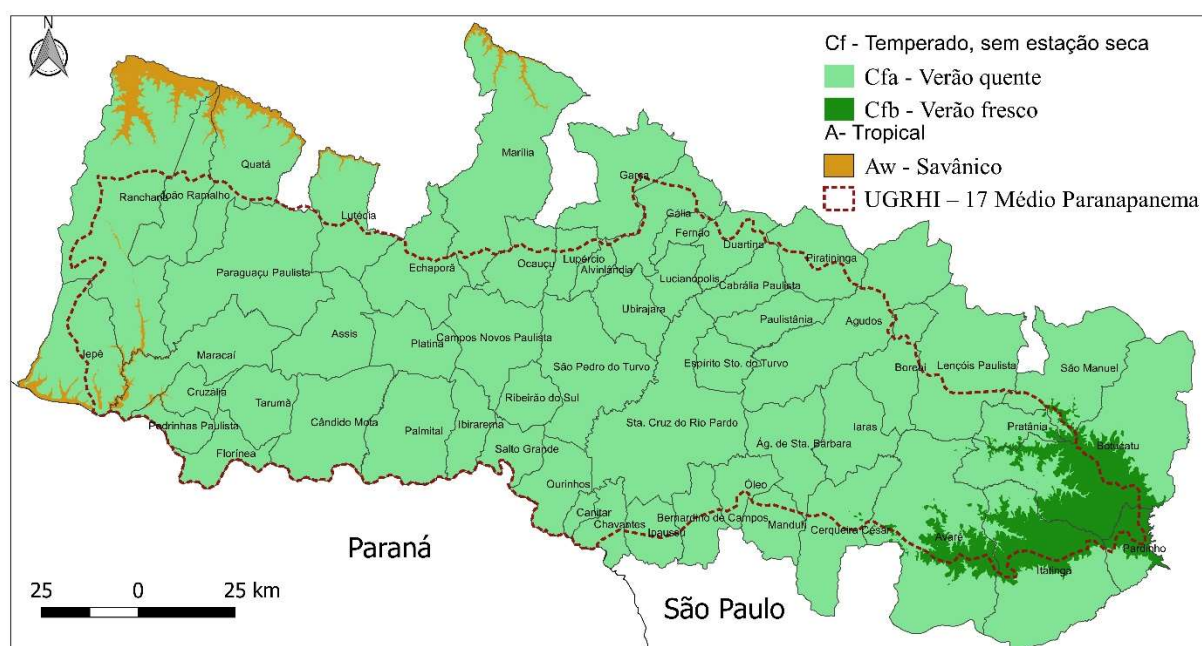


Figura 5 - Classificação climática da UGRHI -17 do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, segundo os critérios de Koppen. Fonte: ALVARES et al., 2013.

A área de estudo é composta por 55 municípios da região do Médio Paranapanema, onde foi feita a análise de modelagem ecológica. Nesta região existem áreas prioritárias para a vigilância da esquistossomose, abrangendo 25 dos 55 municípios do Médio Paranapanema (Figura 3C) (EDUARDO, 2008). Estes municípios englobam uma parte significativa das ocorrências autóctones de esquistossomose desta região (CVE, 2011ab; SINAN, 2018). Nesses 25 municípios foram feitas as análises espaciais dos casos de esquistossomose. As pesquisas malacológicas foram feitas em coleções hídricas nos municípios com maior importância histórica para esquistossomose no passado, especificamente nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul, Assis e Chavantes.

4.3 ANÁLISE ESPACIAL DOS CASOS DE ESQUISTOSSOMOSE

4.3.1 Análise de varredura espacial

Informações sobre os casos de esquistossomose (data de notificação, endereço de residência, informações sobre o local provável de infecção (LPI) e classificação epidemiológica), no período de 1978-2016 dos 25 municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, foram obtidas por meio de consulta aos bancos de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjak (CVE) e pelo Serviço Regional 11 da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (SES). As informações populacionais e os materiais cartográficos foram obtidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) (IBGE, 2010abc; SMA, 2013a).

Os conjuntos de indicadores referentes aos números de casos autóctones, importados, e indeterminados, foram analisados em quatro intervalos de tempo: de 1978 a 1988; 1989 a 1999; 2000 a 2006; e de 2007 a 2016. O primeiro e segundo períodos correspondem ao intervalo de tempo em que as fichas de notificação e investigação eram organizadas manualmente e depositadas na SUCEN. Nos terceiros e quartos períodos, os dados das fichas foram digitados, respectivamente nos sistemas de informação depositados no SINAN-W e SINAN-NET, com a ressalva de que os casos de 2000 a 2006 estavam sem informação da classificação epidemiológica, provavelmente, devido à interrupção de investigação epidemiológica da esquistossomose na região.

Foram calculados, para os municípios com ocorrência autóctone da esquistossomose, as taxas de incidência dos casos autóctones, importados e indeterminados, segundo os períodos

considerados. Os casos de esquistossomose foram geocodificados a partir de seus endereços de residência registrados nas fichas de notificação com a ferramenta *batch geocoding*, que utiliza-se o Google Earth (ZWIEFELHOFER, 2008) e padronizados com base nos endereços presentes nos mapas de logradouros dos municípios de estudo. Isto foi realizado pela interpolação linear do número do endereço a um ponto no segmento do logradouro correspondente, que está situado entre dois pontos que definem a faixa de numeração naquele segmento de logradouro (ZIMMERMAN et al., 2006). As coordenadas geográficas obtidas após a geocodificação foram importados no formato "latitude/longitude (datum WGS-84) e visualizados no programa versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018).

Para cada um dos municípios com autoctonia, os casos importados e autóctones foram computados segundo setores censitários e períodos considerados. Isso foi realizado por meio do complemento MMQGIS (MINN, 2018) com operação geográfica *spatial join* disponível no QGIS. A identificação das áreas de alto risco para ocorrência de esquistossomose foi feita com base em estatísticas de varredura (Scan) disponíveis no programa SaTScan versão 9.4 (KULLDORFF, 2015), que detecta aglomerados no espaço e tempo. Para tal, também foram consideradas as populações do meio do período e as coordenadas dos centroides dos setores censitários. Essas três informações foram transformadas em tabelas no formato *csv*, para serem executadas no programa SaTScan, todas as três tabelas com uma coluna em comum (Código do IBGE do Setor censitário). A tabela com os casos constou com as covariáveis: Código, Número de casos, ano da notificação, a tabela de população: código, número total da população do setor censitário e o ano e a tabela dos centroides com: código, Latitude e longitude dos centroides do setor censitário. Estas tabelas foram organizadas segundo o tipo dos casos (Importados e autóctones) e segundo cada período de estudo (1978 a 1988; 1989 a 1999 e de 2007 a 2016).

A análise de varredura espacial foi feita utilizando o modelo discreto de Poisson, nas seguintes condições: tamanho máximo de cada aglomerado igual a 50% da população, aglomerados com formato circular e uso do método de Monte Carlo, com 999 repetições, para estimativa das probabilidades, tempo de agregação por ano, tipo de análise *Purely Spatial* e varredura para encontrar somente áreas de risco elevado *High Rates* (KULLDORFF, 1997, 2016). Isto resultou na identificação de aglomerados com alto risco de ocorrência da infecção, com a obtenção dos riscos relativos (RR), que correspondem à razão entre a taxa de incidência dentro e fora dos aglomerados, além dos respectivos valores de p , sendo considerados significantes os aglomerados com valores de p menores do que 5%. Posteriormente, os

resultados do SatScan em formato *csv* foram unidos a mapas de setores censitários no formato *shapefile*, e confeccionados mapas temáticos no programa QGIS.

4.3.2 Função cruzada K12 de Ripley

A relação entre a distribuição espacial dos casos autóctones e importados de esquistossomose de 1978-2016 da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, foi avaliada utilizando-se a função cruzada K12 de Ripley (TEIXEIRA-NETO et al., 2014). Isso permitiu, por meio das coordenadas dos pontos, a avaliação da existência ou não de dependência espacial entre as duas distribuições (independentes quando curva estiver dentro do envelope e dependentes quando estiver fora do envelope da função). No caso de dependência espacial, a relação pode ser positiva (quando a curva está acima linha superior do envelope), ou seja, exibem atração (os casos autóctones e importados tendem a ocorrer próximos) ou negativo (quando a curva está abaixo da linha inferior do envelope), ou seja, exibem repulsão (os dois tipos de casos tendem a ocorrer longe) (LOTWICK e SILVERMAN, 1982; TEIXEIRA-NETO et al., 2014). Além disso, também foi avaliado com a função K12 a relação entre a distribuição dos casos autóctones de esquistossomose de 2007-2016 e dos hospedeiros intermediários coletados no período de 2015-2016 no município de Ourinhos.

Estes procedimentos foram realizados no programa R versão 3.2.2 (R. DEVELOPMENT, 2015), com os pacotes *Splancs* (BIVAND et al, 2017). Para isso foi utilizado o arquivo da área de estudo delimita no formato de *shapefile* de polígono e as coordenadas dos casos no formato de UTM.

O resultado da função K12 permitiu verificar o raio de influência. Esta informação e o mesmo banco de dados utilizado para esta função, posteriormente foram utilizados para estimar a densidade de Kernel, que é uma análise do padrão de distribuição espacial para verificar intensidade menor e maior da probabilidade da ocorrência dos casos na área geográfica, procedimento realizado com o pacote *Splancs* no programa R.

Com as informações dos LPI's das fichas e utilizando a ferramenta *Flowmapperv* 0.4.1 (GÜLLÜOĞLU, 2016) extensão do QGIS, foram gerados mapas de fluxo das procedências dos casos importados dos estados Brasileiros e o fluxo interno entre os municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema.

4.4 COLETA DE CARAMUJOS

Os espécimes de caramujos de água doce foram coletados nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul, Assis e Chavantes em um total de 114 coleções hídricas, contabilizando 654 pontos (Figura 6, ANEXO B II, III pg. 196), em toda a extensão de cada uma das coleções hídricas de água doce. A coleta foi feita com concha de captura conforme metodologia padronizada pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2008). As coletas foram feitas nos meses de março, junho, setembro e dezembro de 2015 a 2018. Todos os pontos foram georreferenciados com aparelho GPS Garmin ®Etrex, com margem de erro exato de +/- 3,6 metros (12 pés).

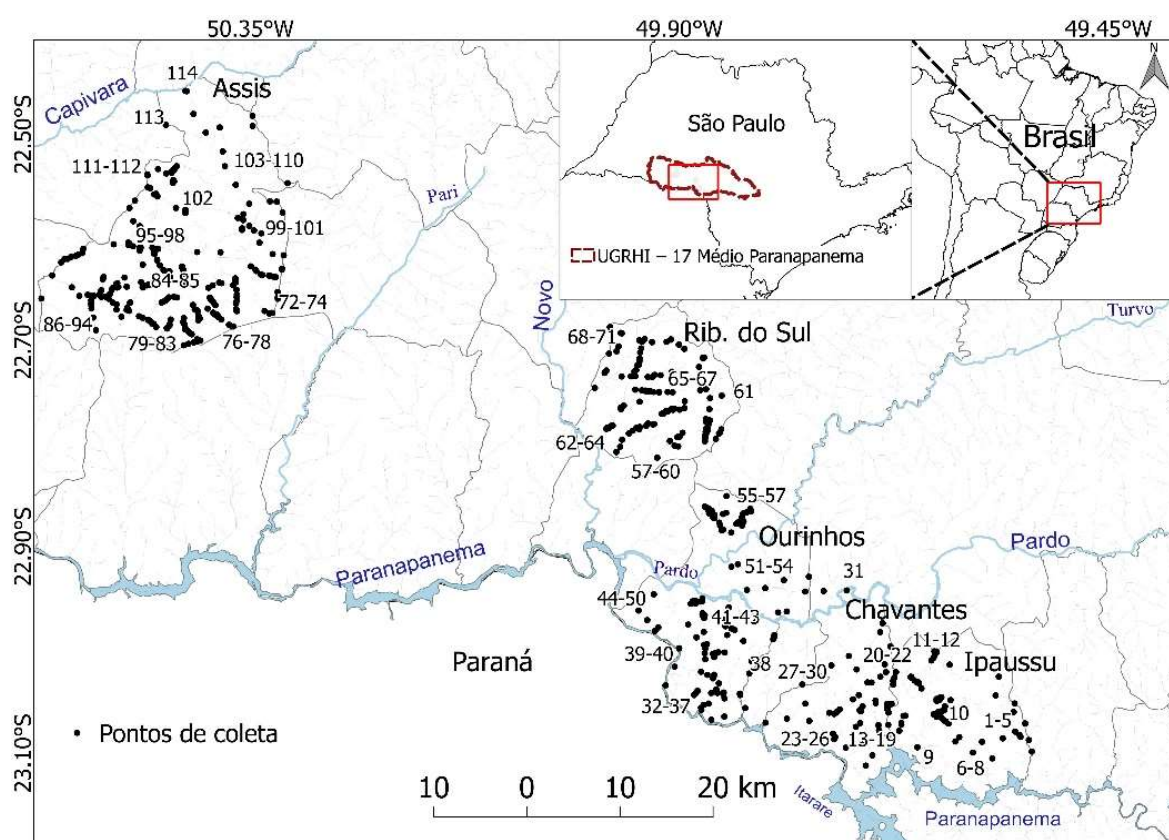


Figura 6 - Pontos de coletas malacológica em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. * números corresponde às coleções hídricas, ANEXO B IV, pg. 200.

A localização e os limites das coleções hídricas, principais e seus tributários menores foram obtidos em mapas físicos, conforme apresentado em cada mapa municipal local. Para fornecer uma estimativa fidedigna da diversidade malacológica, as amostras foram obtidas em intervalo entre os pontos de no mínimo de 250m e no máximo de 1000m, cobrindo desta forma toda a extensão da coleção hídrica, em cada uma das 114 coleções hídricas, totalizando 654 pontos de amostragem. Como as coleções de água alvo deste estudo apresentaram variações

nas extensões (Km), as amostras foram obtidas em no mínimo um e no máximo 44 pontos de coleta (ANEXO B IV, pg. 200).

4.4.1 Caracterização dos municípios de coleta malacológica

As características da população e área total dos cinco municípios selecionados para a coleta malacológica estão na Tabela 1.

Tabela 1 - População residente em 2010 e população estimada de 2018, por situação do domicílio, com indicação da população urbana e rural, área total e densidade demográfica, segundo os municípios selecionados para a coleta malacológica.

Município	2018 População estimada	2010			Área total Km ²	Densidade Demográfica*
		Residente	Urbana	Rural		
Chavantes	12.418	12.114	11.139	975	188,727	64,40
Ipaussu	14.869	13.663	12.588	1.075	209,554	65,17
Ribeirão do Sul	4.542	4.446	3.295	1.151	203,248	21,83
Ourinhos	112.711	103.035	100.374	2.661	296,820	347,78
Assis	103.666	95.144	90.991	4.153	460,609	206,70

Fonte: IBGEa, Censo Demográfico 2010, IBGE, 2018. * Hab./Km²

No município de Ipaussu o principal rio que o permeia é o Paranapanema. As coletas foram feitas em 16 coleções hídricas em 68 pontos em junho, setembro e dezembro de 2015, março de 2016 e 2017 e junho de 2018.

Em Chavantes os principais rios que o permeiam são: o rio Paranapanema ao sul e o rio Pardo ao norte do município. As coletas foram feitas em 18 coleções hídricas em 46 pontos, três coleções hídricas estão localizadas na fronteira dos municípios de Ipaussu e Chavantes. As coletas foram realizadas em junho, dezembro de 2015, dezembro de 2016 e março e dezembro de 2017.

No município de Ourinhos os principais rios que o permeiam são: rio Paranapanema ao sul do município, rio Pardo e Turvo que cortam o município. As coletas foram feitas em 26 coleções hídricas em 141 pontos no município, sendo que a coleção hídrica de Ribeirão Grande está localizada em dois municípios em Ourinhos e Ribeirão do Sul. As coletas foram feitas em junho, setembro, dezembro de 2015, março, junho, dezembro de 2016 e março, junho, setembro e dezembro de 2017 em valas, lagos, banhado e córregos (Figura 7).



Figura 7 - Locais de coletas no município de Ourinhos, SP, Brasil **(A)**, nas coleções hídricas de Chumbiadinha, Paraiso, Água da Veada, Christoni, Sobra, Furninhas e Furnas no período de 2015 a 2017 e no município de Assis, SP, Brasil **(B)** na coleção hídrica de Água do café no ano de 2017.

No município de Ribeirão do Sul o principal rio que o permeia é o rio Novo localizado ao sudoeste do município. As coletas foram feitas em 14 coleções hídricas em 136 pontos. As coletas foram realizadas em junho a dezembro de 2015, junho, setembro, dezembro de 2016 e dezembro de 2017.

No município de Assis o principal rio que o permeia é o rio Capivari localizado ao nordeste do município. As coletas foram feitas em 43 coleções hídricas em 263 pontos. As coletas foram realizadas em junho, setembro, dezembro de 2017 e junho de 2018.

4.4.2 Identificação Malacológica

Após os caramujos coletados, os indivíduos capturados foram embalados em gaze seca e encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SUCEN (LBBM) para identificação no nível de gênero usando caracteres conchiológicos. Após a identificação conchiológica apenas os caramujos do gênero *Biomphalaria* foram expostos à luz artificial durante 4 horas para estimular a liberação de cercárias de *S. mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Considerou-se amostra o *pool* de caramujos coletados em cada um dos pontos de coleta por período. De cada uma das amostras com a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria*, distinguíveis por exame conchiológico, foi separada uma subamostra de um até cinco exemplares adultos e/ou jovens, para a identificação morfológica e molecular conforme preconizado em metodologia para pesquisa de caramujos aplicada ao programa de controle de esquistossomose, que prioriza a identificação da espécie colonizadora da coleção hídrica por análise de uma pequena fração da população total de indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) (Figura 8).

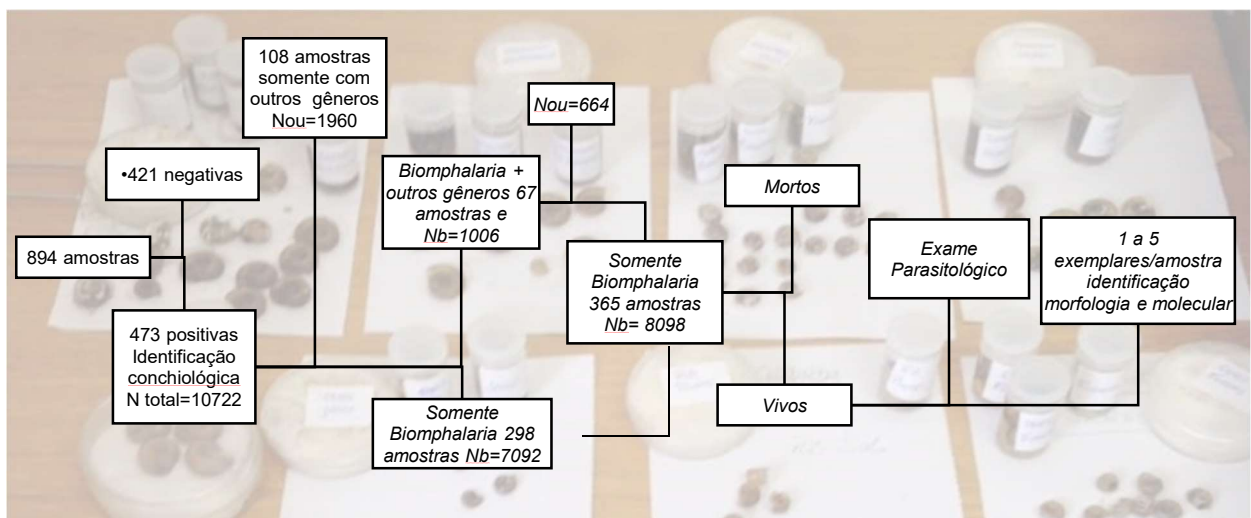


Figura 8 - Organograma do perfil experimental. Nou = N° de outros gêneros límnicos Nb = N° de *Biomphalaria*

O processo de identificação morfológica dos caramujos do gênero *Biomphalaria* consistiu, primeiramente, na separação das partes moles dos caramujos de suas conchas após relaxamento do musculo columelar do animal, em água a temperatura de 70 °C. Em seguida uma porção da região podal entre 1-10 mm, foi excisada de caramujos adultos e alguns jovens para a identificação molecular. Os restantes das partes moles foram mantidos em solução RAILLET-HENRY por um período mínimo de três dias, sendo a seguir os exemplares dissecados (DESLANDES, 1959), e posteriormente identificados ao nível de espécie por meio de características morfológicas do aparelho reprodutor (PARAENSE, 1975; 1981).

As peças (aparelho reprodutor) utilizadas para identificação do gênero *Biomphalaria* foram mantidas como *vouchers* em tubos com fixador RAILLET-HENRY, no Laboratório Biologia Molecular da SUCEN (LBMSU), identificados com os números: LBMSU-670-674, 675-722, 727-829, 864-899, 935-957, 973-977, 1007-1026, 1042-1063, 1094-1099 e 1118-1252. Os *vouchers* dos caramujos dos outros gêneros foram depositados no Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose - LRNEM, do Instituto Oswaldo Cruz, com número LRNEM-NA77/17-108/77 e 193/17-198/17) (Anexo VII).

4.4.3 Mapa de distribuição malacológica

Depois de identificados ao nível de gênero e espécie; foram indexadas a cada espécie os dados referentes as coordenadas geográficas específicas de cada ponto de coleta. Estas informações possibilitaram a compilação de mapas temáticos da distribuição das espécies de *Biomphalaria* e outros grupos malacológicos presentes na área de estudo. Estes procedimentos foram realizados no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018). Os materiais cartográficos com camadas de rios e setores censitários foram obtidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) (IBGE, 2010ab, 2010c; SMA, 2013a).

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DE COI E 16S

Da porção da região céfalo-podal dos espécimes do gênero *Biomphalaria* foi extraído o DNA genômico em *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit*, conforme instruções do fabricante. O DNA genômico purificado de cada indivíduo foi submetido à amplificação a protocolos específicos de amplificação dos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase I (COI) e 16S. O material genômico resultante da extração e purificação se encontra preservado em freezer à temperatura de -20°C no LBMSU.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador MJResearch®. As reações de COI e 16SrRNA foram feitas com 10-100 ng de DNA, 200 µM de cada nucleotídeo dNTP's, 0,5 µM de cada primer, 25 µM de MgCl₂, 10 µL de 5x buffer, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega), água MilliQ em volume que complete 50 µL.

Para amplificação do COI foram utilizados os *primers* LCO- 5' GGTCACAAATCATA AAGATATTG3'/HCO-5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3' (FOLMER et al., 1994). Condições de amplificação manteve as seguintes temperaturas: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min. a 95°C, seguido de 35 repetições de 1 min. a temperatura 95°C, um min. a 45°C e 1 min. e meio a 72°C mais uma extensão final de 5 min. a 72°C, conforme protocolo DNA *Barcode* (HERBERT et al., 2003).

Para amplificar o 16S rRNA foram utilizados os *primers* Ar -5'CGCCTGTTTATCAAAA ACAT3'/ Br-5'CCGGTCTGAACTGAGATCACGT3' (PALUMBI et al., 1991) e um protocolo com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min. a 94°C, seguido de 35 repetições de 30 seg. a temperatura 94°C, 30 seg. a 54°C e 1 min. a 72°C, mais uma extensão final de 5 min. a 72°C, conforme protocolo descrito em TUAN et al. (2012).

4.6 SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados de COI e 16S foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,4% com *GelRed*®, em luz ultravioleta e purificados utilizando o kit QIAquick PCR *Purification* (Qiagen®) antes de seguir para a etapa de sequenciamento. A concentração de DNA foi estimada usando a *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) e produtos com no mínimo 20 ng de DNA foram sequenciados no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems®), no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan.

4.7 ANÁLISE FILOGÉNÉTICA

Os eletrocromatogramas das fitas *forward* e *reverse* dos genes COI e 16S rRNA foram visualizados e analisados em Chromas (Technelysium Pty Ltd.). As sequências *forward* foram alinhadas em MAFFT versão 7 (KATO et al., 2017) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) sob o parâmetro Q-INS-I altamente rigoroso; as sequências foram visualmente corrigidas em BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). As sequências foram analisadas individualmente no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para a obtenção dos valores de similaridade entre a sequência alvo e as sequências previamente depositadas no GenBank.

Para a análise da diversidade genética e filogenética foram usados grupos de sequências alinhadas dos genes COI e 16S rRNA (16S) além de um conjunto de sequências alinhadas de

um mesmo indivíduo com ambos os genes concatenados (COI + 16S), de animais previamente identificados morfológicamente, e as sequências de espécimes imaturos (Im) e com morfologia ambígua (ma). Para concatenar estas sequências foi usado o programa SeaView 4 (GOUY et al., 2010).

Os índices de polimorfismo genético dos genes COI, 16S rRNA e COI+ 16S rRNA foram calculados com o *software* DnaSP (LIBRADO e ROZAS, 2009). Foram estimados os valores de diversidade gênica e desvio padrão relacionados aos haplótipos mitocondriais (h, Hd), a diversidade de nucleotídeos (π) com correção Jukes-Cantor (NEI, 1987, equations 10.5) e o número médio de diferenças entre nucleotídeos entre pares de sequências (k).

As análises filogenéticas foram feitas com os três grupos de sequências (COI, 16S e COI+16S), mais duas sequências dos caramujos africanos das espécies *B. stanleyi* (Smith, 1888) e *B. choanomphala* (Martens, 1879) (DQ084850 e 58: 16S rRNA, HM768906 e DQ084837: COI), ambas utilizadas como *outgroup*.

A análise filogenética foi feita tendo como base o princípio de Máxima-Verossimilhança (ML) por algoritmos implantados no *software* PHYML 3.2 (GUINDON e GASCUEL 2003), que usa o método heurístico NNI para a obtenção da árvore inicial e busca exaustiva (SSR) para obtenção da árvore com maior valor de verossimilhança. Os valores de suporte para os ramos foram obtidos por método paramétrico *approximate Likelihood Ratio Test* (aLRT,) associado ao método não-paramétrico Shimodaira-Hasegawa (SH) (SHIMODAIRA e HASEGAWA, 1999, ANISIMOIVA et al. 2011). As análises foram feitas sob modelo *General Time Reversible* (GTR). As árvores obtidas foram visualizadas em Treeview (PAGE, 2001).

4.8 DNA *BARCODE*

Para a análise por métodos de delimitação de espécies em unidades taxonômicas (DNA *Barcode*), foram utilizadas as sequências de COI de espécimes previamente identificadas morfológicamente e as sequências de espécimes imaturos e com morfologia ambígua. Para isso, foram usados os seguintes testes estatísticos: i) ABGD (PUILLANDRE et al., 2012) que usa a distância como parâmetro para inferência do *Barcode gap*; ii) GMYC (FUJISAWA e BARRACLOUGH, 2013), cujo algoritmo usa modelos de especiação e coalescência para inferência de espécies putativas; e iii) bPTP (ZHANG et al., 2013) que calcula a maior probabilidade de ramos por meio de análise *bayesina*.

Os resultados baseados na distância genética entre as sequências foram obtidos na versão *on-line* do *software* ABGD (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). Os resultados em modelo GMYC (FUJISAWA e BARRACLOUGH, 2013) foram obtidos em versão *on-line*

(<https://species.h-its.org/gmyc/>), a partir de árvore ultramétrica calculada a partir do agrupamento das sequências COI por método *Neighbor-Joining* (NJ) com modelo GTR+G em MEGA X (KUMAR et al., 2018). O resultado em bPTP (ZHANG et al., 2013) foi obtido na versão *on-line* do *software* (<https://species.h-its.org/>), utilizando como *input file* uma árvore com sequências agrupadas por *Neighbor-Joining* (NJ), e modelo GTR+G gerada no programa MEGA X. Os modelos foram selecionados por meio de *Akaike Information Criterion* (AIC), utilizando o programa Modelgenerator (KEANE et al., 2006).

4.9 ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

O banco de dados de sequências alinhadas do gene 16S rRNA de animais previamente identificados morfológicamente, e as sequências de espécimes imaturos e com morfologia ambígua, foram utilizados para obtenção dos haplótipos mitocondriais em DnaSP. Os haplótipos mitocondriais foram associados aos dados de referência geográfica (Latitudes/longitudes correspondentes) das 65 coleções de água doce, para a produção de mapas de diagramas do tipo gráfico a partir de seus atributos no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018).

O banco de dados de sequências 16S rRNA foi analisado quanto à distribuição da diversidade genética populacional em *software* Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). A hipótese adotada é da existência de uma estruturação genético-populacional, a qual foi testada em grupos de sequências 16S rRNA de espécies com haplótipos diferenciados. Foram testadas hipóteses de estruturação populacional relacionadas com a distribuição dos espécimes dentro de uma mesma área geográfica e entre sequências obtidas em coleções hídricas separadas (Em indivíduos dentro de coleções hídricas nas margens direita e esquerda do rio Pardo, para a espécies *B. peregrina* e *B. straminea*; e indivíduos dentro e fora da coleção hídrica de Christoni para a espécie *B. glabrata*). Para verificar a significância estatística foi efetuada uma análise de variância molecular (AMOVA). Esta análise foi feita após 1023 permutações dos dados de modo a simular a hipótese nula. Para estimar a diferenciação genética entre os grupos foi considerado baixa quando o que índice de fixação ($F_{st} = < 0,05$), moderado ($F_{st} = 0,05$ a $0,15$), alta ($F_{st} = 0,15$ a $0,25$) e muito alta ($F_{st} = > 0,25$) (WRIGHT, 1978).

4.10 MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICO

A modelagem de nicho compreendeu os 55 municípios da UGRHI-17 do Médio Paranapanema. Para isso, foi utilizado o algoritmo de máxima entropia. Esse procedimento considera que a melhor distribuição de probabilidades é aquela que maximiza a entropia e satisfaz todas as restrições à distribuição das espécies. Desta forma com esse método foi possível realizar previsões ou inferências a partir de informações incompletas (PHILLIPS et al., 2006; PEDERSEN et al., 2014).

Para a construção dos modelos foram consideradas informações sobre a ocorrência das espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* nos pontos em que as espécies foram encontradas e identificadas ao nível de espécie. As informações do solo foram obtidas na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (ROSSI, 2017). Foram utilizadas 19 variáveis (Bio1 a Bio19 – Tabela 2) climáticas que foram obtidas no WorldClim Versão 2 do período de 1970-2000 (FICK e HILMANS, 2017) em resolução de 30 arc-segundos (~1 km²).

Tabela 2- Variáveis usadas no modelo ecológico. As temperaturas são expressas em C * 10, precipitações em mm, elevação acima do nível do mar em metros e acúmulo de fluxo em número de células.

Variável = Descrição		
Climática		Hidrologia
Bio1 = Temperatura média anual	Bio11 = Temperatura média do trimestre mais frio	Ccon = Elevação Hidrológicamente condicionada
Bio2 = Variação Diurna Média de Temperatura (Média mensal (Tmax-Tmin))	Bio12 = Precipitação Anual	Dir = Direção da drenagem
Bio3 = Isotermalidade (Bio2/Bio7) (* 100)	Bio13 = Precipitação do mês mais chuvoso	Acc = acúmulo de fluxo hidrológico
Bio4 = Sazonalidade da Temperatura	Bio14 = Precipitação do mês mais seco	HAND = distância vertical à drenagem mais próxima
Bio5 = Temperatura máxima do mês mais quente	Bio15 = Sazonalidade da Precipitação (coeficiente de variação)	Densi = Densidade de Drenagem
Bio6 = Temperatura mínima do mês mais frio	Bio16 = Precipitação do trimestre mais chuvoso	
Bio7 = Amplitude térmica anual (bio5-bio6)	Bio17 = Precipitação do trimestre mais seco	Altitude e solo
Bio8 = Temperatura média do trimestre mais úmido	Bio18 = Precipitação do trimestre mais quente	Alt = Altitude (Relevo)
Bio9 = Temperatura média do trimestre mais seco	Bio19 = Precipitação do trimestre mais frio	Solo = pedológico
Bio10 = Temperatura média do trimestre mais quente		

Foram utilizadas variáveis de drenagem (Acc, Dir, Ccon) obtidas no HydroSHEDS em resolução de 30 arc-segundos (~1 km²) (LEHNER et al., 2006). A distância vertical à drenagem mais próxima extraída a partir do algoritmo Hand (*Height Above the Nearest Drainage*), com

limiar de 50 pixels, pois inclui os cursos d'água principais e as drenagens menores (RENNÓ et al., 2008) e a densidade de drenagem (Densi) resolução espacial de $\sim 1\text{km}$ (XIMENES, 2008) foram obtidas no AMBDATA. E uma variável de altitude, obtida no TOPODATA a partir dos dados em SRTM de resolução espacial de $\sim 1\text{km}$ (VALERIANO e ROSSETTI, 2011) (Tabela 2). Todos os dados foram obtidos no formato raster usando o sistema de coordenadas "LAT / LONG" (Datum WGS-84).

Para eliminar a colinearidade foi feita análise das variáveis, por meio do fator de inflação de variância (VIF), com as 26 variáveis descritas acima (Tabela 2). Este procedimento e a chave para evitar artefatos analíticos, pois ao utilizar variáveis colineares pode alterar o peso das variáveis e com isso alterar os padrões de agrupamento, no modelo. Para isso foram consideradas primeiramente todas as variáveis, sendo eliminada a covariável com o VIF mais alto. Este processo foi repetido até que todos os valores de VIFs fossem menores que um limite pré-selecionado. Autores aceitam o limite do $\text{VIF} > 5$ ou $\text{VIF} > 10$ (CRANEY e SURLES, 2002; ZUUR et al. 2010), o que indica acima deste nível alta colinearidade, mas há uma abordagem mais rigorosa utiliza os valores de VIFs menores que dois. (QUINN e KEOUGH, 2002, ZUUR et al. 2010), por isso foi considerado como limite superior aceitável, valores de VIF menores que dois. A análise dos VIF foi realizada utilizando o programa R (R DEVELOPMENT, 2015).

As variáveis selecionadas, após a remoção da colinearidade, foram utilizadas a análise de componentes principais (*principal component analysis-PCA*) (ZUUR et al., 2010), para pré-selecionar as variáveis ambientais que maior influência na distribuição de cada espécie de *Biomphalaria*. Esta análise foi realizada com o pacote *Factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) no programa R.

Após realizado a PCA, foram selecionadas as quatro variáveis mais representativas através da escolha das variáveis nos 2 eixos principais mais importantes, através da observação dos autovalores para cada espécie, estas foram utilizados para a análise MaxEnt, para realizar as predições sobre distribuições das cinco espécies de *Biomphalaria* encontradas na área de estudo para o tempo atual e futuro.

Para as predições futuras da presença das espécies de caramujos foram utilizadas informações sobre cenários climáticos futuros com base nos documentos disponibilizados pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC). Utilizou-se o modelo climático regional (RCM) HadGEM2-ES, um modelo estável que representa um estado realista do clima, vegetação e aerossóis antropogênicos e naturais (COLLINS et al., 2011; LORENZ et al., 2017) as quais foram obtidas no WorldClim Versão 1.4 do período de 2041-2060 com resolução de

30 arc-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$). Deste modelo climático, foram considerados dois cenários possíveis dependendo da quantidade de gases de efeito estufa (GEE) que serão emitidos nos próximos anos: Baixo RCP (*representative concentration pathways*) 2.6, no qual a temperatura global tende a aumentar em $1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,4$ a $1,6 \text{ }^\circ\text{C}$); e alto para RCP 8.5, no qual a temperatura global tende a aumentar em $2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($1,4$ a $2,6 \text{ }^\circ\text{C}$) (IPCC, 2013).

Estas informações foram transformadas em formato ASCII no programa QGIS, para leitura no MaxEnt, que forneceu as probabilidades da presença de cada uma das espécies de caramujos em mapas de adequação. A escala de probabilidade que varia entre 0 (nenhuma probabilidade de presença da espécie) e 1 (alta probabilidade de presença da espécie), isto é, desde habitat não adequado até habitat totalmente adequado. As curvas do tipo ROC (*receiver operator characteristic*) foram utilizadas para avaliar a acurácia das informações obtidas. O modelo de distribuição potencial foi estimado utilizando-se um algoritmo de máxima entropia no programa MaxEnt 3.4.1 (PHILLIPS et al., 2006; PHILLIPS e DUDÍK, 2008). Os dados foram computados com os um subconjunto de treinamento de 75%, 25% de teste e 25 repetições e a saída foi computada como *logistic*, teste de *jackknife* e através das curvas de resposta em MaxEnt (ZABURLÍN et al., 2016; RUMI et al., 2017; YANG et al., 2018).

4.11 TESTE KRUSKAL-WALLIS E ÍNDICES DE DIVERSIDADE DE ESPÉCIES

Foi feita uma análise estatística dos números de espécimes de caramujos coletados segundo as variáveis categóricas das espécies de *Biomphalaria*. Para isso, foram considerados as variáveis categóricas: dos “tipos de habitats” tanto com pouco ou nenhum fluxo (beira de lago, banhado e ambientes artificiais) quanto com presença de água em movimento (beira de rio, beira de córrego e nascente); e dos “tipos de ambientes” (Rural, peri-urbano e urbano) foram identificados a partir das observações feitas pelas equipes de campo da SUCEN. As medidas desde a nascente até a foz das coleções hídricas foram obtidas a partir dos dados da rede de drenagem do estado de São Paulo (cartas topográficas na escala 1:50.000) da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) em parceria com o Instituto Geológico (IG) (SMA, 2013) no programa QGIS e depois categorizadas em uma “escala cartográfica” em km: <1 , $1-5$, $6-10$, >11 km.

Para as variáveis “Tipo de ambiente” e “Extensão da coleção hídrica”, de cada amostra foi obtida pela soma dos exemplares de cada coleção hídrica segundo cada espécie. Em relação ao “Tipo de habitat”, cada amostra representou a soma dos exemplares de cada ponto segundo cada espécie, pois as coleções hídricas não são homogêneas em relação ao tipo de habitat.

A identificação das diferenças estatísticas foi feita por meio do uso do teste Kruskal-Wallis (Anova não paramétrica). Este teste foi utilizado porque as amostras não apresentavam distribuição normal (KRUSKAL e WALLIS, 1952) e foram feitas comparações de três ou mais grupos. Para isso, utilizou-se o pacote PMCMR do programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015). Foram consideradas significantes as análises estatísticas com $p < 0,05$.

Com os dados dos testes de Kruskal-Wallis considerados significantes, foram analisados por um segundo teste, o teste de *post-hoc* Nemenyi (NEMENYI, 1963), que consiste em fazer comparações em pares com o intuito de verificar quais dos fatores que diferem entre si.

Para as espécies de *Biomphalaria* foram determinados os índices de Shanno-Wiener (H'), Simpson, rarefação e Riqueza de espécies, em relação a cada coleção hídrica estudada. Os índices foram calculados no programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015) utilizando o pacote *Vegan* (OKSANEN et al., 2015).

4.12 ASSOCIAÇÃO ENTRE HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO E OS CASOS AUTÓCTONES

A relação entre a distribuição espacial da ocorrência autóctone de esquistossomose no período de 2007-2016, e a ocorrência dos caramujos hospedeiros intermediários (HI) do período de 2015-2016, no município de Ourinhos, foi avaliada com o uso da estatística espacial G_i , que é um indicador de associação espacial local (GETIS e ORD, 1992; 1996; ORD e GETIS, 1995). Esta estatística considerou a ocorrência de casos autóctones, em torno de pontos de ocorrência dos caramujos hospedeiros intermediários.

Para isso foram calculadas as taxas de incidências de esquistossomose segundo setores censitários. A estatística G_i foi calculada para cada um dos pontos com hospedeiros intermediários, tomando-se como base as taxas de incidência. Isso permitiu traçar um perfil da esquistossomose em Ourinhos baseado no padrão de transmissão dos casos autóctones e sua relação com as coleções de água doce, e na malacofauna que coloniza essas coleções.

Adotou-se nível de significância de 5%, que correspondeu ao valor mínimo da estatística G_i igual a 3.2889 ($N=100$) conforme tabela (i.i.d.) (ORD e GETIS, 1995). Esta estatística G_i , ao não levar em conta atributo do ponto analisado (no caso, local com a presença de caramujos hospedeiros intermediários), é considerada uma estatística focal. No caso deste estudo, o encontro de um resultado significativo para esta estatística corresponderia a afirmar que o local em questão poderia ser caracterizado como um potencial foco de transmissão de esquistossomose.

As estatísticas G_i foram obtidas com a utilização do pacote *Spdep* (BIVAND et al., 2016) do programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015). Foi testada a existência de aglomerados considerando-se uma distância máxima de 4000 m entre cada ponto com a presença de hospedeiro intermediário e os centroides dos setores censitários.

A partir das coordenadas dos casos autóctones de esquistossomose e o raio de influência da função K12 foi feita a estimativa da densidade de Kernel, com o complemento de mapa de calor, disponível no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018). Com as coordenadas dos pontos dos hospedeiros intermediários e os raios de influências de cada ponto (distancias considerados significantes na estatística G_i , limite maior) foi possível identificar no mapa os aglomerados dos casos autóctones em torno de pontos com hospedeiro intermediário. Para esse procedimento foi utilizado o complemento MMQGIS (MINN, 2018) com operação geográfica *create buffers* disponível no QGIS e depois concatenadas em um único aglomerado, restringiu-se à área urbana de Ourinhos, pois 97,4% da população reside nesta área (IBGE, 2010a).

5 ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP – COEP, via Plataforma Brasil, MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde, Nº CAAE: 53559816.0.0000.5421 (ANEXO A I).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MANUSCRITO 1: A esquistossomose na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, é atualmente um problema de Saúde Pública? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, aceito para publicação em 2019.

Raquel G. S. Palasio^{1,2}, Aline N. Bortoleto¹, Iara G. Rosa-Xavier³, Maria T. M. Andrighetti³, Roseli Tuan² & Francisco Chiaravalloti-Neto¹

1-Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública - USP, 01255-000, Pinheiros, SP, Brasil. 2-Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, 01027-000, Luz, SP, Brasil. 3- Superintendência de Controle de Endemias- SR11, 14501-100, Marília, SP, Brasil.

6.1.1- RESUMO

Introdução: A região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, é historicamente marcada pela transmissão da esquistossomose, com casos autóctones desde 1952. O objetivo do estudo foi descrever a ocorrência desta doença no espaço e no tempo e avaliar sua atual importância como problema de Saúde Pública. **Material e métodos:** Foram gerados mapas temáticos caracterizando as áreas de risco para a transmissão da esquistossomose, por meio de estatísticas de varredura, e de fluxo entre 1978 e 2016. Foram calculadas as taxas de incidência e avaliou-se a dependência espacial entre os casos autóctones e importados com a função K12 de Ripley. Espécies de caramujos foram identificadas em aglomerados de alto risco para esquistossomose. **Resultados:** Foram notificados 1511 casos autóctones em oito dos 25 municípios da área de estudo (92,8% em Ourinhos). Foram notificados 2189 casos importados em 25 municípios (27% em Ourinhos e 20% em Assis), procedentes principalmente dos estados do Paraná e Minas Gerais. Foram identificados aglomerados autóctones e importados de alto risco para ocorrência de esquistossomose em Ourinhos, Assis e Ipaussu. Entretanto, ao longo dos anos, os casos passaram a ocorrer em baixa densidade em Ourinhos e deixaram de ocorrer nos demais municípios da região. O aglomerado detectado no período de 2007 a 2016 em Ourinhos ainda oferece risco para a transmissão da esquistossomose. A análise com a função K12 indicou uma dependência espacial positiva entre os casos autóctones e importados. **Conclusão:** O estudo mostrou que, atualmente, a esquistossomose como problema de saúde pública no Médio Paranapanema está restrita a Ourinhos. Tal fato pode estar relacionado à presença de *Biomphalaria glabrata* em um ponto específico e à cobertura deficiente do saneamento básico. **Palavras-chave:** esquistossomose, análise espacial, georreferenciamento, epidemiologia, Ourinhos, Assis, Ipaussu.

Palasio, R. G. S; Bortoleto, A. N; Rosa-Xavier, I. G; Andrighetti, M. T. M; Tuan, R. & Chiaravalloti-Neto, F. **Schistosomiasis in Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil": Does it matter today for public health?** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, accept in 2019.

6.1.2- ABSTRACT

Introduction: The Middle Paranapanema watershed is known for the transmission of schistosomiasis, and there have been autochthonous cases since 1952. This study aimed to describe this disease in space and time and evaluate its current importance as a public health problem. **Methods:** Thematic maps showing the risk areas for transmission of schistosomiasis, using scan statistics, and flow maps were created in the period 1978–2016. Incidence was calculated, and the existence of spatial dependence between autochthonous and imported cases was evaluated using Ripley's K12-function. Species of snails were identified in high-risk clusters. **Results:** A total of 1,511 autochthonous cases were reported in eight of the 25 municipalities in the study area, of which 92.8% occurred in Ourinhos. A total of 2,189 imported cases were reported (27% in Ourinhos and 20% in Assis), mainly originating in the states of Paraná and Minas Gerais. Clusters of autochthonous and imported cases with higher risk were identified in Ourinhos, Assis and Ipaussu. However, over the years, the cases began to occur in low density in Ourinhos and no longer in other municipalities in the region. The cluster detected in the period 2007–2016 in Ourinhos still has risk for the transmission of schistosomiasis. K12-function analysis indicated positive spatial dependence between autochthonous and imported cases. **Conclusions:** The study showed that, currently, schistosomiasis as a public health problem in Middle Paranapanema is restricted to Ourinhos. This fact may be related to the presence of *Biomphalaria glabrata* at a specific point and low coverage of basic sanitation.

Key words: schistosomiasis, spatial analysis, georeferencing, epidemiology, Brazil

6.1.3- INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica humana é uma doença parasitária, que tem como agente etiológico o trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. A doença ocorre em regiões relacionadas às precárias condições de saneamento básico, presença de hospedeiro intermediário (HI) do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 e tal qual a migração de pessoas infectadas com esquistossomose para áreas não endêmicas, bem como de pessoas saudáveis para regiões endêmicas, fatores que criam o ambiente favorável para a ocorrência dos casos^{1,2}. Foi relatado que, em 2016, 12.411 adultos foram tratados e aproximadamente 1,6 milhão de indivíduos foram infectados com *S. mansoni* (Sm) no Brasil^{3,4}. Em 2012, a positividade para *S. mansoni* no Brasil foi de 4,5%⁵. Em 2015, a proporção de positivos diminuiu para 1% no Brasil, com 2,4% na região sudeste do Brasil e foi de 0,04% em São Paulo (SP)⁶.

O conhecimento da variação espacial e o mapeamento geográfico dos casos de esquistossomose, possibilita estimar os locais de alto risco de infecção, e o estabelecimento de áreas prioritárias para o desenvolvimento de ações preventivas⁵. Os Sistemas de Informação Geográfica (SIGs) são utilizados como ferramentas nos estudos em Saúde Pública deste a década de 90, permitindo analisar uma grande quantidade de dados e identificar os riscos de transmissão de doenças em uma dada área geográfica^{7,8,9,10,11,12,13}.

No Brasil, a utilização dos SIGs foram empregados primeiramente em estudos que avaliaram espacialmente a ocorrência da esquistossomose principalmente em áreas de alta endemicidade nos estados da Bahia^{14,15}, Pernambuco¹⁶, Minas Gerais^{17,18}, Recife¹⁹ e Sergipe²⁰. Estudos em áreas de baixa endemicidade, como no estado de São Paulo, são raros. Uma exceção é o estudo realizado por Anaruma Filho et al.²¹ e Teles et al.²² nos municípios de Bananal e Campinas, respectivamente, onde foram possíveis hierarquizar os sítios de transmissão da esquistossomose, mapeamento dos focos de parasitas e identificar locais em que a vigilância e controle deveriam ser intensos e constantes.

No estado de São Paulo, à região da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema, destaca-se como uma área historicamente marcada pela transmissão da esquistossomose, com casos autóctones assinalados desde 1952²³. Entre os fatores que poderiam explicar a autoctonia nesta região, seria a predominância e abundância de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)^{24,25,26,27}. Esta espécie foi, pela primeira vez, encontrada naturalmente infectada por *S. mansoni* em 1952 no município de Ourinhos^{28,29}. Desde então, a esquistossomose vindo sendo considerada um importante problema de saúde pública neste território Paulista^{30,31}. Entretanto, tanto nesta região, como no Brasil e vários países do mundo houve, nos últimos anos, uma diminuição da

incidência e da prevalência deste agravo. Esta melhoria tem sido atribuída à eficácia dos medicamentos para o tratamento dos infectados, ampliação da cobertura dos serviços de saneamento básico e no controle dos HI^{32,33,34,35}.

Assim, este estudo objetiva descrever a ocorrência histórica da esquistossomose na região do Médio Paranapanema no espaço e no tempo; caracterizar a presença de HI em áreas de risco para a doença; e avaliar sua atual relevância como problema de Saúde Pública nesta área.

6.1.4- MATERIAL E MÉTODOS

6.1.4.1 Área do estudo

A área de estudo abrange 25 dos 55 municípios da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Médio Paranapanema (UGRHI-17) (Tabela 1), que pertencem ao Grupo de Vigilância Epidemiológica Estadual de Assis, que se constitui uma unidade GeoSentinelas, prioritárias para a vigilância da esquistossomose³⁸ e conta com o total de uma população estimada de 488.955 habitantes em 2018³⁹. Estes 25 municípios englobam uma parte significativa das ocorrências autóctones de esquistossomose na região do Médio Paranapanema⁴⁰. A região do Médio Paranapanema está localizada no Oeste e Sudoeste do estado de São Paulo (SP). É caracterizada por uma vasta e complexa hidrografia onde predomina o rio Paranapanema. Este rio tem uma extensão de 929 km, desenvolvendo-se rumo oeste, desaguardo no do rio Paraná^{41,42}.

6.1.4.2 Fonte de dados

Informações sobre os casos de esquistossomose (data de notificação, endereço de residência, informações sobre o local provável de infecção (LPI) e classificação epidemiológica), no período de 1978-2016, foram obtidas por meio de consulta aos bancos de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjak (CVE) e pelo Serviço Regional 11 da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (SES). As informações populacionais e os materiais cartográficos foram obtidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)^{43,44,45,46} e na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA)⁴⁸.

6.1.4.3 Análise de dados

Os conjuntos de indicadores referentes aos números de casos autóctones, importados, e indeterminados, foram analisados em quatro intervalos de tempo: de 1978 a 1988; 1989 a 1999; 2000 a 2006; e de 2007 a 2016. O primeiro e segundo períodos correspondem ao intervalo de tempo em que as fichas de notificação e investigação eram organizadas manualmente e depositadas na SUCEN. Nos terceiros e quartos períodos, os dados das fichas foram digitados, respectivamente nos sistemas de informação depositados no SINAN-W e SINAN-NET, com a ressalva de que os casos de 2000 a 2006 estavam sem informação da classificação epidemiológica, provavelmente, devido à interrupção de investigação epidemiológica da esquistossomose na região.

Foi calculado, para os municípios com ocorrência autóctone da esquistossomose, as taxas de incidência dos casos autóctones, importados e indeterminados, segundo os períodos considerados. Os casos de esquistossomose foram geocodificados a partir de seus endereços de residência utilizando-se a ferramenta batch geocoding⁴⁹ e os pontos correspondentes às suas coordenadas geográficas foram importados no formato "Latitude/Longitude (Datum WGS-84) e visualizados no programa QGIS versão 2.18.22⁵⁰.

Após a geocodificação, foram escolhidos apenas os municípios com autoctonia, e os casos importados e autóctones destes municípios foram computados segundo setores censitários e períodos considerados (1978 a 1988; 1989 a 1999 e de 2007 a 2016). Isso foi realizado por meio do complemento MMQGIS⁵¹ com operação geográfica *spatial join* disponível no QGIS⁵⁰. A identificação das áreas de alto risco para ocorrência de esquistossomose foi feita com base em estatísticas de varredura disponíveis no programa SaTScan versão 9.4⁵². Para tal, também foram consideradas as populações do meio do período e as coordenadas dos centroides dos setores censitários.

A análise de varredura espacial foi feita utilizando-se o modelo discreto de Poisson nas seguintes condições: tamanho máximo de cada aglomerado igual a 50% da população, aglomerados com formato circular e uso do método de Monte Carlo, com 999 repetições, para estimativa das probabilidades^{53,54}. Isto resultou na identificação de aglomerados com alto risco de ocorrência da infecção, com a obtenção dos riscos relativos (RR), que correspondem à razão entre a taxa de incidência dentro e fora dos aglomerados, além dos respectivos valores de p , sendo considerados significantes os aglomerados com valores de p menores do que 5%.

Foram identificadas coleções hídricas que sobrepuseram aos aglomerados de alto risco dos casos autóctones do resultado da análise de varredura deste estudo. Nesta peculiares

coleções hídricas, foram realizadas coletas de planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, no período entre 2015 e 2017, conforme metodologia preconizada pelo Ministério da Saúde⁵⁵. A identificação dos caramujos foi feita por meio de características morfológicas do aparelho reprodutor de acordo com Paraense^{56,57}. Todos os caramujos coletados foram expostos à luz artificial em laboratório para verificar a eliminação de cercárias de *S. mansoni*⁵⁵.

A relação entre a distribuição espacial dos casos autóctones e importados de esquistossomose de 1978-2016 da unidade GeoSentinelas da UGRHI-17 do Médio Paranapanema, foi avaliada utilizando-se a função cruzada K12 de Ripley⁵⁸, no programa R versão 3.2.2⁵⁹, com os pacotes *Splancs*⁶⁰. Isso permitiu, por meio das coordenadas dos pontos, a avaliação da existência ou não de dependência espacial entre as duas distribuições e o raio de influência. O resultado do raio de influência e as coordenadas geográficas dos casos importados e autóctones foram posteriormente utilizadas para estimar a densidade de Kernel, que é uma análise do padrão de distribuição espacial para verificar intensidade menor e maior probabilidade da ocorrência dos casos na área geográfica. As manchas com cores vermelho, verde e azul claro foram usadas para representar as áreas onde foram observados as maiores densidades de casos importados e autóctones. Este procedimento foi realizado com os pacotes *Splancs*⁶⁰ no programa R⁵⁹.

Com as informações dos LPI's das fichas e utilizando a ferramenta Flowmapperv 0.4.1⁶¹ extensão do QGIS⁵⁰, foram gerados mapas de fluxo das procedências dos casos importados dos estados Brasileiros e o fluxo interno entre os municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema.

6.1.5- RESULTADOS

Foram notificados 4085 casos de esquistossomose em 25 municípios da área de estudo (Tabela 1 - ANEXO B V-VI, pg. 204), no período de 1978 até 2016, sendo que 37,0% (1511) foram classificados como autóctones, 53,6% (2189) como importados, e 9,4% (385) indeterminados (casos que não puderam ser classificados por dúvida sobre o município onde ocorreu a provável infecção ou por ausência desta informação).

Tabela 1 - Casos autóctones, importados e indeterminados de esquistossomose dos oito municípios autóctones e a soma dos casos dos demais municípios* da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema da esquistossomose, estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016).

***Outros da unidade GeoSentinelas com casos** = Bernardino de Campos, Borá, Cruzália, Espírito Santo do Turvo, Florínia, Ibirarema, Lutécia, Maracá, Óleo, Paraguaçu Paulista, Pedrinhas Paulista, Platina, Ribeirão do Sul, Salto Grande, Santa Cruz do Rio Pardo, Tarumã e Timburi.

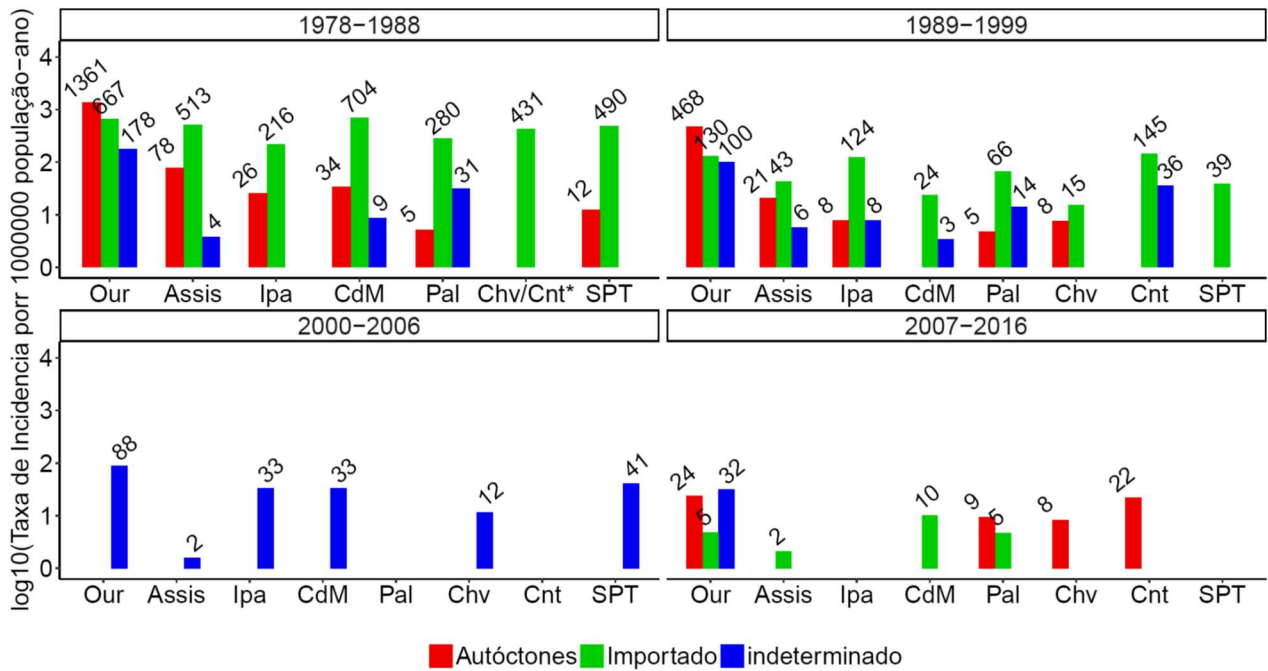
Município	Classificação Epidemiológica	Período de estudo			
		1°: 1978-1988	2°: 1989-1999	3°: 2000-2006	4°: 2007-2016
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Ourinhos	Autóctone	963 (61.7)	414 (67.1)	s.i	25 (39.7)
	Importado	472 (30.2)	115 (18.6)	s.i	5 (7.9)
	Indeterminado	126 (8.1)	88 (14.3)	61 (100)	33 (52.4)
Assis	Autóctone	62 (13.1)	18 (29.5)	s.i	0 (0)
	Importado	407 (86.2)	38 (62.3)	s.i	2 (100)
	Indeterminado	3 (0.6)	5 (8.2)	1 (100)	0 (0)
Ipaussu	Autóctone	3 (10.7)	10 (37.0)	s.i	0 (0)
	Importado	25 (89.3)	16 (59.3)	s.i	0 (0)
	Indeterminado	0 (0)	1 (3.7)	3 (100)	0 (0)
Cândido Mota	Autóctone	8 (4.6)	0 (0)	s.i	0 (0)
	Importado	165 (94.3)	7 (87.5)	s.i	3 (100)
	Indeterminado	2 (1.1)	1 (12.5)	7 (100)	0 (0)
Palmital	Autóctone	1 (1.6)	1 (5.6)	s.i	2 (66.7)
	Importado	54 (88.5)	14 (77.8)	s.i	1 (33.3)
	Indeterminado	6 (9.8)	3 (16.7)	0 (0)	0 (0)
Chavantes	Autóctone	0 (0)	1 (33.3)	s.i	1 (100)
	Importado	54 (100)	2 (66.7)	s.i	0 (0)
	Indeterminado	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Canitar	Autóctone	0 (0)	0 (0)	s.i	1 (100)
	Importado	9 (100)	4 (80.0)	s.i	0 (0)
	Indeterminado	0 (0)	1 (20.0)	0 (0)	0 (0)
São Pedro Turvo	Autóctone	1 (2.4)	0 (0)	s.i	0 (0)
	Importado	40 (97.6)	3 (100)	s.i	0 (0)
	Indeterminado	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
*Outros	Autóctone	0 (0)	0 (0)	s.i	0 (0)
	Importado	656 (99.2)	95 (88.8)	s.i	2 (33.3)
	Indeterminado	5 (0.8)	12 (11.2)	20 (100)	4 (66.7)
Total	Autóctone	1038 (33.9)	444 (52.3)	s.i	29 (36.7)
	Importado	1882 (61.5)	294 (34.6)	s.i	13 (16.5)
	Indeterminado	142 (4.6)	111 (13.1)	95 (100)	37 (46.8)

Fonte: SUCEN e SINAN.

Foram encontrados, em todo o período de estudo, casos autóctones em oito municípios desta região (Tabela 1). Destes, 92,8% ocorreram em Ourinhos, 5,3% de Assis e 0,9% de Ipaussu, totalizando 99,0% do total de casos autóctones. No período de 2000-2006, todos os casos notificados foram considerados indeterminados (Tabela 1, Figura 1) e aproximadamente 91,3% dos casos autóctones foram registrados em área urbana em todo o período.

No geral, houve declínio significativo da incidência de esquistossomose nos municípios da área de estudo no decorrer dos períodos analisados, com grande intensidade nos três municípios que concentraram a quase totalidade de autoctonia (Figura 1). Assis e Ipaussu tiveram seus casos autóctones registrados somente até o segundo período de estudo (1989-1999) São Pedro do Turvo e Cândido Mota no primeiro período (1978-1988) (Tabela 1).

Destaca-se, entretanto, que apenas Ourinhos apresentou notificação de casos autóctones até o ano de 2016 (três casos). Os últimos casos autóctones dos municípios de Canitar, Chavantes e Palmital foram notificados respectivamente em 2008, 2009 e 2011. Este declínio também foi verificado no número de casos importados e indeterminados (Tabela 1). Os últimos casos de esquistossomose em Ipaussu, Assis foram em 2001 e 2008, respectivamente (ANEXO B V).



* Chv/Cnt = Canitar pertencia a Chavantes até 1991 (lei estadual n° 7644, de 30-12-1991)

Figura 1 - Taxas de incidências dos casos autóctones, importados e indeterminados dos oito municípios com autoctonia da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos de estudo (1978-2016). Taxa de incidência por 1 milhão de habitantes-ano. (Our=Ourinhos; Ipa=Ipaussu; CdM= Cândido Mota; Pal=Palmital; Chv=Chavantes; Cnt= Canitar; SPT= São Pedro do Turvo).

Foram reconhecidos na análise espacial do SaTScan aglomerados de maior frequência de casos apenas nos setores censitários municípios, Ourinhos, Assis e Ipaussu. Em Ourinhos foram identificados, no primeiro e segundo período de estudo (1978-1988, 1989-1999), dois aglomerados de maior frequência de casos autóctones. O primeiro esteve relacionado ao córrego Christoni e o segundo com o córrego Furninhas (Figura 2A1-2). Já no período 2007-2016 foi identificado um único aglomerado incluindo estes dois córregos, com RR = 14,7 (Figura 2A3). Foram identificados aglomerados em Ourinhos para os casos importados em três períodos estudados (Figura 2A4-6). A comparação dos resultados obtidos na análise de aglomerados revela similaridade entre os aglomerados de casos autóctones e importados, bem como proximidade entre estes aglomerados com os córregos Furninhas e Christoni.

No córrego Christoni foram identificadas as espécies *B. glabrata* e *B. occidentalis* (Paraense, 1981), enquanto no córrego Furninhas, além da *B. occidentalis*, foi identificada *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Tabela 2). Nenhum caramujo eliminou cercárias de *S. mansoni*.

Tabela 2 - Coordenadas geográficas e número de espécimes de *Biomphalaria* coletados em coleções hídricas nos municípios de Ourinhos, Assis e Ipaussu, SP, Brasil, entre 2015 e 2017. *Todos os espécimes de HI foram negativos para a eliminação de cercárias de *S. mansoni*. *Bgl*=*B. glabrata*, *Btt*=*B. tenagophila*, *Boc*=*B. occidentalis*, *Bpe*=*B. peregrina*

Municípios	Coleções hídricas	* <i>Bgl</i>	* <i>Btt</i>	<i>Boc</i>	<i>Bpe</i>	Nº de caramujos coletados	Latitude	Longitude	Data de coleta	
Ourinhos	Christoni	x				212	-22.967600	-49.874683	2015-2016	
		x				46	-22.967117	-49.875167	2015-2017	
				x		146	-22.964467	-49.875633	2015-2016	
		x		x		147	-22.952833	-49.876333	2015-2016	
		x		x		77	-22.950050	-49.875850	2015-2016	
	Furninhas		x		x		175	-22.985556	-49.849972	2015-2016
					x		109	-22.977056	-49.851667	2015-2017
Assis	Fortuninha		x			32	-22.976766	-49.851745	2015	
		x				20	-22.660240	-50.437510	2017	
	Jacu		x	x		24	-22.670850	-50.406117	2017	
Ipaussu	São Luiz (Sapo)		x	x		149	-23.064750	-49.630250	2015-2016	
			x	x		114	-23.060083	-49.628333	2015-2016	
			x			23	-23.047528	-49.630250	2015-2016	
			x		x	113	-23.046556	-49.627528	2015-2016	
						x	86	-23.045750	-49.625250	2015-2016

Em Assis, foi encontrado um aglomerado de maior frequência de casos autóctones e importados no período de 1978-1988 e outro em 1989-1999, próximos ao ribeirão Fortuninha e córrego Jacú (Figura 2B1-4). A coleta de caramujos em Assis para identificação de HI nos aglomerados considerados de alto risco resultou no seguinte: *B. glabrata* foi identificada no ribeirão Fortuninha, enquanto *B. tenagophila* e *B. occidentalis* foram identificadas no córrego Jacú. Todos os exemplares de *B. glabrata* e *B. tenagophila* resultaram negativos quanto à eliminação de cercárias de *S. mansoni* (Tabela 2).

Em Ipaussu, foram identificados um aglomerado de maior frequência de casos autóctones relacionado ao córrego São Luiz, com casos autóctones no período de 1989-1999 (RR=19.2) e outro com casos importados no período de 1978-1988 (RR=20.2), todos localizados na área urbana do município (ANEXO A III). O córrego São Luiz é colonizado atualmente por caramujos das espécies *B. tenagophila*, *B. occidentalis* e *B. peregrina* (Orbigny, 1835), sendo os exemplares de *B. tenagophila* negativos quanto à presença de cercárias de *S. mansoni* (Tabela 2).

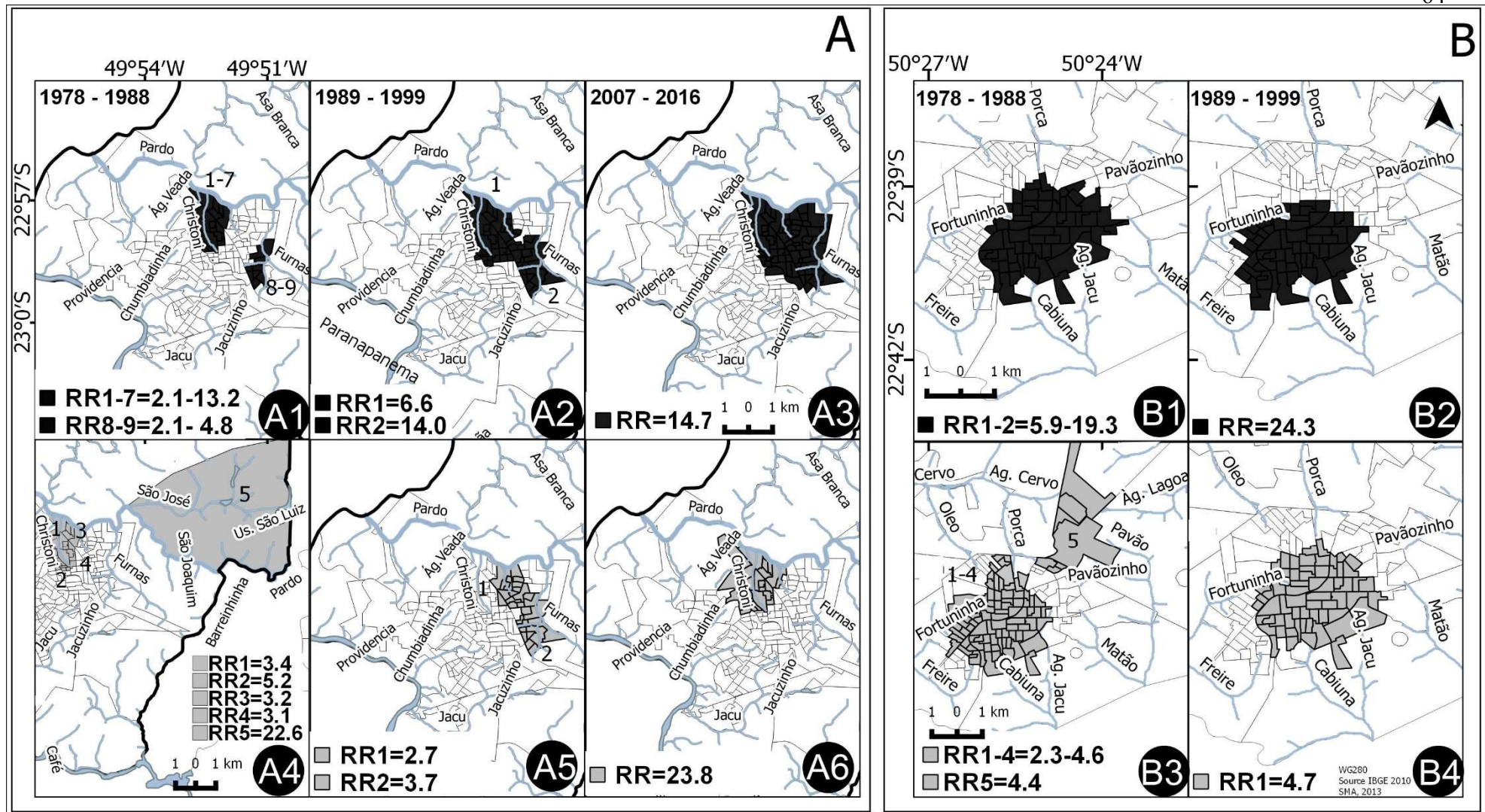


Figura 2 - Mapas dos municípios de Ourinhos (A) e de Assis (B), São Paulo, Brasil com aglomerados espaciais de casos autóctones (■), nos períodos de 1978-1988 (A1, B1), 1989-1999 (A2, B2), e 2007-2016 (A3); e aglomerados de casos importados (■) nos períodos de 1978-1988 (A4, B3), 1989-1999 (A5, B4) e 2007-2016 (A6); as principais coleções hídricas^{44,45,48} são apresentadas.

Além disso, observou-se concordância entre os aglomerados detectados e os LPI's identificados nos bancos de dados, disponíveis nas fichas de investigação epidemiológica. Os LPI's identificados com maior frequência de casos autóctones ocorreram nos seguintes córregos de Ourinhos: Córrego do Christoni, em 43.4% (608); do Furninhas, em 35.8% (503); do Furnas, em 5.7% (80); e outras coleções hídricas (rio Turvo, Paranapanema, Pardo e outros), em 8.2% (115); Entretanto, 6.8% (96) das fichas de investigação observamos ausência de informação.

Em Assis houve concordância entre os LPI e os aglomerados nos seguintes córregos: 35,0% (28) no córrego Jacú; 20,0% (16) ribeirão Fortuninha (Parque Buracão); 7.5% (6) córrego da Aldeia; 5.0% (4) lagos na fazenda Canadá (Bairro Jacú); e 32.5% (26) das fichas não contemplavam informações. Em Cândido Mota foram identificados 50% (4) no córrego Jacu (nascente em Assis⁶²) e os demais sem identificação. Em Ipaussu identificou-se maior frequência dos casos autóctones nos seguintes córregos: 76.9% (10) no córrego São Luiz (Sapo), 15.4% (2) no lago Municipal e 8% (1) frequentaram a represa do Rio Paranapanema.

O gráfico da análise função K12 (Figura 3A) indica existência de dependência espacial positiva até uma distância de ~3900 m entre os casos importados e autóctones na região de estudo, corroborando com a análise do mapa de densidade do Kernel (Figura 3BC), onde visualiza-se uma maior concentração de casos em Ourinhos e Assis, para os casos autóctones e importados.

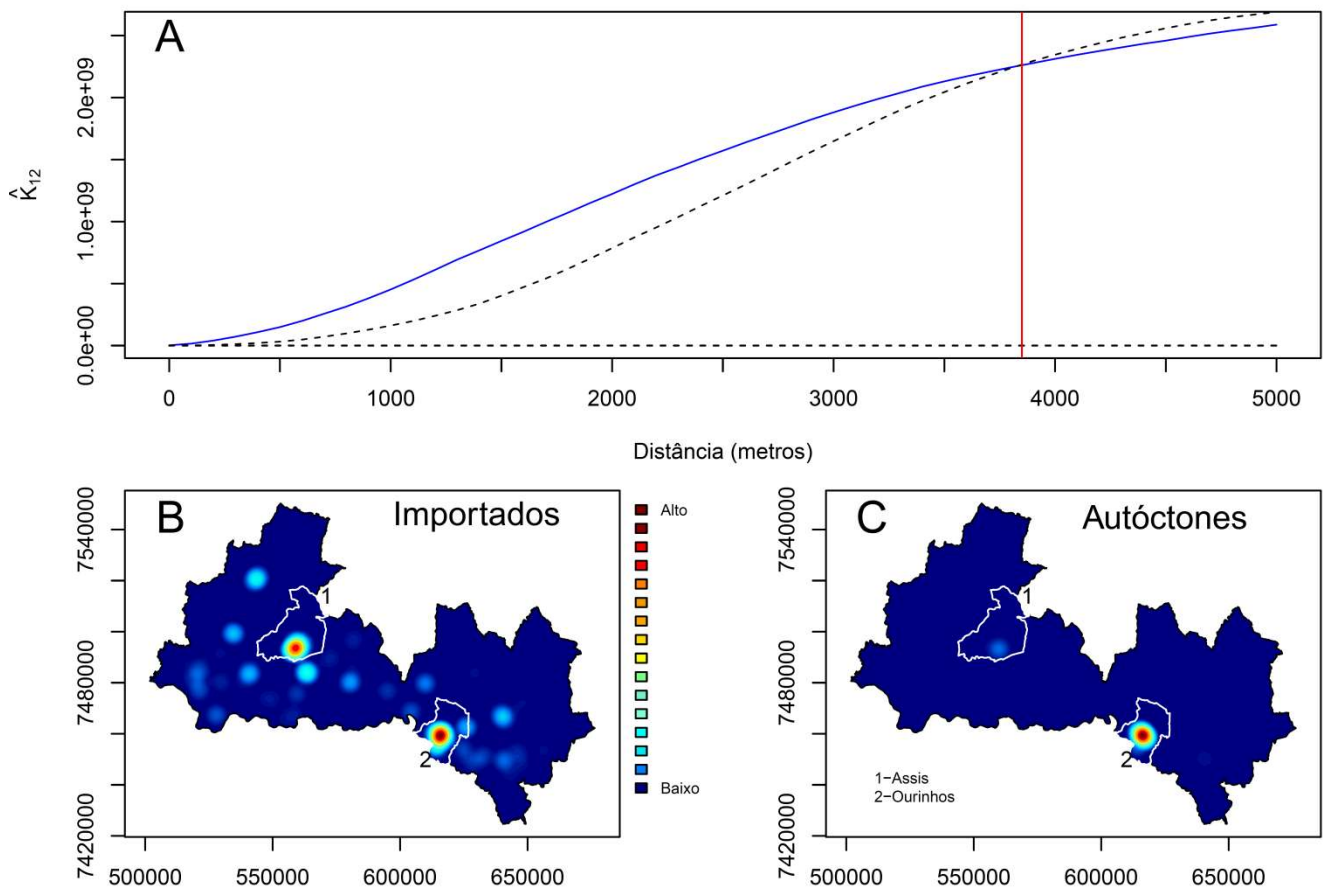


Figura 3 - Gráfico da análise função K12 bivariada (A). A curva azul continua acima do envelope mostra uma dependência espacial positiva entre os casos importados e autóctones de esquistossomose, linha vermelha limite da dependência espacial e mapas da densidade de Kernel com raio de influência de ~3900 metros mostrando a distribuição dos casos importados (B) e autóctones (C) da unidade GeoSentinelas de esquistossomose do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, no período de 1978-2016.

A Figura 4A apresenta a procedência dos casos importados de outros estados Brasileiros para a região de estudo: Paraná (34.6%), Minas Gerais (16.8%), Alagoas (9.3%), Pernambuco (9.0%), Bahia (8.3%) e Sergipe (4.5%). Do total dos casos importados 27.0% pertenceram ao município de Ourinhos e 20.4% à Assis. Em relação ao fluxo interno de casos da região de estudo, Ourinhos foi o município que mais forneceu casos importados para os demais (Figura 4B).

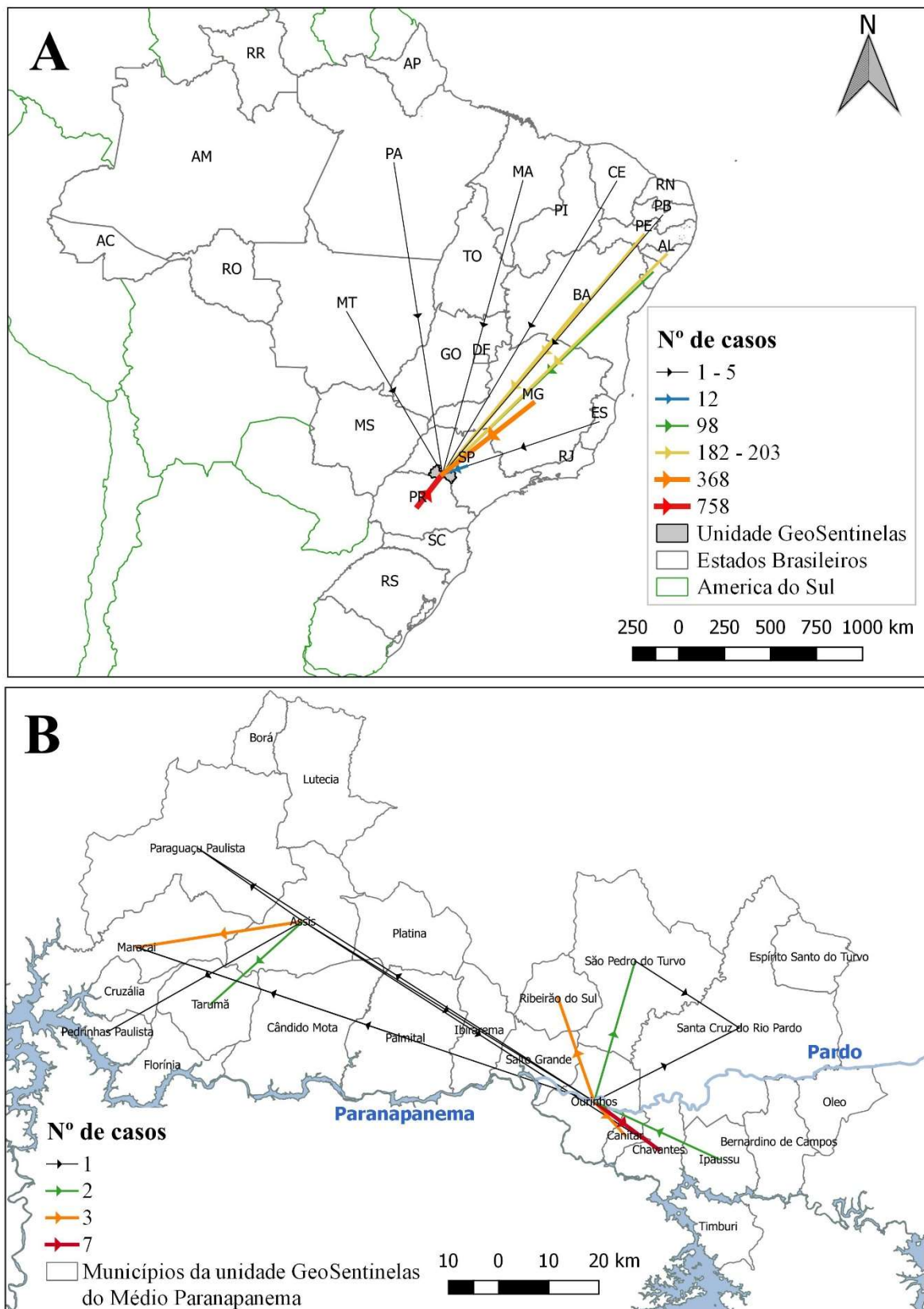


Figura 4 - Localização da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema no estado de São Paulo e Brasil e mapa com o fluxo dos casos importados de esquistossomose de outros Estados Brasileiros para a área de estudo (A); Municípios que compõem a unidade GeoSentinelas, prioritárias para a vigilância da esquistossomose, SP, Brasil e mapa com o fluxo de casos importados internamente à área de estudo (B) de 1978-2016.

6.1.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O emprego dos SIGs e de técnicas de análise espacial da esquistossomose na área de estudo permitiu especificar minuciosamente, dentro do espaço ocupado pelos municípios e suas coleções hídricas, as áreas com maior frequência de transmissão de casos da esquistossomose em distintos períodos e mapear a procedência dos casos importados. Ao delimitar áreas de risco, os SIGs permitem direcionar a vigilância malacológica a pontos específicos, sendo ferramentas fundamentais para aprimoramento das atividades de vigilância e controle que podem resultar na eliminação da esquistossomose na região de estudo.

Os resultados apontaram para um declínio progressivo na incidência da esquistossomose na região de estudo entre os anos de 1978 e 2016; apenas Ourinhos manteve-se como área significativa de ocorrência autóctone do agravo. Em Cândido Mota, Assis e Ipaussu, os últimos casos autóctones de esquistossomose datam da década de 80 e 90. Esta redução pode estar relacionada ao processo de desenvolvimento urbano dos municípios^{6,63,64} e ao tratamento adequado dos doentes³⁴. É importante considerar que a dinâmica de colonização e adaptação das espécies HI de *S. mansoni* pode alterar o risco de transmissão da doença¹⁹.

A detecção de aglomerado espacial de maior frequência de casos de esquistossomose envolvendo o córrego Christoni, e o fato deste córrego ainda ser colonizado por *B. glabrata*^{27,65,66,67}, pode caracterizar este córrego como uma área de transmissão da doença em Ourinhos. Sabe-se que essa espécie é o HI melhor adaptado ao desenvolvimento e veiculação do parasita^{29,68}. O mapa de fluxo de casos importados demonstra que Ourinhos é também um importante núcleo de dispersão regional da doença na região.

A microbacia do córrego Christoni, é uma área vulnerável a enchentes, inundações e alagamentos⁷⁰, com hortas na várzea⁷¹ que parecem constituir um ecossistema ideal para a reprodução de *B. glabrata*, o que nos permite levantar a hipótese de que este córrego seja um local importante de disseminação da espécie e conseqüentemente da doença.

Além do córrego Christoni, foi identificado, no município de Ourinhos, um aglomerado espacial de maior frequência de casos autóctones no córrego Furninhas, colonizado anteriormente por *B. glabrata*^{27,66} e atualmente por *B. tenagophila*. O córrego Furninhas foi alvo recente de significativas mudanças, tanto na sua porção urbana, com redução da cobertura arbórea e canalização, quanto na porção rural, com a substituição das áreas de pastagem e culturas anuais por cana de açúcar⁷². Estes fatos podem ter favorecido a proliferação de *B. tenagophila* e pode ser uma das hipóteses para a diminuição de casos observada no município.

B. tenagophila tem características reprodutivas e fisiológicas vantajosas para proliferação em ambientes modificados⁷³, com limitada capacidade de desenvolvimento de *S. mansoni*^{74,75}.

Ourinhos ainda possui áreas sem esgoto canalizado sendo despejado nos córregos sem tratamento adequado. O Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento aponta que, em 2015, do volume de água consumido pelo município, 78,6% eram coletados na forma de esgoto e destes, somente 68,0% eram tratados⁷⁶. Os volumes de esgoto não coletados e não tratados ocasionam a contaminação de cursos d'água a partir do despejo das fezes de indivíduos infectados, proporcionando a complementação do ciclo da doença, quando da existência de HI⁵⁵. Em Ourinhos, as residências estão próximas das coleções hídricas, permitindo acesso dos moradores a estes locais, o que resulta em risco de ocorrência da infecção⁶⁹. Esse resultado corrobora as observações de outros autores^{69,77,78}, que evidenciaram que a maioria das localidades de infecção estavam próximas às residências, caracterizando a transmissão como sendo, na maioria das vezes, peri-domiciliar.

Em Assis, entre 1978 a 1999, foram encontrados aglomerados espaciais em torno do ribeirão da Fortuninha e córrego Jacú. Ao contrário de Ourinhos, em Assis o saneamento apresentou melhorias nos últimos anos, sendo que em 2015, do volume de água consumido, 83,7% eram coletados e totalmente tratados⁷⁶. A maior cobertura da coleta de esgoto e do tratamento da água pode explicar a eliminação do agravo no município, pois o último caso autóctone foi registrado em 1997. Outros autores Ludwig et al.⁷⁹ e Frei et al.⁸⁰ também correlacionaram a ligação de esgoto com a queda de casos desta doença e outras parasitoses intestinais em Assis^{79,80}, demonstrando o impacto do saneamento básico nas doenças infecciosas intestinais^{6,81}. Além disso no ribeirão Fortuninha foi observado melhorias no saneamento como a canalização e revitalização do espaço como a construção de lagos, tornando-o um parque público⁸³, entretanto esta área ainda é colonizada por *B. glabrata*^{66,82}. O mesmo ocorreu com o córrego Jacú, que sofreu alterações na largura, profundidade, recomposição da mata ciliar⁸⁴ e canalização no trecho urbano⁸⁵, entretendo observamos a substituição de *B. glabrata*^{66,82} por *B. tenagophila* e *B. occidentalis*.

Outro exemplo da influência das alterações antrópicas sobre a dinâmica de transmissão da esquistossomose consiste que no município de Ipaussu, a transmissão da esquistossomose está limitada aos dois primeiros períodos analisados neste estudo. Isto coincide com a colonização do principal córrego de Ipaussu (São Luiz) por *B. glabrata*⁶⁶, encontrada por vezes infectada por *S. mansoni*^{31,66}. Atualmente, os níveis de coliformes fecais no córrego São Luiz estão dentro dos níveis permitidos por lei⁸⁶, indicando que houve melhoria significativa na qualidade da água doce, que em tese, pode ter favorecido a substituição de *B. glabrata* por *B.*

tenagophila, conforme observado desde 2003^{27,67}, resultando na diminuição de risco de transmissão da esquistossomose.

Os resultados obtidos com as estatísticas de varredura mostraram aglomerados de casos importados coincidentes com os aglomerados de casos autóctones em Ourinhos, Assis e Ipaussu, sendo que parte destas áreas já havia sido identificada por Figueiredo⁶⁹, como importantes para ocorrência de casos autóctones. Na estatística K12 de Ripley, mostrou existir dependência espacial positiva entre os casos autóctones e importados, com isso constamos que tanto os locais de residência dos casos importados, como dos autóctones fornecem informações importantes sobre os locais de transmissão.

A grande maioria dos casos importados, na região de estudo, procedeu dos estados do Paraná e de Minas Gerais. O município de Jacarezinho no Paraná, fronteira com Ourinhos, constitui-se em um foco de esquistossomose desde 1948⁸⁷, e conta com a presença de *B. glabrata*⁸⁸ e *B. tenagophila*^{55,89}. A presença de um polo econômico em Ourinhos pode ser um fator determinante para o fluxo humano do norte do Paraná. O fluxo migratório de Minas Gerais deve despertar a atenção dos serviços de investigação epidemiológica por este Estado possuir áreas altamente endêmicas para a esquistossomose relacionadas com *B. glabrata*^{5,30,77,90}. Há possibilidade que a introdução desta doença em São Paulo, tal como no Paraná, tenha sido proveniente de imigrantes infectados de Minas Gerais e da região Nordeste⁷⁷.

Este estudo tem como limitação a utilização de dados secundários sobre a ocorrência de esquistossomose, com dois importantes componentes: falhas na classificação dos casos e na identificação dos respectivos LPI e a subnotificação dos casos. Um fato ilustra esta primeira questão: no período de 2000 a 2006 a totalidade dos casos notificados foram classificados como indeterminados por falta de investigação. Se considerarmos que, segundo Eduardo et al.⁹¹, 30% dos casos classificados como indeterminados seriam de fato autóctones, a esquistossomose, na região de estudo, estaria subestimada. Esta falha já havia sido observada por Bezerra⁹², que ressaltou a importância da capacitação dos profissionais para o adequado preenchimento das fichas de notificação e investigação epidemiológica de casos.

A falha na atuação da vigilância e controle da esquistossomose pode estar relacionada ao processo de descentralização destas ações, oficializada em 1999^{5,93}. A partir deste ano, as notificações passaram a ser realizadas pelos municípios e grande parte dos casos deixaram de ser adequadamente classificados e investigados. Este problema foi contornado a partir de 2003, com a retomada das atividades de vigilância e controle^{5,94,95,96}. A subnotificação reforça o fato da esquistossomose ser caracterizada como uma doença tropical negligenciada, não sendo priorizada pelas políticas públicas de saúde^{34,97,98}.

O ponto forte deste estudo está na associação das técnicas de mapeamento com estudos epidemiológicos, pois estas ferramentas são úteis para a elaboração de estratégias de atuação e têm potencial para aprimorar o sistema de vigilância e controle da esquistossomose.

Finalizando, este estudo mostra que houve diminuição geral da incidência da esquistossomose na unidade GeoSentinelas pertencente à UGRHI-17 do Médio Paranapanema, estado de São Paulo. Em Ourinhos, a esquistossomose persiste em baixa prevalência e incidência, representando ainda um problema de saúde pública. Neste município, os serviços de saúde devem investir na detecção precoce da doença, notificação e classificação adequada dos casos autóctones, vigilância malacológica das coleções hídricas com *B. glabrata* e melhorias no saneamento básico. Estas são medidas que colocam em perspectiva a eliminação da esquistossomose neste município em curto prazo, com impacto para toda a região.

Suporte financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa da doutoranda Raquel G. S. Palasio. A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica da aluna Aline N. Bortoleto. A superintendência de Controle de endemias (SUCEN) – sede, (Projeto nº 1819/2016) e SUCEN de Marília concedido a Roseli Tuan. CNPq pela bolsista de produtividade em pesquisa concedido ao Francisco Chiaravalloti-Neto (PQ-2, 307739/2016-3).

6.1.7- REFERÊNCIAS

1. Rollemberg CVV, Santos CMB, Silva MMBL, Souza AMB, Silva ÂM, Almeida JAP, Almeida RPE, Jesus AR. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. Ver Soc Bras Med Trop.2011;44(1):91-96.
2. Colley DG, Bustinduy AL, Secor, WE, King CH. Human schistosomiasis. The Lancet 2014;383(9936);2253-2264.
3. World Health Organization. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. Weekly Epidemiological Record, WHO 2017;92(49):749-760.
4. World Health Organization. Schistosomiasis: status of schistosomiasis endemic countries: 2017. WHO; 2018 [updated 2018]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html.
5. Ministry of Health. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2014;13-20.
6. Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansonii e geo-helminthos. Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. 2018; Série Esquistossomose – 17: pp90.
7. Medronho RDA. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. In Política de Saúde. 1995;15. CICT.
8. Vine MF, Degnan D, Hanchette C. Geographic Information Systems: Their use in environmental epidemiologic research. Environ Health Perspect. 1997;105:598-605.
9. OPAS. Uso de los Sistemas de Información Geográfica em Epidemiología (SIG-EPI). Organización Panamericana de la Salud, Boletín Epidemiológico. 1996;17(1):1-6.

10. Carvalho MS, Pina MF, Santos SM. Conceitos Básicos de Sistemas de Informação Geográfica e Cartografia Aplicados à Saúde. Brasília. Organização Panamericana de Saúde, Ministério da Saúde. 2000;124.
11. Carvalho MS, Souza-Santos R. Analysis of spatial data in public health: methods, problems, and perspectives. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(2):361-378.
12. Austin MP. Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling. *Ecological modelling*. 2002;157(2):101-118.
13. Waller LA, Gotway CA. *Applied Spatial Statistics for Public Health Data*. New Jersey, John Wiley & Sons. 2004. 520 p.
14. Bavia ME, Hale LF, Malone JB, Braud DH, Shane SM. Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *The American journal of trop med and hygiene*. 1999;60(4):566-572.
15. Cardim LL, Ferraudo AS, Pacheco STA, Reis RB, Silva MMN, Carneiro DDMT, Bavia ME. Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2011;899-908.
16. Gomes E, Leal-Neto OB, Albuquerque J, da Silva H, Barbosa CS. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco-Brazil. *International journal of health Geographics*. 2012;11(1):51.
17. Guimarães RJ, Fonseca FR, Dutra LV, Freitas CC, Oliveira GC, Carvalho OS. A study of Schistosomiasis prevalence and risk of snail presence spatial distributions using geo-statistical tools. In *Schistosomiasis*. InTech. 2012;255-280.
18. Fonseca F, Freitas C, Dutra L, Guimarães R, Carvalho O. Spatial modeling of the *Schistosomiasis mansoni* in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. *Acta trop*. 2014;133:56-63.
19. Barbosa CS, Barbosa VS, Nascimento WC, Pieri OS, Araujo KCGM. Study of the snail intermediate hosts for *Schistosoma mansoni* on Itamaracá Island in northeast Brazil: spatial displacement of *Biomphalaria glabrata* by *Biomphalaria straminea*. *Geospatial Health*. 2014;8:345-351.
20. Santos ADD, Lima ACR, Santos MB, Alves JAB, Góes MADO, Nunes MAP, Sá SLCS, Araújo KCGMD. Spatial analysis for the identification of risk areas for schistosomiasis mansoni in the State of Sergipe, Brazil, 2005-2014. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(5):608-615.
21. Anaruma Filho F, Sant'Ana JM, dos Santos RF, Castagna CL. Environmental inducers of *Schistosomiasis mansoni* in Campinas, Brazil. *Geospatial Health*. 2010;5(1):79-91.
22. Teles HMS, Ferreira CS, Carvalho MED. Assessment of control and epidemiologic details of the schistosomiasis mansoni in Bananal, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2014;17:531-542.
23. Ferreira JM, Meira JA. Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do Estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipaçu). Foco autóctone na cidade de Ourinhos. *Rev Paul Med*. 1952;41(1):15-18.
24. Piza JDT, Ramos ADS, Moraes LDC, Corrêa RDR, Takaku L, Pinto ADM. Carta planorbídica do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde, Campanha de Combate à Esquistossomose, 1972, CACEsq, sd.
25. Teles HMS, Vaz JF. Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1987;21(6):508-512.
26. Teles HMS. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2005;38(5):426-32.
27. Tuan R. Diversity and distribution of the *Biomphalaria* species in the middle reaches of the Paranapanema River, São Paulo, SP, Brazil. *Biota Neotrop*. 2009;9(1):279-283.
28. Rey L. Primeiro encontro de planorbídeos naturalmente infestados por furcocercárias de *S. mansoni* no planalto paulista (Ourinhos). *Rev Clín Sao Paulo*. 1952;28:57-64.
29. Magalhães LA, Dias LCS. Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). *Rev Saúde Pública*. 1973;7(3):295-297.
30. Chieffi, PP, Waldman EA. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1988;4(3):257-275.
31. Piza JDT, Ramos ADS, 1960. Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo. *Arq Hig*. 25(86):261-271.

32. Waldman EA, Silva LJ, Monteiro CA. Trajetória das Doenças Infecciosas: da Eliminação da Poliomielite à Reintrodução da Cólera. Informe Epidemiológico do SUS 1999. 1999;8(3):5-47.
33. Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. Ciênc saúde coletiva. 2000;5(2):333-345.
34. OMS. Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Organização Mundial de Saúde. 2010, 188 p.
35. WHO- World Health Organization. Schistosomiasis: progress report 2001-2011 and strategic plan 2012-2020. Geneva: Who;2013, 74 p.
36. CBH-MP. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2018 (Ano Base: 2017) – UGRHI-17. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. 2018. [updated 2019]. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorios/>
37. CBH-MP. Relatório Zero Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da UGRHI-17 | ano: 1999. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema, 1999. [updated 2019]. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorioz/>
38. Eduardo MBP. Avaliação da Esquistossomose no Estado de São Paulo. Documento técnico/Relatório de Avaliação. Secretaria do Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimenta, 2008, 59 p.
39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas de população residente nos Municípios Brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2018. IBGE; 2018 [updated 2019]. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html?=&t=resultados>.
40. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos confirmados por Evolução e por Autóctone Mun. Res. segundo UF Notificação [Internet]. Brasília: SINAN Net. Ministério da Saúde/SVS; 2018 [updated 2018]. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-net/>.
41. Centro de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Esquistossomose - [Dados estatísticos 1981 - 2009 - definitivo] [Internet]. São Paulo: CVE; 2011 [updated 2018]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
42. Peron AF, Piroli EL Projeto APPs Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo. CEDIAP-GEO- Centro de Estudo e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento 1. ed. 2011. p 23.
43. IBGE. Anuário estatístico do Brasil 1982. Rio de Janeiro: IBGE, v. 43. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1983. Disponível em: http://seculoxx.ibge.gov.br/images/seculoxx/arquivos_download/populacao/1982/populacao_m_1982aeb_016_a_017.xls
44. IBGE. Setor Censitário 2010. Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>
45. IBGE. Base Contínua 250 mil, Hidrografia. Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>
46. IBGE. Estimativas populacionais para os municípios e para as Unidades da Federação brasileiros em 01.07.1994. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. Disponível em: https://downloads.ibge.gov.br/downloads_estatisticas.htm?Caminho=/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_1994/
47. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2010 [Internet]. Brasil: IBGE; 2010 [updated 2018]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm/>.
48. SMA. Rede de drenagem do estado de São Paulo obtida a partir da base do gisat (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/mapa-da-rede-de-drenagem-do-estado-de-sao-paulo/>
49. Zwiefelhofer D.B. Batch Geocoding [Internet]. Find Latitude and Longitude, 2008 [updated 2017]. Disponível em: <http://www.findlatitudeandlongitude.com/batch-geocode/>.
50. QGIS Development Team QGIS Version 2.14. Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. 2016 [updated 2018]. Disponível em: <http://www.qgis.org/>

51. Minn M. MMQGIS. A collection of QGIS vector layer operation plugins. 2018. Disponível em: <http://michaelminn.com/linux/mmqgis/>
52. Kulldorff M. SaTScan-Software for the spatial, temporal, and space-time scan statistics. Boston: Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Care. 2015. Disponível em: <http://www.satscan.org/>
53. Kulldorff M. A spatial scan statistic. *Commun Stat A- Theor.* 1997;26:1481-1496.
54. Kulldorff M. SaTScan Version 9.4. SaTScan Manual do Usuário. Translation: Pellini ACG. Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Care Institute, Boston, MA, USA. 2016.
55. Ministry of Health. 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.
56. Paraense WL, 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq. Mus. Nac.* 1975;55:105-128.
57. Paraense WL. *B. occidentalis* sp. n. from South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1981;76(2):199-211.
58. Teixeira-Neto RG, Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, Oliveira CDL, Pinheiro LC, Gontijo CMF, Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasites & vectors.* 2014;7(1):485.
59. R Development Core Team version 3.2.2. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2015.
60. Bivand R, Rowlingson B, Diggle P, Petris G, Eglén, S. Package ‘splancs’. R package version 2.01-40. 2017 [updated 2018]. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/splancs/splancs.pdf>.
61. Güllüoğlu, C. FlowMapper v0.4.1. 2016. Disponível em: <https://plugins.qgis.org/plugins/FlowMapper/version/0.4.1/>.
62. Bongiovanni S, Matos WH. Microbacia do córrego Jacu (Municípios de Assis e Cândido Mota, Oeste de São Paulo): Abordagem histórica, econômica e ambiental. Congresso Brasileiro de ciência e Tecnologia em Resíduos e desenvolvimento Sustentável, Santa Catarina. 2004;278-287. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/cd/ictr/2004/ARQUIVOS%20PDF/08/08-033.pdf>
63. Saiani CCS, Toneto Júnior R. Evolution of the access to services of basic sanitation in Brazil (1970 to 2004). *Economia e Sociedade.* 2010;19(1):79-106.
64. Fundação SEADE, Informações dos municípios Paulistas. Portal de estatística do Estado de São Paulo. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. 2016. Disponível em: <http://www.imp.seade.gov.br>
65. Teles HMS. Ecological aspects of *Biomphalaria* Preston, 1910 in the State of Sao Paulo, Brazil. I. *Syntopia. Cienc Cult.* 1988;40(4):374-379.
66. SUCEN. Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 1979-1980, do serviço Regional 11 - Marília. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias. 1980.
67. SUCEN. Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 2009-2012, do serviço Regional 11 - Marília. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias. 2012.
68. Paraense WL. The schistosome vectors in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:7-16.
69. Figueiredo WSA, 2000. Epidemiologia da esquistossomose mansônica e o processo de organização espacial: o caso do município de Ourinhos, S.P. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia (Master dissertation). 2000:40-52, 127-137.
70. Piroli VHB, Piroli EL. Deposição irregular de resíduos no leito das ruas de ourinhos e aumento das enxurradas e inundações. *Periódico Eletrônico XI Fórum Ambiental da Alta Paulista.* 2015;11(6):16-27.
71. Laurenti AEM, Piroli EL. Evolução do uso e ocupação do solo sobre as áreas de preservação permanente da microbacia urbana do córrego Christone 1972-2006 Ourinhos-SP. *RevTópos.* 2011;5(1):87-102.
72. Piroli EL, Ishikawa DTK, Demarchi JC. Análise das mudanças no uso do solo da microbacia do córrego das Furnas, município de Ourinhos-SP, entre os anos de 1972 e 2007, e dos impactos sobre

- suas áreas de preservação permanente, apoiada em geoprocessamento. Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil. INPE. 2011;(15):6333-6340.
73. Guimarães MCDA, Menezes RMTD, Tuan R. Experimental study on reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835). *Invertebrate Reproduction & Development*. 2016;60(2):145-151.
 74. Paraense WL, Côrrea LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *Jor Parasitol*. 1978;64:822-6.
 75. Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HDA, Pareja G. The evolution of sporocysts of *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907, in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and in *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev Saúde Pública*. 1981;15(4):436-448.
 76. SNSA, 2015. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. 2015 [updated 2017; cited 2017]. Disponível em: <http://app.cidades.gov.br/serieHistorica/>.
 77. Silva LJ. Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil). *Rev Saúde Pública*. 1985;19(1):1-7.
 78. Coura-Filho P. *Schistosomiasis mansoni* in urban territory. 2. A theoretical approach to the accumulation, concentration, and centralization of capital and the production of disease. *Cad Saúde pública*. 1997;13(3):415-424.
 79. Ludwig KM., Frei F, Alvares Filho F, Ribeiro-Paes JT. Correlation between sanitation conditions and enteroparasitoses in the population of Assis, Sao Paulo State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999;32(5):547-555.
 80. Frei F, Juncansen C, Ribeiro-Paes JT. Epidemiological survey of intestinal parasite infections: analytical bias due to prophylactic treatment. *Cadernos de Saúde pública*. 2008; 24(12):2919-2925.
 81. Teixeira JC, Oliveira GSD, Viali ADM, Muniz SS. Study of the impact of deficiencies of sanitation on public health in Brazil from 2001 to 2009. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 2014;19(1):87-96.
 82. Perez MD, Santos MR, Ishihata JK. Contribution to the survey of the Planorbis map in the State of São Paulo; investigation of centres of *Schistosoma mansoni* infection in its evolutionary form. III. Hydrographic area of Assis-Cândido Mota (Paranapanema Valley). *Hospital*, Rio de Janeiro. 1968;74:495-507.
 83. Menarin CA. Leituras do espaço e da política: elementos para uma história ambiental urbana. II colóquio da pós-graduação em letras "Literatura e Vida Social" UNESP, 2010: 267-282.
 84. Brússolo RG, Ely DF. O clima e a cidade: Ilhas de calor em Assis/SP. *Rev. Formação*, 2015;2(22):99-127.
 85. Rodrigues ACJ, Palmieri DA, Rodrigues RJ. Uso do geoprocessamento para planejamento, manejo e proteção de mananciais em áreas urbanas. *Tekhne e Logos*. 2018;9(1): 53-67.
 86. Borda AA, Branco JR AC. Perfil físico-químico, microbiológico e ecológico de mananciais d'água na área urbana do município de Ipaussu, São Paulo. IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Salvador/BA –2013:1-9.
 87. Coutinho JO e Pessôa SB. Sobre um foco autóctone da Esquistossomose mansônica em Jacarezinho (Norte do Paraná). *O Hospital*. 1948;31(4):531-542.
 88. Luz E, Silva SM, Carvalho AP, Castro N. Atualização da sistemática e de planorbídeos (Gasteropoda, Pulmonata) no Estado do Paraná (Brasil). *Acta Biológica Paranaense*. 1998;27.
 89. Costa AB, Bravo DS, Guilherme TS, Marqui R, Silva FTR, Melo SCCS. Esquistossomose Urbana no Norte Pioneiro do Estado do Paraná, Brasil. *Journal of Health Sciences*, 2017;19(4):251-255.
 90. Souza CPD, Caldeira RL, Drummond SC, Melo AL, Guimarães CT, Soares DDM, Carvalho OD S. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(3), 293-302.
 91. Eduardo MBP, Souza D, Ciaravolo RMC, Kanamura HY, Gargioni C, Falcão ACMG. Esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo. Aspectos epidemiológicos. *BEPA*. 2005;18:2-8.
 92. Bezerra IA. Situação da notificação em esquistossomose na Grande São Paulo (Brasil), no período de 1982 a 1983. *Rev Saúde Pública*. 1984;18(5):386-395.
 93. Ministry of Health, Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal, na área de epidemiologia e controle de doenças, define a

- sistemática de financiamento. Diário Oficial da União, Brasília. Seção 1.1999. Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999.
94. Barbosa CS, Silva CBD, Barbosa FS. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. Rev Saúde Pública. 1996;609-616.
 95. Wanderley DMV, Glasser CM, Silva B, Teles FB, 2006. Superintendência de Controle de Endemias-Sucen: 30 anos de trajetória. Suplemento especial do BEPA. 2006;3-9.
 96. CVE. Vigilância epidemiológica e controle da esquistossomose: normas e instruções. Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo. 2007.
 97. Tibiriçá SHC, Guimarães FB, Teixeira MTB. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. Ciência & Saúde Coletiva. 2011; 16:1375-1381.
 98. Araujo ISD, Moreira ADL, Aguiar R. Doenças negligenciadas, comunicação negligenciada. Apontamentos para uma pauta política e de pesquisa. R Eletr Com Infl nov Saúde. Rio de Janeiro. 2013;6(4).

6.2 MANUSCRITO 2: Biodiversidade de *Biomphalaria* spp. e outros moluscos límnicos associados em áreas suscetíveis a transmissão da esquistossomose na região do Médio Paranapanema, utilizando ferramentas moleculares e espaciais. Biota Neotropica, submetido em 2019.

Raquel Gardini Sanches Palasio^{1,2}, Iara Giordano Xavier³, Francisco Chiaravalloti-Neto²,
Roseli Tuan¹

¹Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, 01027-000, Luz, SP, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública - USP, 01255-000, Pinheiros, SP, Brasil. ³Superintendência de Controle de Endemias - SR11, 14501-100, Marília, SP, Brasil. E-mail: raquelpalasio@usp.br

6.2.1- RESUMO

A região do Médio Paranapanema em São Paulo, Brasil, é uma área que abriga uma biodiversidade significativa das espécies de *Biomphalaria*, vulnerável a acometimentos ambientais e em saúde, como a esquistossomose. O objetivo deste trabalho foi atualizar a carta malacológica da região da Bacia hidrográfica do Médio Paranapanema, com ênfase no gênero *Biomphalaria*. Foram coletados caramujos em 114 coleções hídricas independentes nos municípios de Ourinhos, Assis, Ipaussu, Chavantes e Ribeirão do Sul no período de 2015-2018. Os caramujos das espécies de *Biomphalaria* foram identificados através de caracteres morfologia e moleculares, enquanto caramujos de outros gêneros foram identificados apenas através de características conchiológicas (*Drepanotrema*, *Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa* e *Pomacea*). Além disso, ferramentas de análises geoespaciais foram utilizadas para atualizar os locais de colonização dos caramujos e, conseqüentemente, auxiliar na identificação de possíveis pontos críticos para hospedeiros intermediários da esquistossomose. As sequências do gene COI relacionadas ao DNA *Barcode* foram testadas quanto à similaridade com sequências depositadas no GenBank e analisadas em ABDG, bPTP e GMYC para delimitação de espécies putativas. Dos 10722 caramujos coletados, 86.7% eram da família *Planorbidae* (75.5% *Biomphalaria* e 11.2% *Drepanotrema*) e 13.3% de outros gêneros não planorbídeos (*Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa* e *Pomacea*). A comparação das sequências taxonômicas de COI com o banco de dados de nucleotídeos do NCBI e análise filogenética usada para testar a monofilia dos grupos resultaram em delimitações taxonômicas comparáveis à delimitação morfológica. As análises de distribuição das espécies mostram que *B. glabrata* e *B. tenagophila* estão distribuídas entre o rio Pardo e rio Paranapanema, concentradas em poucos pontos em Ourinhos e Ipaussu, respectivamente. *B. glabrata* coloniza apenas cinco coleções hídricas na área de estudo. Por outro lado, *B. straminea*, *B. occidentalis* e *B. peregrina* estão distribuídas uniformemente na área de estudo.

Palavras chave: *Biomphalaria*, caramujo de água doce, biodiversidade, distribuição, código de barras DNA.

Palasio, R. G.S, Rosa-Xavier, I. G, Chiaravalloti-Neto, F & Tuan, R. **Biodiversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated limnic mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools.** Biota Neotropica submitted in 2019.

6.2.2- ABSTRACT

The Middle Paranapanema river region of São Paulo, Brazil is home to significant biodiversity of *Biomphalaria* species and is very vulnerable to health and environmental impacts such as schistosomiasis. This study updates freshwater malacological surveys for ecosystems in one portion of the Middle Paranapanema River watershed, with emphasis on the genus *Biomphalaria*. Snails were collected from 114 distinct bodies of water between 2015 and 2018, and *Biomphalaria* individuals were identified according to morphological and molecular characteristics, while animals in other genera (*Drepanotrema*, *Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa*, and *Pomacea*) were identified solely according to shell characteristics. A geographic information system was used to update intermediate host colonization sites and consequently assist in identifying probable critical points for intermediate hosts of schistosomiasis. The sequences of the COI gene relating to the DNA Barcode stretch were tested for similarity against sequences found in GenBank and analyzed in ABDG, bPTP and GMYC for the delimitation of putative species. Of the 10,722 snails collected, 86.7% were in the Planorbidae family (75.5% *Biomphalaria* and 11.2% *Drepanotrema*) and 13.3% were other non-Planorbidae species (*Lymnaea*, *Melanoides*, *Physa*, and *Pomacea*). The taxonomic COI reference sequences in the NCBI nucleotide database used DNA sequence comparison and phylogenetics to obtain more reliable taxonomic results than delimitation of the COI sequences in MOTUs using statistical models. *B. glabrata* and *B. tenagophila* were distributed in the Pardo and Paranapanema Rivers, while *B. straminea*, *B. occidentalis*, and *B. peregrina* were evenly distributed across the study area, and *B. glabrata* colonized only five bodies of water in the study area.

Key words: *Biomphalaria*, freshwater snails, biodiversity, DNA Barcode, distribution.

6.2.3- INTRODUÇÃO

A porção média do rio Paranapanema, localizada no estado de São Paulo, Brasil, é dominada por áreas de topografia plana, com ecossistemas lênticos como córregos, pântanos e banhados que são colonizados por macrófitas. Estes ecossistemas que sustentam uma fauna diversa de moluscos de água doce dos gêneros *Biomphalaria* (Preston, 1910); espécies descritas na região são *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848), *B. occidentalis* (Paraense, 1981), e *B. peregrina* (d'Orbigny, 1835), como também *Pomacea* (Perry, 1810), *Drepanotrema* Fischer e Crosse, 1880, *Lymnaea* Lamarck, 1799, *Melanoides* Olivier, 1804 e *Physa* Draparnaud, 1801 (Piza et al. 1972, Vaz et al. 1989, Luz et al. 1988, Teles 1989, Maure et al. 1998, Fernandez et al. 2003, Carvalho et al. 2008, Tuan 2009, Scholte et al. 2012, Maltchik et al. 2010, Medeiros et al. 2014, Pereira et al. 2017).

A riqueza de espécies, associada ao volume e extensão hídrica da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema, representa uma grande oportunidade para explorar a biodiversidade de caramujos e sua relação com o potencial de transmissão de doenças de veiculação hídrica. No caso do gênero *Biomphalaria*, a região do Médio Paranapanema é vulnerável à transmissão da esquistossomose humana, uma vez que em suas coleções de água doce são encontradas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, as três espécies em que se desenvolvem as cercárias do parasita *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, trematódeo que infecta o homem causando a esquistossomose.

A identificação taxonômica de espécies do gênero *Biomphalaria* usa caracteres anatômicos binários, com alto coeficiente de retenção e consistência dentro de uma mesma espécie, associados a caracteres que apresentam grande variação em número e forma (Paraense 1961, 1975, 1981). A taxonomia feita de forma tradicional exige minuciosa observação de caramujos de variadas coleções de água doce e de uma extensa área geográfica.

As variações intraespecíficas que ocorrem em caracteres morfológicos, usados na identificação de espécies de *Biomphalaria*, são geralmente minimizados, sendo por este motivo a identificação baseada exclusivamente na anatomia dos caramujos, ainda pouco resolutiva para abarcar a biodiversidade natural das espécies.

Resultados obtidos em espécies de moluscos límnicos e terrestres, que têm importância médica na região Neotropical, mostram a importância de combinar métodos tradicionais de análise morfológica a métodos moleculares para identificação de espécies conhecidas e para identificação de potenciais espécies crípticas (Langand et al. 1999, Vidigal et al. 2000, 2013,

Campbell et al. 2000, Dejong et al. 2003, Wethington et al. 2007, Teodoro et al. 2010, Tuan et al. 2012, Palasio et al. 2017, Bezerra et al. 2018).

A análise molecular demonstra que em *Biomphalaria* existe diferenciação genética intraespecífica significativa em algumas espécies como *B. tenagophila*, *B. glabrata*, *B. peregrina* e *B. straminea*, o que sugere a presença de linhagens diferenciadas em áreas geográficas contíguas (Tuan & Santos 2007, Palasio et al. 2018). São resultados que contrastam com a homogeneidade fenotípica encontrada no estudo morfológico, demonstrando que os caracteres moleculares utilizados na delimitação de espécies de *Biomphalaria* podem ampliar o conhecimento da biodiversidade de caramujos de água doce.

A estreita relação entre caramujos do gênero *Biomphalaria* e a saúde humana faz de estudos de biodiversidade deste grupo fundamental, uma vez que a prática taxonômica e o próprio mapeamento dos ecossistemas aquáticos são pré-requisitos para ações de monitoramento e controle da esquistossomose. No contexto da saúde pública a integração de novas abordagens pode influenciar a adoção das estratégias futuras (Salkeld et al. 2015).

A técnica de análise espacial vem sendo sistematicamente utilizada para analisar padrões de distribuição de espécies de caramujos do gênero *Bulinus* e *Biomphalaria*, que colonizam regiões específicas da África (Simoonga et al. 2009, Moser et al. 2014). No Brasil, a utilização de sistemas de Informação Geográfica (SIGs) aplicados em estudos de distribuição de caramujos hospedeiros intermediários de *S. mansoni* em áreas de alta endemicidade do estado da Bahia (Bavia et al. 1999, Cardim et al. 2011), Pernambuco (Almeida et al. 2003, Gomes et al. 2012), Minas Gerais (Guimarães et al. 2009, 2010, 2012, Fonseca et al. 2014) e Sergipe (Barboza et al. 2012, Santos et al. 2016).

O mapeamento da distribuição de espécies de *Biomphalaria* no estado de São Paulo foi feita por meio de métodos de mapeamento tradicionais, que registram em cartas malacológicas a distribuição das espécies em setores administrativos macrogeográficos (Piza et al. 1972, Vaz et al. 1983, 1985, 1986, 1987, 1992, Teles et al. 1988). Não existe registro de uma carta malacológica para a região do médio rio Paranapanema. No caso desta região, é importante atualizar a distribuição dos caramujos e unificar essas informações em uma carta malacológica, baseada em metodologia de análise geoespacial.

Dentro dessa perspectiva, nossa análise foi desenvolvida para investigar a biodiversidade da malacofauna, particularmente os padrões de distribuição das espécies de *Biomphalaria*, com ferramentas de análise geoespacial e taxonomia que integram as abordagens morfológica e molecular.

6.2.4- MATERIAL E MÉTODOS

6.2.4.1 Área do estudo e coleta de caramujos

A área de estudo encontra-se localizada na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Médio Paranapanema (UGRHI-17), região Oeste/Sudoeste do estado de São Paulo, na fronteira com o estado do Paraná, Brasil (Figura 1). Esta região possui paisagens antropogênicas inseridas entre extensas áreas de plantação de cana-de-açúcar, soja, café e áreas de pastagem (Peron & Piroli 2011, CBH-MP, 2018ab).

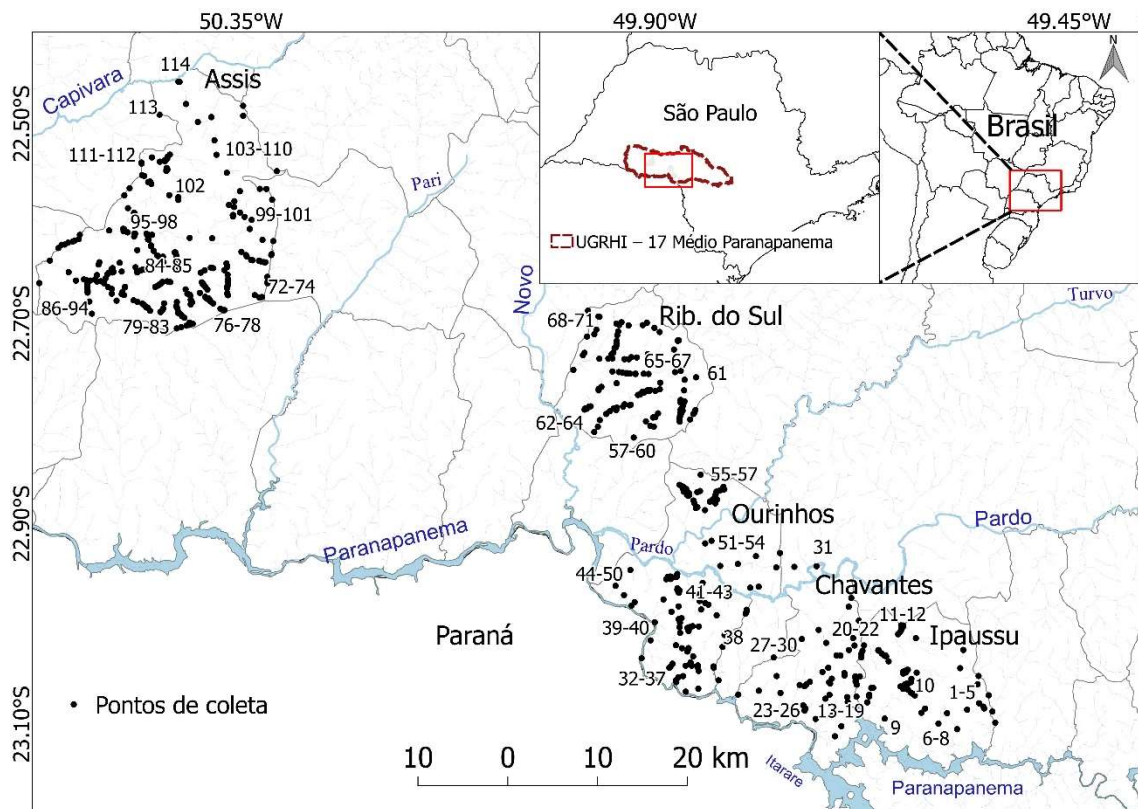


Figura 1 - Pontos de coletas planorbídica e malaco fauna associada em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. * números corresponde às coleções hídricas, Anexo B IV.

Os rios Paranapanema, Pardo, Turvo, Novo, Capivara, Pari percorrem a região e integram a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Médio Paranapanema (UGRHI – 17) (SAFRE & MANZIONE, 2015; CBH-MP, 2018bc).

As coletas foram feitas em 114 ecossistemas de água doce (62 coleções hídricas em áreas rurais, 11 em áreas urbanas e três em áreas periurbano), situados nos municípios de Ipaussu, Chavantes, Ourinhos, Ribeirão do Sul e Assis (Figura 1). As coletas foram feitas em ecossistemas, onde se registravam relatos anteriores de caramujos de importância médica. A

localização e os limites das coleções hídricas, principais e seus tributários menores, foram identificados a partir de mapas físicos, obtidos em cada um dos cinco municípios citados acima.

As amostras de caramujos foram obtidas em no mínimo 1 e no máximo 44 pontos de coleta, em intervalos de 250 m a 1000 m de distância, em cada uma das 114 coleções de água doce, totalizando 654 pontos de amostragem (ANEXO B II, VII). A variação de pontos de coleta em um mesmo corpo de água doce se deve a variação da extensão total (Km) das coleções de água, alvo deste estudo. Os resultados variaram de 1 até 159 caramujos por amostra, em função da produtividade do criadouro e extensão dos pontos de coleta. Os caramujos foram coletados com concha de captura padronizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2008) nos meses de março, junho, setembro e dezembro de 2015 a 2018. Todos foram acondicionados em recipientes com água dos próprios ecossistemas para manutenção dos exemplares vivos. No laboratório de Ourinhos, os caramujos coletados nos pontos de coleta foram agrupados e embalados em gaze seca e enviados para identificação no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SUCEN (LBBM). Todos os pontos foram georreferenciados por meio de aparelho GPS Garmin ®Etrex, com margem de erro exato de +/- 3,6 metros (12 pés).

6.2.4.2 Identificação morfológica e molecular dos caramujos

Os caracteres conchiológicos dos caramujos coletados foram usados para a identificação até o nível de gênero. Todos os caramujos do gênero *Biomphalaria* foram expostos à luz artificial durante 4 horas para estimular a liberação de cercárias de *S. mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2008).

De cada uma das amostras com a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria*, distinguíveis por exame conchiológico, foi separada uma subamostra de até cinco exemplares adultos e/ou jovens para a identificação morfológica e molecular.

O processo de identificação morfológica dos caramujos consistiu, primeiramente, na separação das partes moles de suas conchas, após relaxamento do músculo columelar do animal, em água à temperatura de 70 °C. Em seguida, uma porção da região podal de 1 mm nos exemplares jovens, e aproximadamente 10 mm nos adultos, foram excisadas da região céfalo-podal e separadas para a identificação molecular. As demais partes moles dos adultos foram mantidas em solução Raillet-Henry por um período mínimo de três dias, sendo a seguir dissecadas e identificadas por características morfológicas do aparelho reprodutor, conforme Deslandes (1959) e Paraense (1975, 1981). As peças utilizadas para identificação morfológica foram mantidas como *vouchers* em tubos com fixador Raillet-Henry, no Laboratório de

Biologia Molecular da SUCEN (LBMSU), identificados com os números: LBMSU-670-674, 675-722, 727-829, 864-899, 935-957, 973-977, 1007-1026, 1042-1063, 1094-1099 e 1118-1252 (Anexo B VII).

A porção da região céfalo-podal de animais adultos e jovens foi submetida aos procedimentos de extração e purificação de DNA genômico em *Qiagen Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). O material genômico resultante da extração e purificação se encontra preservado em freezer à temperatura de -20°C, no LBMSU.

O DNA genômico purificado de cada indivíduo foi submetido à amplificação do trecho do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I, utilizando os primers LCO-1490 e HCO-2198 (Folmer 1994) de acordo com o protocolo do DNA *Barcode* (Herbert et al. 2003) e protocolo de PCR descrito em Tuan et al. (2012). Os produtos amplificados foram sequenciados no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems®), no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan.

Os eletrocromatogramas foram visualizados e analisados em Chromas (Technelysium Pty Ltd.), alinhadas no programa MAFFT, versão 7 (Kato et al. 2017, <<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>>), sob o parâmetro Q-INS-I altamente rigoroso. As sequências foram visualmente corrigidas em BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) e analisadas individualmente no banco de dados do NCBI (<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>) para a obtenção dos valores de similaridade entre a sequência alvo e as sequências previamente depositadas no GenBank.

Para a análise por métodos de delimitação de espécies em unidades taxonômicas (DNA *Barcode*) foram utilizadas as sequências de COI, previamente identificadas morfologicamente, e as sequências de espécimes imaturos e com morfologia ambígua. Para isso, foram usados os seguintes testes estatísticos: i) ABGD (Puillandre et al. 2012), que usa a distância como parâmetro para inferência do *Barcode gap*; ii) GMYC (Fujisawa & Barraclough 2013), cujo algoritmo usa modelos de especiação e coalescência para inferência de espécies putativas; e iii) bPTP (Zhang et al. 2013), que calcula a maior probabilidade de ramos por meio de análise bayesiana.

Os resultados baseados na distância genética entre as sequências foram obtidos na versão *on-line* do *software* ABGD (<<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>>). Os resultados em modelo GMYC (Fujisawa & Barraclough 2013) foram obtidos na versão *on-line* (<<https://species.h-its.org/gmyc/>>), a partir de árvore ultramétrica, calculada a partir do agrupamento das sequências COI por método *Neighbor-Joining* (NJ), com modelo GTR+G em MEGA X (Kumar et al. 2018). O resultado em bPTP (Zhang et al. 2013) foi obtido na versão

on-line do *software* (<<https://species.h-its.org/>>), utilizando como *input file* uma árvore com sequências agrupadas por *Neighbor-Joining* (NJ), e modelo GTR+G gerada no programa MEGA X. Os modelos foram selecionados por meio de *Akaike Information Criterion* (AIC), utilizando o programa *Modelgenerator* (Keane et al. 2006).

Para testar a hipótese de monofilia, as sequências COI foram analisadas por Máxima-Verossimilhança (ML) no *software* PHYML3.2 (Guindon & Gascuel 2003), que utiliza o método heurístico NNI para obter a árvore inicial e busca exaustiva (SSR) para obter a árvore com o maior valor de verossimilhança. Os valores de apoio para os ramos foram obtidos pelo método paramétrico *approximate Likelihood Ratio Test* (aLRT) associado ao método não paramétrico Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira & Hasegawa 1999, Anisimova et al. 2011). As análises foram feitas no modelo *General Time Reversible* (GTR). As árvores, com as sequências de COI deste estudo, mais duas sequências de *outgroup* das espécies *B. stanleyi* (Smith, 1888) e *B. choanomphala* (Martens, 1879) (HM768906 e DQ084837: COI) foram visualizadas em Treeview (Page 2001).

6.2.4.2 Mapa de distribuição malacológica

As informações sobre a identificação dos caramujos no nível de espécie e gênero, associados às coordenadas dos locais de coleta, foram utilizadas para a confecção de mapas temáticos com a distribuição das espécies de *Biomphalaria* e dos outros grupos malacológicos. Este procedimento realizado no Programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS Development Team, 2018). Os materiais cartográficos com camadas de rios e setores censitários foram obtidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) (IBGE, 2010a, 2010b, 2010c; SMA, 2013).

6.2.5- RESULTADOS

6.2.5.1 Composição taxonômica.

No período entre 2015-2018, foram coletados 10.722 caramujos com características conchiológicas de animais pertencentes aos gêneros *Biomphalaria* spp., *Drepanotrema* spp., *Physa* spp., *Melanoides* spp., *Lymnaea* spp. e *Pomacea* spp. Esses caramujos foram encontrados em 258 pontos de coleta, totalizando 473 amostras positivas. Nesse mesmo período, foram obtidos resultados negativos em 396 pontos de coleta, reunidos em 421 amostras.

Das 473 amostras positivas, em 298 foram coletados somente caramujos do gênero *Biomphalaria* (N=7092). Já em 108 amostras (N=1960), foram coletados caramujos dos gêneros *Drepanotrema* spp., *Physa* spp., *Melanooides* spp., *Lymnaea* spp. e *Pomacea* spp. No restante das 67 amostras positivas, foram coletados 1006 caramujos do gênero *Biomphalaria*, associados de forma aleatória, a caramujos pertencentes aos outros gêneros (N=664), acima descritos. Caramujos pertencentes ao gênero *Lymnaea* foram encontrados em apenas 13 pontos de coleta, sendo três destes exemplares pertencentes à espécie *Lymnaea columella* (Say, 1817), sem presença de trematódeos (*Voucher* depositado no Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose - LRNEM, do Instituto Oswaldo Cruz, com número LRNEM-NA201/17 e 198/17). Nenhum caramujo do gênero *Biomphalaria* eliminou cercárias de *S. mansoni*. A composição taxonômica total baseada na conchiologia e a frequência absoluta (%) está representado na Figura 2.

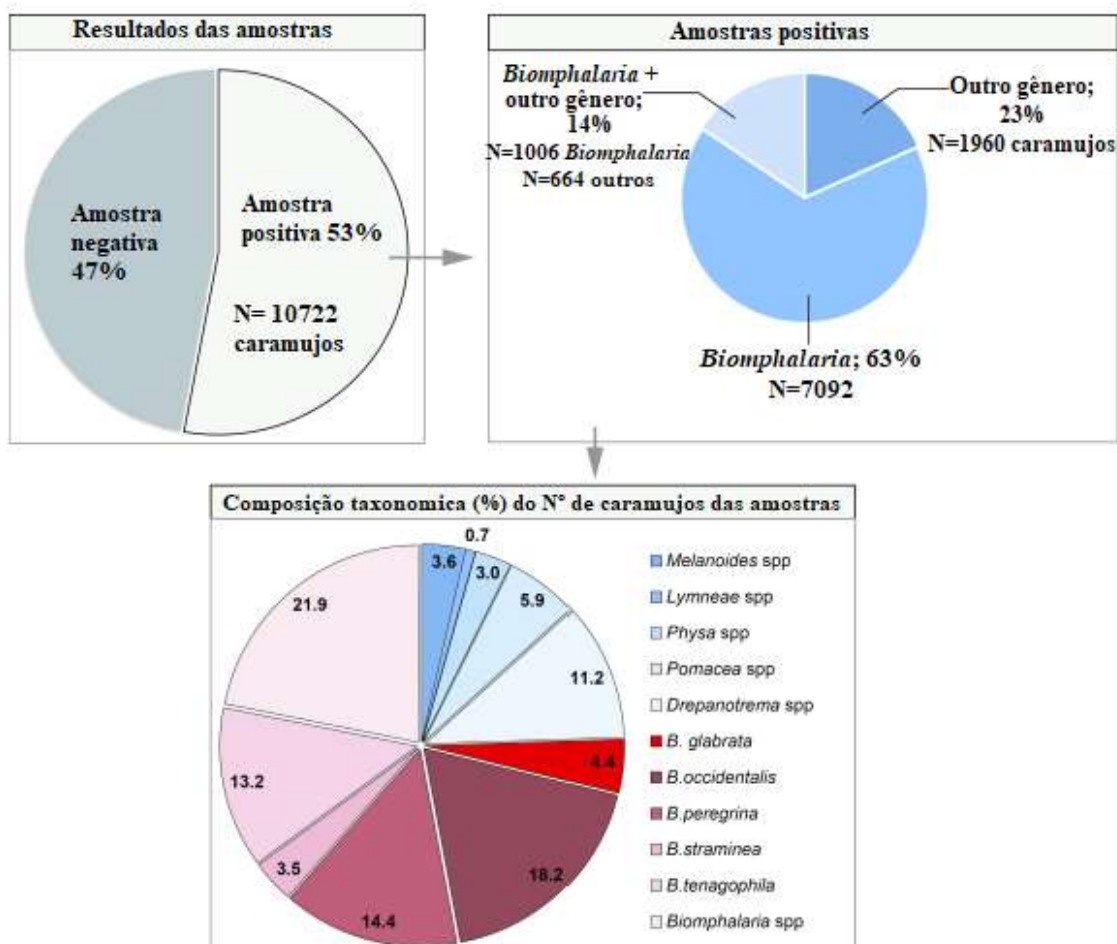


Figura 2 - Resultados da amostragem e frequência observada das espécies de *Biomphalaria*, e caramujos dos gêneros *Drepanotrema*, *Physa*, *Pomacea*, *Melanooides* e *Lymnaea*, observados nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, no período de 2015-2018.

Do total de 365 amostras positivas que continham exemplares do gênero *Biomphalaria*, foi possível aplicar métodos de identificação específica em exemplares de 276 amostras. Nas 89 amostras restantes, a identificação específica tornou-se inviável devido à mortalidade dos espécimes, durante o transporte do campo para o laboratório.

Do total de 276 amostras de caramujos do gênero *Biomphalaria*, a identificação taxonômica por caracteres morfológicos e moleculares foi aplicada em 144 amostras. Devido aos problemas técnicos na extração, purificação de DNA genômico e amplificação, 63 amostras de caramujos foram identificadas unicamente por caracteres morfológicos. Caramujos imaturos (4 amostras), com morfologia ambígua e com enrugamentos do aparelho reprodutor, decorrentes de problemas na obtenção das partes moles (65 amostras), ofereceram uma oportunidade a mais de aplicar o DNA *Barcode*. Isto porque nesses espécimes foi impossível fazer a dissecação ou a identificação morfológica.

As amostras com identificação por biologia molecular estrita, ou em conjunto com morfológica (4+65+144= 213 amostras), produziram 275 sequências do gene COI, que foram comparadas por similaridade com as sequências depositadas no GenBank. Todas as sequências COI obtidas no presente estudo corresponderam as espécies nominais presentes no GenBank, com número de acesso KX354433-KX354444 e MK395801 - MK396064. Dados referentes às coordenadas geográficas e números de referências das sequências COI estão no ANEXO B VII (pg. 206).

6.2.5.2 Taxonomia morfológica e molecular integradas.

Para a análise dos métodos de delimitação de espécies em unidades taxonômicas (DNA *Barcode*), foram avaliadas 275 sequências, sendo 177 do gene COI de indivíduos adultos, previamente identificados morfológicamente, e 98 de indivíduos imaturos ou com morfologia ambígua.

Os menores valores (5%) de divergência genética interespecífica foram observados quando comparadas as sequências de *B. tenagophila* vs. *B. occidentalis*, e os maiores valores (12%), quando comparadas as sequências de *B. peregrina* vs. *B. glabrata* e *B. peregrina* vs. *B. tenagophila*. (Tabela 1).

Tabela 1 - Distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas (cinza escuro) de 275 sequências do gene COI de espécies de *Biomphalaria* coletadas no Médio Paranapanema (São Paulo, Brasil), no período de 2015-2018, usando o modelo Kimura de 2 parâmetros (K2p, Kimura 1980). Os valores foram obtidos em MEGA X.

	<i>B. occidentalis</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. peregrina</i>
<i>B. occidentalis</i>	0.00-0.00				
<i>B. tenagophila</i>	0.05	0.00-0.00			
<i>B. glabrata</i>	0.08	0.08	0,00-0.01		
<i>B. straminea</i>	0.08	0.08	0.08	0.00-0.01	
<i>B. peregrina</i>	0.11	0.12	0.12	0.10	0.00-0.08

A análise da distribuição dos valores de distância K2p calculados entre pares de sequências COI exibidos na figura 3 mostra uma zona de intersecção entre os valores intra e interespecíficos. Esta zona de intersecção é formada por 10% das sequências do táxon *B. peregrina*.

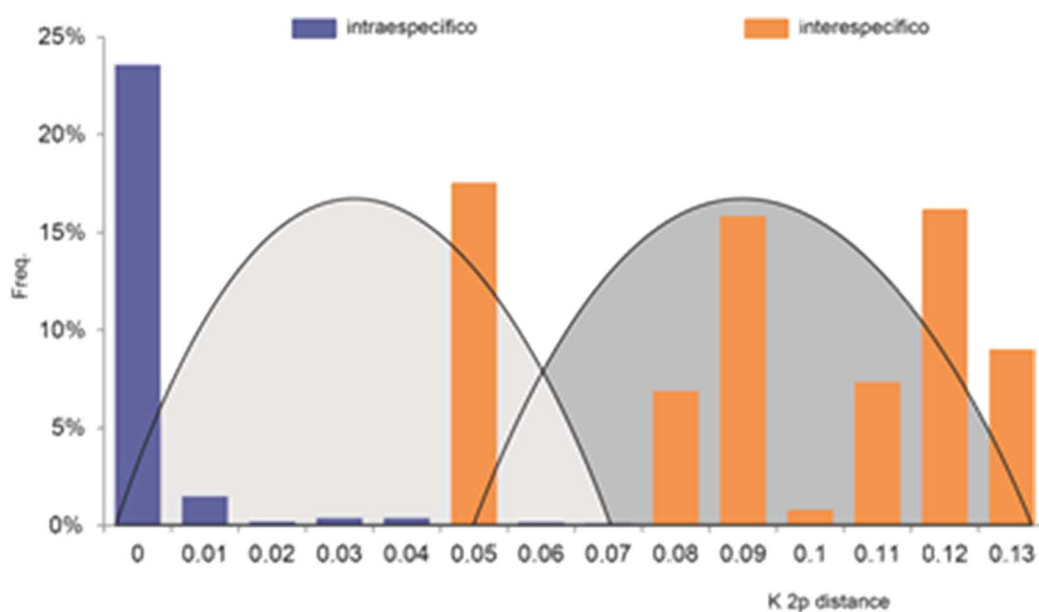


Figura 3 - Distribuição das 275 sequências do gene COI de *Biomphalaria* coletadas no Médio Paranapanema (São Paulo, Brasil), no período de 2015-2018, comparadas aos pares, conforme a distância K2p calculada em MEGA X.

Quando analisadas em ABGD, bPTP e GMYC, as sequências COI de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. occidentalis* com os menores valores de diversidade genética intraespecíficas, resultaram em três grupos diferenciados de unidades moleculares taxonômicas operacionais (MOTUs). Existem, entretanto, diferenças entre os três métodos estatísticos quanto ao número de MOTUs em espécies com maiores índices de diversidade genética intraespecífica. Em ABGD, *B. peregrina* foi identificada em dois grupos de espécies putativas. Em bPTP, *B.*

peregrina e *B. straminea* foram identificados, respectivamente, em três e dois grupos, enquanto em GMYC, há suporte estatístico para a identificação de *B. peregrina* em cinco espécies putativas (Tabela 2, ANEXO B VIII, IX, ANEXO A V).

A análise filogenética mostra resultados de agrupamento das sequências em cinco ramos monofiléticos com alto suporte estatístico (Figura 4), sendo o método que mais se aproxima dos resultados taxonômicos obtidos por análise de variáveis morfológicas.

A similaridade entre as sequências do gene COI e as sequências depositadas no GenBank, é de 99-100% para *B. tenagophila*, *B. glabrata*, *B. occidentalis* e *B. straminea*. Valores mínimos de similaridade de 95% foram obtidos quando comparadas algumas sequências de *B. peregrina*. Este valor de similaridade também foi obtido em sequências derivadas de espécimes adultos ou com morfologia ambígua (Tabela 2).

Tabela 2 - Índices de similaridade entre as 275 sequências do gene COI (177 sequências identificadas por morfologia e 98 sequências de indivíduos imaturas e morfologia ambígua) de *Biomphalaria* coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018 e as sequências fornecidas pelo Genbank, conforme os métodos ABGD, bPTP e GMYC.

Melhor método da árvore de *input file* = *HKY+G, ** GTR+G # = mínima divergência específica (0,215) e máxima divergência específica (0.369). CH= Coleção Hídrica. *MOTU=unidade molecular taxonômica operacional.

	Espécie morfológica	Nº seqs	Nº CH	Genbank				Nº grupos		
				Nº seqs	E Best fit	Best fit MOTU	Best-fit Sequências	ABGD	bPTP*	GMYC**
Adultos	<i>B. glabrata</i>	17	4	29	100	<i>B. glabrata</i>	KF926182.1	1	1	1
	<i>B. occidentalis</i>	58	23	21	100	<i>B. occidentalis</i>	KF926175.1 KF926221.1	1	1	1
	<i>B. peregrina</i>	45	18	14	95-99	<i>B. peregrina</i>	KF926176.1 KY124272.1	2	3	5
	<i>B. straminea</i>	11	7	96	99	<i>B. straminea</i>	KF926190.1, NC_036993.1	1	2	2
	<i>B. tenagophila</i>	46	9	107	100	<i>B. tenagophila</i>	MF380476.1	1	1	1
	Total		177	45					6#	8
Morfologia ambígua (Ma)		8	4	29	100	<i>B. glabrata</i>	KF926182.1	1	1	1
	<i>Biomphalaria</i> spp.	52	19	21	100	<i>B. occidentalis</i>	KF926175.1 KF926221.1	1	1	1
		13	10	15	95-100	<i>B. peregrina</i>	KF926176.1, KY124272.1	2	3	4
		7	6	96	99	<i>B. straminea</i>	KF926190.1, NC_036993.1	1	2	2
		11	8	107	100	<i>B. tenagophila</i>	MF380476.1	1	1	1
Imatura (Im)		2	1	29	100	<i>B. glabrata</i>	KF926182.1	1	1	1
	<i>Biomphalaria</i> spp.	4	2	21	100	<i>B. occidentalis</i>	KF926175.1	1	1	1
		1	1	107	100	<i>B. tenagophila</i>	MF380476.1	1	1	1
	Total		98	32				6#	8	9
Adultos + Im + Ma	<i>B. glabrata</i> + Ma + IM	27	5	29	100	<i>B. glabrata</i>	KF926182.1	1	1	1
	<i>B. occidentalis</i> + Ma + IM	114	28	21	100	<i>B. occidentalis</i>	KF926175.1 KF926221.1	1	1	1
	<i>B. peregrina</i> + Ma	58	26	14	95-99	<i>B. peregrina</i>	KF926176.1, KY124272.1	2	3	6
	<i>B. straminea</i> + Ma	18	9	96	99	<i>B. straminea</i>	KF926190.1, NC_036993.1	1	2	2
	<i>B. tenagophila</i> + Ma + IM	58	12	107	100	<i>B. tenagophila</i>	MF380476.1	1	1	1
	Total		275	65				6#	8	11

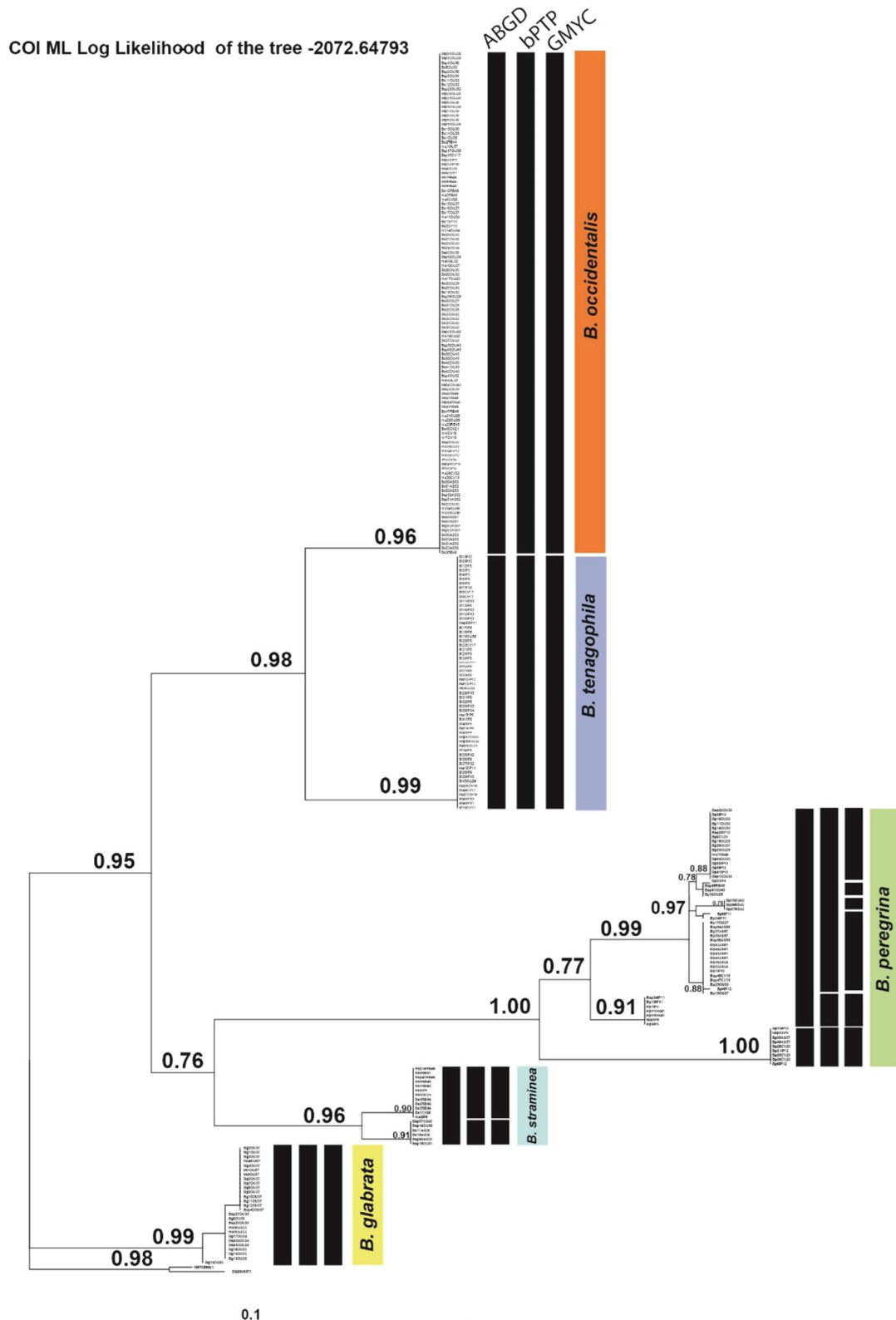


Figura 4 – Arvore filogenética Máxima Verossimilhança com o alinhamento de 275 seqüências de COI de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas seqüências de *outgroup* sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT. As barras em preto indicam as delimitações de espécies com base na distância (ABGD) e baseados em árvore (bPTP e GMYC), respectivamente. As barras coloridas as delimitações baseadas na similaridade das seqüências com as seqüências do GenBank e Morfologia.

A tabela 3 apresenta os resultados do levantamento para as espécies do gênero *Biomphalaria*, considerando os resultados de identificação obtidos por morfologia, morfologia + DNA *Barcode*, e DNA *Barcode*, além dos resultados obtidos por análise conchiológica dos demais taxa encontrados na região de estudo, totalizando 92 coleções hídricas das 114 pesquisadas com presença de moluscos límnicos.

Tabela 3 - Diversidade de espécies de planorbídeos e outros moluscos límnicos associados coletados em 92 coleções hídricas no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. *+□●◆ = espécies ou gêneros sintopicos. *gla*=*B. glabrata*, *str*=*B. straminea*, *te*=*B. tenagophila*, *occ*=*B. occidentalis*, *per*=*B. peregrina*. ■ = *Lymnaea columella*.

Muni- cípio	Nº	Coleção Hídrica	<i>Biomphalaria</i>					<i>Drep.</i> <i>spp.</i>	<i>Lymnaea</i> <i>spp.</i>	<i>Physa</i> <i>spp.</i>	<i>Pomacea</i> <i>spp.</i>	<i>Melanooides</i> <i>spp.</i>
			<i>gla</i>	<i>str</i>	<i>te</i>	<i>occ</i>	<i>per</i>	<i>spp.</i>				
Ipaussu	1	Douradão					■					
	2	Virtuosa					■*	■			■*	■*
	3	Pau D'Alho		■*			■*					
	4	Ag. Úmida					■	■				
	5	Palmeiras				■*	■*					
	6	Lambari					■					
	7	Santo Antônio										
	8	Santa Herminia					■	■	■			■
	9	Faz. Boa Vista		■+	■*+		■*	■				
	10	São Luiz			■*+	■*	■+	■				
	11	Mombuca			■	■*	■	■			■*	■*
	12	Mombuquinha			■*+		■*	■			■+□	■□
	13	Ag. do Triunfo						■*				■*
Chav /Ipa	14	Barranco Vermelho			■		■*		■+		■*+	■*+
	15	Rib. Grande			■*□		■*	■+	■		■*+	■*+
Chavantes	16	Boa Vista (Divisa)			■*		■*	■+	■		■*+	■*+
	18	Rib. Bonito				■*					■	■*
	19	Toperó				■+□		■*	■*		■*+	■□
	20	Santo Antônio			■+	■*	■	■	■		■*+	
	21	Piranhas			■*		■	■	■			■*
	22	Morais						■*	■*+	■+		■*
	23	Harmonia					■					
	24	Colossinho		■		■*	■*	■				
	25	Tupanciretã				■						
	27	Ag. Morna				■*						■*
	28	Ag. dos Coqueiros					■*				■*	
	Ourinhos	30	Bento						■			
31		Parque Trianon		■*				■	■*	■*	■*	■*
32		Lageadinho	■									
33		Sobra	■	■*	■	■*+	■	■				■+
34		Café				■*			■*			
35		Japoneses				■	■					
36		Canaã					■					
37		Paraíso							■			
38		Barreirinha			■	■	■*		■*			
39		Jacú	■		■*	■*	■	■			■+	■+
40		Jacuzinho		■				■			■*	■*
41		Furnas				■		■			■*	■+
42		São Joaquim					■	■				
43		Furninhas			■*	■	■	■	■*		■□	■+□
44		Monjolinho				■*		■			■*	■*
45		Chumbiadinha				■	■	■			■*	■*
46		Christoni	■*+			■*	■	■	■□	■◆	■□	■+◆*
47	Ag. Veada		■		■		■					
48	Providencia							■*		■	■*	
49	Faz. Paraíso				■*			■*		■*		
51	Faz. Figueirinha								■*		■*	
52	Faz. Nova Era					■*		■*	■*			
53	Usina São Luiz				■*			■+	■*+	■*+	■+	
54	Faz. Jaquarere				■*						■*	
55	Asa Branca					■	■					
Our/Rsul	56	Fundo			■*+□	■*	■	■+◆		■□	■□◆	■□
	57	Rib. Grande			■*+	■*	■◆	■◆		■□◆	■*	■

Continuação tabela 3			<i>Biomphalaria</i>						<i>Drep.</i>	<i>Lymnaea</i>	<i>Physa</i>	<i>Pomacea</i>	<i>Melanoides</i>
Nº	Coleção Hídrica		<i>gla</i>	<i>str</i>	<i>te</i>	<i>occ</i>	<i>per</i>	spp.	spp.	spp.	spp.	spp.	
Ribeirão do Sul	58	Burgues				■		■	■		■		
	59	Ag. do Cascavel					■*		■*		■*		
	60	Sapicado							■				
	62	Rib. do Pinto		■		■*+□	■*●	■	■		■□●	■+□●	
	63	Capim					■		■				
	65	Matão		■			■		■				
	66	Ag. da Boa Vista					■						
	67	Guariroba					■						
	68	Lagoa		■									
	72	Ag. da Pirapitinga				■*			■*				
	73	Ag. Funda		■*			■*						
	74	Ag. do Barreiro					■	■	■				
	75	Ag. da Lagoa				■							
	Assis	76	Ag. do Pavão				■		■	■*	■		■*
77		Ag. do Matão							■		■*	■*	
78		Ag. do Pavãozinho									■		
79		Figueira							■*+		■*		
80		Cabiuna				■*			■+		■*+□	■+	
81		Ag. do Jacu			■*	■*				■*	■*	■*	
82		Freire					■*	■	■+		■*+	■*+□	
83		Fortuninha	■*					■	■	■*			
84		Ag. da Porca							■*		■*	■*	
85		Ag. do Óleo				■*		■	■*	■*+	■*	■*+	
86		Fortuna				■	■		■				
87		Fortuninha2					■*					■*	
88		Paulista					■*		■			■*	
89		Baixadão		■*+			■*		■+	■+	■+		
90		Cabral										■	
91		Lagarto Verde					■						
92		Serraria							■				
93		Cateto							■				
95		Ag. do Cervo				■*	■+		■+		■+	■*	
99		Ag. do Café					■					■	
100	Ag. do Campestre				■								
102	Ag. da Anta								■*				
104	Faz. Bom Retiro								■				
111	Ag. Bonita							■					
112	Ag. do Capão Bonito				■*						■*		
114	Ag. Mombuquinha				■					■			

Obs: Coleções hídricas negativas: 17-Coronel Miguel, 26-Marcondinha, 29-Ag. do Paiol, 50-Barreirão, 61-Lago/Meio, 64-Ag. Azul, 69-Figueirinha, 70-Fundo, 71-Palmitalzinho, 94-Ag. da Tempestade, 96-Ag. da Mata, 97-Ag. da Pinga, 98-Ag. da Divisa, 101-Ag. Cedro, 103-Ag. Tanquinho, 105-Ag. Cruz, 106-Ag. Baixada, 107-Rib. São Bartolomeu, 108-Tijuco, 109-Alambrado, 110-Lemprado, 113-Ag. Mombuca.

6.2.5.3 Mapeamento e distribuição dos grupos taxonômicos identificados

As espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* colonizam 76 dos 114 corpos de água doce investigados, sendo as espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila* mais frequentes na região entre os rios Pardo e Paranapanema. *B. glabrata* está concentrada em cinco das 114 coleções hídricas (Figura 5). *B. straminea*, *B. occidentalis* e *B. peregrina* estão distribuídas de forma uniforme na área de estudo (Figura 5-6, Tabela 3).

Drepanotrema spp., *Melanoides* spp., *Lymnaea* spp., *Physa* spp. e *Pomacea* spp. foram encontrados em 68 das 114 coleções hídricas (Figuras 7, Tabela 3). Em 39 destas coleções hídricas, espécies destes gêneros foram encontrados em simpatria com *Biomphalaria* spp. Contudo, apenas em dez destas 39 coleções hídricas, foram encontradas espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias em simpatria com caramujos dos outros gêneros descritos. (Tabela 3).

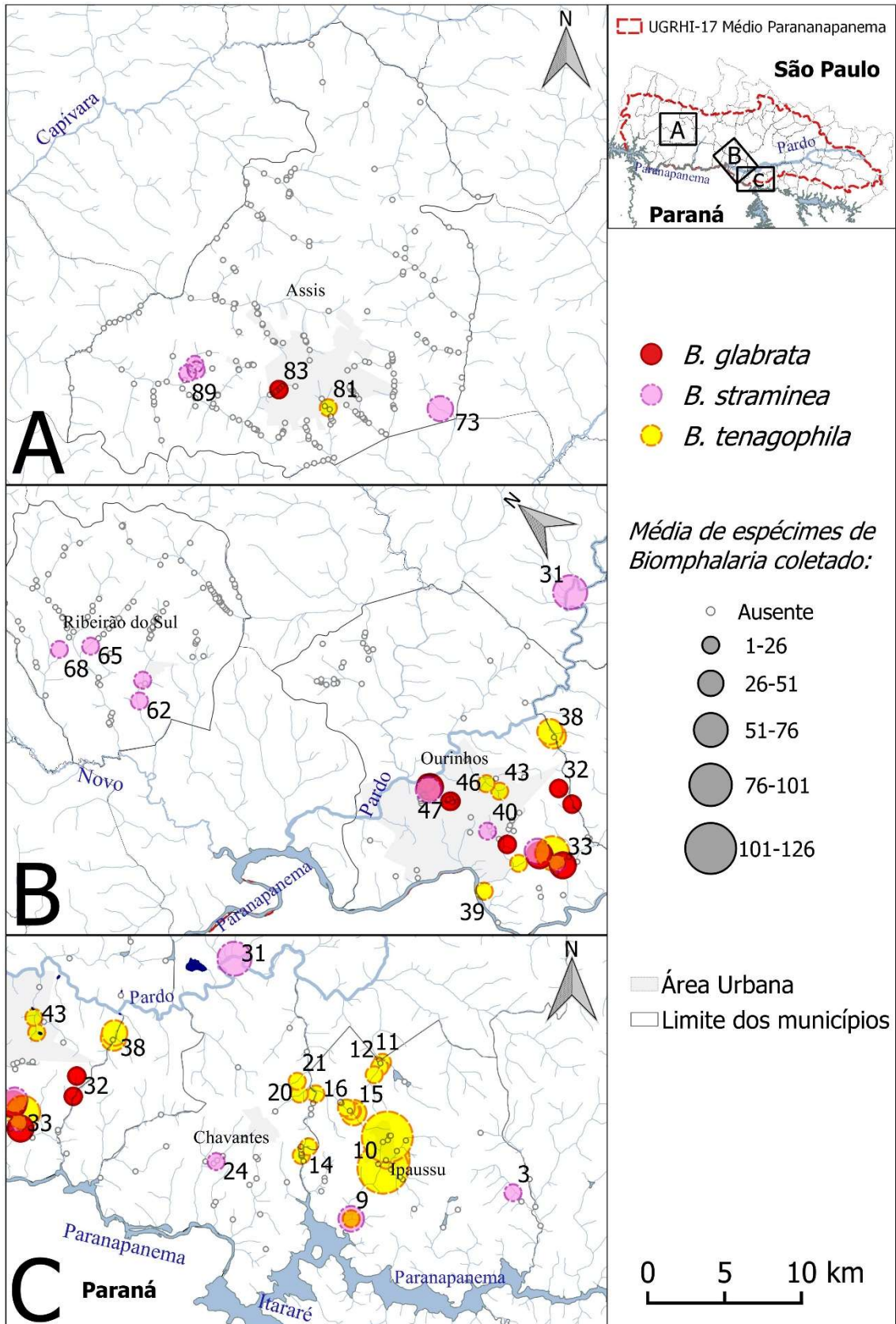


Figura 5 - Distribuição das três espécies hospedeiras intermediárias de esquistossomose do gênero *Biomphalaria*, com a média dos caramujos coletados por ponto, no período de 2015-2018 coletados em Assis (A), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (B), em Chavantes e Ipaussu (C), no estado de São Paulo, Brasil, coletadas em 54 pontos em 27 coleções hídricas. * Números corresponde às coleções hídricas coletadas (Tabela 3).

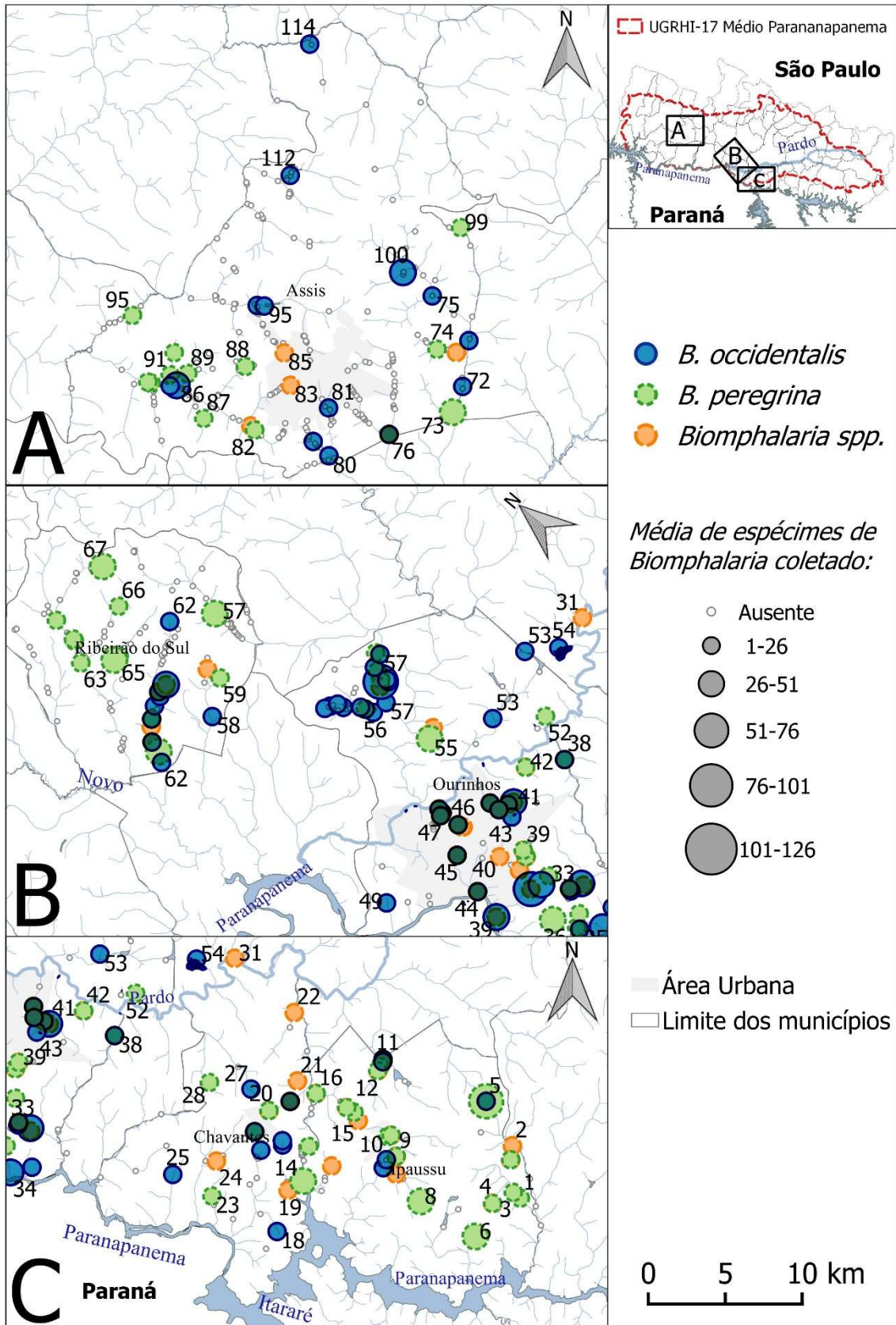


Figura 6 - Distribuição das espécies de *B. occidentalis* e *B. peregrina* com a média dos caramujos coletados por ponto, no período de 2015-2018 coletados em Assis (A), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (B), em Chavantes e Ipaussu (C), no estado de São Paulo, Brasil, coletadas em 135 pontos em 68 coleções hídricas. * Números corresponde às coleções hídricas coletadas (Tabela 3).

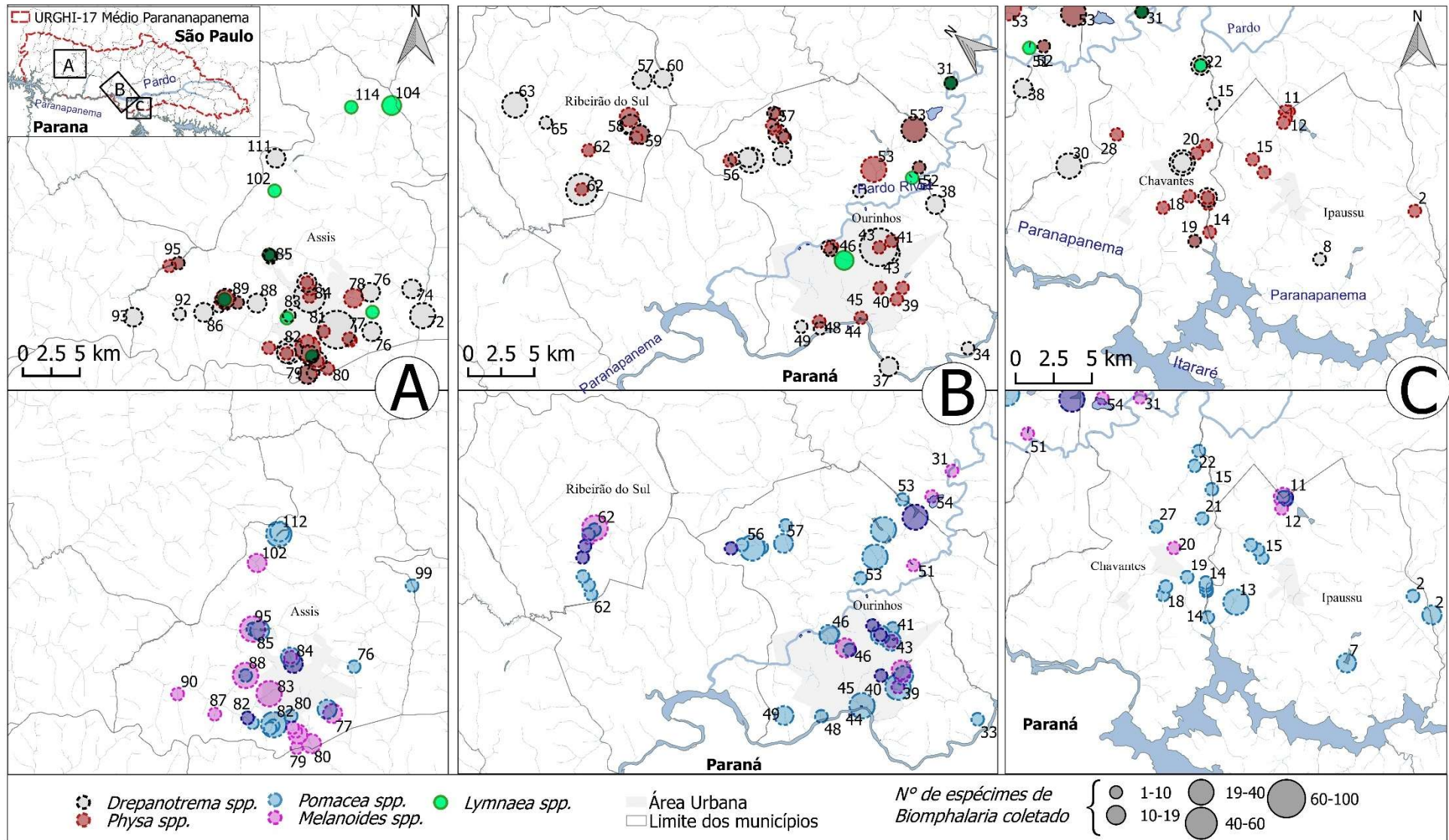


Figura 7 - Distribuição do número de caramujos coletados por ponto no período de 2015-2018, em Assis (A), em Ribeirão do Sul e Ourinhos (B), em Chavantes e Ipaussu (C) no estado de São Paulo, Brasil, dos gêneros *Drepanotrema* (67 pontos em 42 coleções hídricas) e *Lymnaea* (13 pontos em 12 coleções hídricas) e *Physa* (61 pontos em 35 coleções hídricas), *Melanoides* (42 pontos em 25 coleções hídricas) e *Pomacea* (75 pontos em 35 coleções hídricas). * Números corresponde às coleções hídricas coletadas (Tabela 3).

6.2.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A diversidade taxonômica de espécies do gênero *Biomphalaria*, analisada por métodos morfológicos e DNA *Barcode*, é consistente com os levantamentos feitos na região do médio rio Paranapanema (Piza et al. 1972, Teles & Vaz 1987).

No geral, todas as sequências COI obtidas foram altamente similares às sequências de espécies nominais depositadas no GenBank. O menor valor de similaridade com as sequências do Genbank foi observado em *B. peregrina*. Esta espécie inclui um grupo de sequências com 8% de distância genética, sendo este o maior valor de distância intraespecífica obtida até hoje em espécies do gênero *Biomphalaria* (Spatz et al. 2000, Vidigal et al. 2000, Collado et al. 2011, Collado & Mendez 2012, Tuan & Santos 2007, Standley et al. 2011, Rumi et al. 2017). Uma hipótese é que o táxon *B. peregrina* inclua espécies crípticas. Para testar essa hipótese é preciso realizar análise morfológica minuciosa de exemplares de uma ampla área geográfica, associando marcadores moleculares nucleares.

Na comparação entre o método baseado em distância (ABGD) e árvores (bPTP e GMYC), o desempenho do ABGD foi o que mais se aproximou da delimitação feita por caracteres morfológicos.

As três metodologias estatísticas aplicadas (ABGD, bPTP e GMYC) para a delimitação das 177 sequências COI, mostram números de unidades taxonômicas moleculares que refletem as variações de diversidade genética intraespecífica. A elevada diversidade genética intraespecífica de *B. peregrina*, explicaria a subdivisão desta espécie em três unidades taxonômicas moleculares em bPTP e cinco em GMYC. As diferenças obtidas em relação ao número de MOTUs com os métodos bPTP e GMYC é comumente observada. A explicação mais lógica é que esses métodos refletem as diferenças de cada espécie em relação ao tamanho efetivo das populações, às taxas de mutação e aos processos de especiação (Dellicour & Flot 2017).

Conforme observado aqui neste trabalho, a ausência de variação genética em grupos de sequências de *B. occidentalis* é comumente diagnosticada nesta espécie (Tuan et al. 2012). O que foi incomum foi a ausência de diversidade genética em *B. tenagophila*, estudos anteriores mostram que altos índices de diversidade genética nesta espécie foram encontrados apenas em subpopulações em outras regiões (Palasio et al. 2018). Em *B. tenagophila*, a homogeneidade genética, observada na região de estudo, pode ser consequência da amostragem incompleta do total de variantes genéticas desta espécie. Além disso, as espécies de *Biomphalaria* estão

sujeitas a ciclos de extinção local, seguida de recolonização, sofrendo uma drástica retração na variabilidade genética (Buckling et al. 2000), restando ao final de vários ciclos, uma fração da variabilidade total da espécie. Gargalos populacionais podem ter expurgado parte significativa da diversidade genética total das espécies, ou seja, a diversidade de *B. tenagophila* estaria subestimada nesta região.

B. tenagophila coloniza 14 das 114 coleções hídricas analisadas, sendo sete delas localizadas em Ipaussu. Os levantamentos anteriores apontavam a espécie em coleções hídricas também em Assis, Chavantes, Ourinhos (Vaz 1989, Teles 1989, Ohlweiler et al. 2010, SUCEN 2012). Atualmente, as coleções hídricas de Ourinhos, especificamente, os córregos Christoni, Fundo, Água da Veada, não são colonizados por *B. tenagophila*, o que pode indicar uma modificação da área de distribuição da espécie na região do Médio Paranapanema.

Foi observou-se uma modificação significativa na distribuição de *B. glabrata* em relação aos levantamentos realizados em períodos distintos e em pontos específicos na região do Médio Paranapanema. Embora *B. glabrata* tenha sido descrita em levantamentos anteriores nas coleções hídricas de Água de Jacu, em Assis, e Furninhas, em Ourinhos (Perez & Santos 1966, Perez et al. 1968, Ramos & Piza 1971, Sucen 1980, Teles 1988, Tuan, 2009), neste estudo atual observou-se sua substituição por *B. tenagophila*. E nas coleções hídricas nos municípios de Ipaussu, Chavantes e Ribeirão do Sul (Piza & Ramos 1960, Teles & Vaz 1987), não foram aqui identificados espécimes de *B. glabrata* em quaisquer coleções hídricas desses três últimos municípios.

Contudo, algumas comparações entre a fauna atual e a identificada em trabalhos anteriores, são difíceis de serem feitas, devido à insuficiência de informações exatas anteriores sobre as coleções hídricas e os locais onde foram coletados os animais.

Neste estudo foi confirmada a existência de cinco locais críticos de *B. glabrata*, por meio de técnica georreferenciamento, sendo um em Assis (Fortuninha) e quatro em Ourinhos (Sobra, Lageadinho, Jacu e Christoni) (Perez & Santos 1966, Perez et al. 1968, Ramos & Piza 1971, SUCEN 1980, Teles 1988). Possibilita a adoção de medidas que priorizem a profilaxia destas coleções hídricas e incentivem ações educativas que limitem o acesso humano aos locais identificados. Além disso, permitirá comparações das espécies em levantamentos malacológicos futuros.

Relatos anteriores mostram a colonização de *B. straminea* em poucas coleções hídricas, restritas aos municípios de Ourinhos (Água da Sobra) e Ribeirão do Sul (Capim) (TELES 1988, 1996, 2005). O estudo atual mostra a expansão da área geográfica ocupada por *B. straminea*

para coleções hídricas de Assis, Chavantes e Ipaussu, o que se constituiu uma informação inédita. *B. straminea* é uma espécie com alto potencial de colonização de novos ambientes, distantes da região Neotropical, como mostram os dados de colonização desta espécie na Ásia (Woodruff et al. 1985).

Em relação aos outros moluscos límnicos, *Drepanotrema* spp. foi a mais comumente encontrada, seguida por *Physa* spp. e *Pomacea* spp., *Melanooides* spp. Estes são caramujos comuns na fauna de moluscos bentônicos de águas continentais do Sudeste Brasileiro (Paraense 1975, Vaz 1989, Thiengo et al. 2006, Ohlweiler et al. 2010, Medeiros et al. 2014, Fernandez et al. 2018). São frequentemente associados a ambientes poluídos, devido seu alto grau de resiliência (Moreno & Callisto 2006), sendo razoável encontrá-los na UGRHI-17 do Médio Paranapanema, que contém áreas antrópicas. Representantes destas espécies de planorbídeos são facilmente encontradas em simpatria com *Biomphalaria* (Piza et al. 1972; Teles & Vaz 1987; Teles 1988, 2005, Tuan 2009). Por este motivo, *Pomacea* spp. e *Melanooides* spp. foram utilizadas em tentativas de controle biológico de caramujos do gênero *Biomphalaria*, relacionadas com a esquistossomose (Guimarães et al. 2001, Fernandez et al. 2001, Thiengo et al. 2005, Ministério da Saúde 2008). No presente estudo observamos que estas espécies vetoras e não-vetoras habitam os mesmos corpos de água doce sem evidências de predominância de uma ou outra espécie.

Além disso, destaca-se o encontro de *Lymnaea columela* no município de Assis, uma das três espécies do gênero *Lymnaea*, no qual se desenvolve o parasita *Fasciola hepática*, causador da fasciolose no Brasil (Barbosa 1995, Maure et al. 1998, Ministério da Saúde 2008).

O método de coleta aqui utilizado, ao subdividir a extensão total de drenagem das 114 coleções hídricas em vários pontos amostrais, permitiu a análise qualitativa abrangente das espécies de caramujos de água doce na bacia hidrográfica do Médio Paranapanema. Além disso, o uso de ferramentas geoespaciais permitiu o mapeamento das coleções hídricas de forma única e altamente resolutive.

A região apresenta os hospedeiros intermediários *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Rey 1952), contudo predominam na área *B. occidentalis* e *B. peregrina*, espécies refratárias ao *S. mansoni* em condições naturais. Essas duas espécies foram identificadas em 62 coleções hídricas, sem referência anterior na literatura.

O DNA *Barcode* pode substituir o método de identificação tradicional? A validação do DNA *Barcode* como técnica de identificação malacológica de rotina, exigiria comparar resultados obtidos com a mesma técnica e metodologia por laboratórios independentes. Os

resultados obtidos com a amostragem do médio rio Paranapanema indicam que é necessário aumentar a base de dados de sequências COI-Folmer de *Biomphalaria* no GeneBank, representando espécimes coletados em áreas geográficas, abrangendo toda a distribuição de cada espécie. Os números de sequências COI-Folmer de *B. peregrina* somam apenas 14 unidades, sendo a maioria de exemplares coletadas no estado de São Paulo. Sequências de espécies como *B. orbigny*, *B. kuhniana*, *B. oligoza* e *B. schrammi* inexistem no Genbank.

O uso da metodologia molecular na rotina malacológica deveria ser feita de forma concomitante ao método tradicional de identificação morfológica de caramujos adultos, como subsídio a uma compreensão mais abrangente de cada espécie. A aplicação do DNA *Barcode* é promissora em espécimes jovens e adultos com resultados de identificação morfológica imprecisa, podendo dessa forma contribuir para o aperfeiçoamento dos levantamentos malacológicos.

Agradecimentos: À Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) por fornecer apoio financeiro atividades de campo e laboratoriais relacionadas ao projeto de pesquisa “Diversidade Molecular e Padrão de distribuição de *Biomphalaria* spp. e sua relação com a esquistossomose no médio rio Paranapanema, São Paulo, Brasil e CAPES pela bolsa de estudos para R.G.S. Palasio. Ao pessoal da SUCEN em Ourinhos, especialmente para Edvaldo Nunes pela assistência no trabalho de campo, e Monica Ammon Fernandez (FIOCRUZ) para a identificação de algumas espécies não-*Biomphalaria*.

6.2.7- REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A., RESENDES, A.P., COSTA, M.J., ALARTA, J.E.S., ILONA, M.B., NASCIMENTO, R.S. & ROGERIO, S. 2003. Analysis of spatial distribution of mortality from mansonic schistosomiasis in municipalities of Pernambuco State in the period 1997 - 2000. Abstracts of the 9th International Symposium on Schistosomiasis, Salvador, Brazil, 55.
- ANISIMOVA, M., GIL, M., DUFAYARD, J.F., DESSIMOZ, C. & GASCUEL, O. 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Syst. Biol.* 60(5): 685-699.
- BARBOZA, D.M., ZHANG, C., SANTOS, N.C., SILVA, M.M.B.L., ROLLEMBERG, C.V.V., DE AMORIM, F.J.R., UETA, M.T., MELO, C.M., ALMEIDA, J.A.P., JERALDO, V.L.S. & JESUS, A.R. 2012. *Biomphalaria* species distribution and its effect on human *Schistosoma mansoni* infection in an irrigated area used for rice cultivation in northeast Brazil. *Geospat Health.* 6(3): 103-109.
- BAVIA, M.E., HALE, L.F., MALONE, J.B., BRAUD, D.H. & SHANE, S.M. 1999. Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(4): 566-572.
- BEZERRA, F.S. DE M., PINHEIRO, M.C.C., SILVA FILHO, J.D. DA, CASTRO, I.M.N.A DE, CALDEIRA, R.L., SOUSA, M.A.S., CAVALCANTE, A.B. & RAMOS JÚNIOR, A.N. 2018. Identification of *Biomphalaria* sp. and other freshwater snails in the large-scale water transposition project in the Northeast of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 60(41). Epub August 20, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860041>
- BUCKLING, A., KASSEN, R.; BELL, G. & RAINEY, P.B. 2000. Disturbance diversity in experimental microcosms. *Nature.* 408(6815): 961-964.
- CAMPBELL, G., JONES, C.S., LOCKYER, A.E., HUGHES, S., BROWN, D., NOBLE, L.R., & ROLLINSON, D. 2000. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 267(1460): 2351.
- CARDIM, L.L., FERRAUDO, A.S., PACHECO, S.T.A., REIS, R.B., SILVA, M.M.N., CARNEIRO, D.D.M.T. & BAVIA, M.E. 2011. Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* p.899-908.
- CARVALHO, O.S, AMARAL, R.S., DUTRA, L.V., SCHOLTE, R.G.C. & GUERRA, M.A.M. 2008. 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.
- CBH-MP. 2018a. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2018 (Ano Base: 2017) – UGRHI-17. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorios/>
- CBH-MP. 2018b. Plano de bacia da unidade de gerenciamento de recursos hídricos do Médio Paranapanema UGRHI – 17, Relatório n. 986/17 – RES-02 – Oficinas de definição das prioridades para gestão dos recursos hídricos na UGRHI 17 – Etapa Prognóstico. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema.
- CBN-MP. 2018c. CBHs de Rios Afluentes. São Paulo: Comitê da Bacia Hidrográfica, Rio Paranapanema. <http://paranapanema.org/ugrh/comites//sp/cbhmp/caracterizacao/> (último acesso em 2018)
- COLLADO, G.A., & MENDEZ, M.A. 2012. Phylogenetic relationships and taxonomy of Altiplano populations of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae): inference from a multilocus approach. *Zool. J. Linn. Soc.* 165(4): 795-808.
- COLLADO, G.A., VILA, I. & MÉNDEZ, M.A. 2011. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. *Zool. Scr.* 40(6): 613-622.

- CVE. 2011. a. Esquistossomose [Dados estatísticos 1981 - 2009 - definitivo]. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo. <http://www.cve.saude.sp.gov.br> (último acesso em 2018).
- CVE. 2011. b. Esquistossomose [Dados estatísticos,2008-2010]. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo.<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/esquistodados.html> (último acesso em 2018).
- DEJONG, R.J., MORGAN, J.A.T., WILSON, W.D., AL-JASER, M.H., APPLETON, C.C., COULIBALYG. & MAGALHÃES, L.A. 2003. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. *Mol. Ecol.* 12(11): 3041-3056.
- DELLICOUR, S. & FLOT, J.F. 2017. The hitchhiker's guide to single-locus species delimitation. *Mol. Ecol. Resour.* 18(6): 1-13.
- DESLANDES N. 1959. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. *Rev. Serv. Espec. Saúde Pública.* 4(2): 371-382.
- FERNANDEZ, M.A., THIENGO, S.C. & SIMONE L. 2003. Distribution of the introduced freshwater snail *Melanoides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. October 2003. *Nautilus.* 117(3): 78-82.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.
- FONSECA, F., FREITAS, C., DUTRA, L., GUIMARÃES, R. & CARVALHO, O.S. 2014. Spatial modeling of the Schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. *Acta Trop.* 133: 56-63.
- FREY, M.A. & VERMEIJ, G.J. 2008. Molecular phylogenies and historical biogeography of acircumtropical group of gastropods (Genus: Nerita): implications for regional diversity patterns in the marine tropics. *Mol Phylogenet Evol.* 48(3): 1067-86. doi: 10.1016/j.ympev.2008.05.009. Epub 2008.
- FUJISAWA, T. & BARRACLOUGH, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst. Biol.* 62(5): 707-724.
- GOMES, E., LEAL-NETO, O.B., ALBUQUERQUE, J., DA SILVA, H. & BARBOSA, C.S. 2012. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco-Brazil. *Int. J. Health Geogr.* 11(1): 1.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52(5): 696-704.
- GUIMARÃES, R.J.P.S., FONSECA, F.R., DUTRA, L.V., FREITAS, C.C., OLIVEIRA, G.C. & CARVALHO, O.S. 2012. A Study of Schistosomiasis Prevalence and Risk of Snail Presence Spatial Distributions Using Geo-Statistical Tools, Schistosomiasis, Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN:978-953-307-852-6, InTech.
- GUIMARÃES, R.J.P.S., FREITAS, C.C., DUTRA, L.V., FELGUEIRAS, C.A., MOURA A.C.M., AMARAL, R.S., DRUMMOND, S.C., SCHOLTE, R.G.C., OLIVEIRA, G. & CARVALHO, O.S. 2009. Spatial distribution of *Biomphalaria* mollusks at Sao Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil, using geostatistical procedures. *Acta Trop.* 109: 181-186.
- GUIMARÃES, R.J.P.S., FREITAS, C.C., DUTRA, L.V., SCHOLTE, R.G.C., MARTINS-BEDÉ, F.T., FONSECA, F.R., AMARAL, R.S., DRUMMOND, S.C., FELGUEIRAS, C.A., OLIVEIRA, G.C.O. & CARVALHO, O.S. 2010. A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105(4): 524-531.
- GUIMARÃES, C.T., SOUZA, C.P.D. & SOARES, D.D.M. 2001. Possible competitive displacement of planorbids by *Melanoides tuberculata* in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 173-176.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41: 95-98.
- HERBERT, P.D., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. J. Biol. Sci.* 270(1512): 313-21.

- IBGE. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>, 2010a.
- IBGE. Setor Censitário 2010. Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>, 2010b.
- IBGE. Base Contínua 250 mil, Hidrografia. Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>, 2010c.
- KATOH, K., ROZEWICKI, J. & YAMADA, K.D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 1-7.
- KEANE, T.M., CREEVEY, C.J., PENTONY, M.M., NAUGHTON, T.J. & MCLNERNEY, J.O. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol.* 6:29.
- KIMURA M.A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16(2): 111-120.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C. & TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- LANGAND, J., THÉRON, A., POINTIER, J.P., DELAY, B. & JOURDANE, J. 1999. Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe Island, using RAPD markers. *J. Molluscan Stud.* 65(4): 425-433.
- LATINI, A.O., RESENDE, D.C., POMBO, V.B. & CORADIN, L. 2016. Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: MMA. 791p. (Série Biodiversidade, 39).
- LUZ, E., MARTINS, S., CARVALHO, A. & CASRO, N. 1998. Atualização da sistemática e distribuição geográfica dos Planorbídeos do Estado do Paraná. *Acta Biol Paranaense, Curitiba-PR.*
- MALTCHIK, L., STENERT, C., KOTZIAN, C.B. & PEREIRA, D. 2010. Responses of freshwater molluscs to environmental factors in Southern Brazil wetlands. *Braz. J. Biol.* 70(3): 473-482.
- MAURE, E.A.P., BUSTAMANTE, M., SERRA-FREIRE, N.M. & GOMES, D.C. 1998. Dinâmica de *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 35(4): 151-155.
- MEDEIROS, C., SCHOLTE, R.G.C., D'ÁVILA, S., CALDEIRA, R.L. & CARVALHO, O. DOS S. 2014. Distribuição espacial de *Lymnaeidae* (Mollusca, Basommatophora), hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 56(3): 235-252. <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000300010>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde. 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.
- MORENO, P. & CALLISTO, M. 2006. *Hydrobiologia.* 560: 311. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0869-y>
- OHLWEILER, F.P., TAKAHASHI, F.Y., GUIMARÃES, M.C.A., GOMES, S.R. & KAWANO, T. 2010. Manual de gastrópodes límnicos e terrestres do estado de São Paulo associados às helmintoses. Porto Alegre: Redes. p.230.
- PAGE, R. D. 2001. TreeView. Glasgow University, Glasgow, UK.
- PALASIO, R.G.S., GUIMARÃES, M.C.A., OHLWEILER, F.P. & TUAN, R. 2017. Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil. *ZooKeys.* 668: 11.
- PALASIO, R.G.S., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. & TUAN, R. 2018. Genetic diversity of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Hygrophila: Planorbidae) across two coastal areas of southeast Brazil. *Folia Malacol.* 26(3).
- PARAENSE, W.L. 1966. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in Neotropical Region. *Rev. Bras. Biol.* 26: 269-296.
- PARAENSE, W.L. 1961. Shell versus anatomy in planorbid systematics. I: *Australorbis glabratus*. *Rev. Bras. Biol.* 21(2): 163-170.
- PARAENSE, W.L. 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq. Mus. Nac.* 55:105-128.

- PARAENSE, W.L. 1981. *Biomphalaria occidentalis* sp.n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). Mem. Inst. Oswaldo Cruz online. 76(2): 199-211.
- PARAENSE, W.L. 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the neotropical region: a distributional outline. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 77(2):181-188. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761982000200008>
- PARAENSE, W.L. 1984. *Biomphalaria tenagophila* guaibensis ssp. n. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79(4): 465-469.
- PARAENSE, W.L. 2001. The schistosome vectors in the Americas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96, suppl.: 7-16.
- PEREIRA, L.S., NEVES, R.A.F., MIYAHIRA, I.C., KOZLOWSKY-SUZUKI, B., BRANCO, C.W.C., PAULA, J.C. & SANTOS, L.N. 2018. Non-native species in reservoirs: how are we doing in Brazil? Hydrobiologia. 817: 71. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3446-2>
- PEREZ, M.D. & SANTOS, M.R. 1966. Contribuições ao levantamento da carta planorbídica do Estado de São Paulo: pesquisa de focos com formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*. I: Área da bacia dos córregos Matão e Jacu, tributário do Rio Pari (Vale do Paranapanema). Revista Paulista de Medicina. 68(8):348.
- PEREZ, M.D., SANTOS, M.R. & ISHIHATA, J.K. 1968. Contribution to the survey of the Planorbids map in the State of São Paulo; investigation of centers of *Schistosoma mansoni* infection in its evolutionary form. III. Hydrographic área of Assis-Cândido Mota (Paranapanema Valley). Hospital, Rio de Janeiro. 74:495-507.
- PERON, A.F. & PIROLI, E.L. 2011. Projeto APPs: Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo, CEDIAP-GEO. Centro de Estudo e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento 1th ed. 23 p.
- PHILLIPS, S.J., ANDERSON, R.P. & SCHAPIRED, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecol. Modell. 190: 231–259.
- PIZA, J.D.T. & RAMOS, A.D.S. 1960. Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo. Arq. Hig. 25(86): 261-271.
- PIZA, J.D.T., RAMOS, A.D.S., MORAES, L.D.C., CORRÊA, R.D.R., TAKAKU, L. & PINTO, A.D.M. 1972. Carta planorbídica do Estado de São Paulo. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Campanha de Combate à Esquistossomose, CACESq, sd.
- PUIILLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S. & ACHAZ, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. Mol. Biol. 21(8): 1864-1877.
- QGIS Development Team (2018) QGIS Version 2.18.22. Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://www.qgis.org/>.
- RUMI, A., VOGLER, R.E. & BELTRAMINO, A.A. 2017. The South-American distribution and southernmost record of *Biomphalaria peregrina* potential intermediate host of schistosomiasis. Peer J, 5: 3401.
- SAFRE, A.L. & MANZIONE, R.L. 2015. Estimativa da precipitação na bacia do Rio Pardo no verão 2013/14 e seus efeitos nos municípios da UGRHI – 17. Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, João Pessoa-PB, Brasil, 25 a 29 de abril de 2015, INPE.
- SALKELD, D.J., PADGETT, K.A., JONES, J.H. & ANTOLIN, M.F. 2015. Public health perspective on patterns of biodiversity and zoonotic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112: E6261.
- SANTOS, A.D.D., LIMA, A.C.R., SANTOS, M.B., ALVES, J.A.B., GÓES, M.A.D.O., NUNES, M.A.P. & ARAÚJO, K.C.G.M.D. 2016. Spatial analysis for the identification of risk areas for schistosomiasis mansoni in the State of Sergipe, Brazil, 2005-2014. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 49(5): 608-615.
- SCHOLTE, R.G.C., CARVALHO, O.S., MALONE, J.B., UTZINGER, J. & VOUNATSOU, P. 2012. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* in Brazil. Geospat. Health 6. S95–S101.
- SHIMODAIRA, H. & HASEGAWA, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. Mol. Biol. Evol. 16(8): 1114-1114.

- SIMOONGA, C., KAZEMBE, L.N., KRISTENSEN, T.K., OLSEN, A., APPLETON, C.C., MUBITA, P. & MUBILA, L. 2008. 'The epidemiology and small-scale spatial heterogeneity of urinary schistosomiasis in Lusaka province, Zambia'. *Geospat. Health*. 1(3): 57-67.
- SMA. 2013. Rede de drenagem do estado de São Paulo obtida a partir da basedogisat (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2013. <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/mapa-da-rede-dedrenagem-do-estado-de-sao-paulo/>
- SPATZ, L., VIDIGAL, T.H., SILVA, M.C., GONZALEZ CAPPA, S.M. & CARVALHO, O.S. 2000. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 95(6): 807-814.
- STANDLEY, C.J., POINTIER, J.P., ISSIA, L., WISNIVESKY-COLLI, C. & STOTHARD, J.R. 2011. Identification and characterization of *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835) from Agua Escondida in northern Patagonia, Argentina. *J. Nat. Hist.* 45(5-6): 347-356.
- SUCEN. 1980. Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 1979-1980, do serviço Regional 11 - Marília. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias.
- SUCEN. 2012. Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 2009-2012, do serviço Regional 11 - Marília. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias.
- TELES, H.M.S. 1988. Ecological aspects of *Biomphalaria* Preston, 1910 in the State of Sao Paulo, Brazil. *I. Syntopia. Cienc. Cult.* 40(4): 374-379.
- TELES, H.M.S., VAZ, JF, GLASSER, CM, CIARAVOLO, RMC. Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo: 2ª Região Administrativa. *Ciênc. cult.* (São Paulo), 40(11), 1112-7. 1988
- TELES, H.M.S. 1989. Distribution of *Biomphalaria tenagophila* and *B. occidentalis* in S. Paulo State, Brazil. *Rev. de Saúde Pública*. 23(3): 244-253.
- TELES, H.M.S. 1996. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 30(4): 341-349.
- TELES, H.M.S. 2005. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(5): 426-32.
- TELES, H.M.S. & VAZ, J.F. 1987. Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 21(6): 508-512.
- TEODORO, T.M., JANOTTI-PASSOS, L.K., CARVALHO, O.S. & CALDEIRA, R.L. 2010. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57(1): 144-151.
- THIENGO, S.C., BARBOSA, A.F., COELHO, P.M. & FERNANDEZ, M.A. 2005. Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. In: Simpósio brasileiro sobre espécies exóticas invasoras, I, Brasília, Anais. Brasília: SBEEI.
- TUAN, R. & SANTOS, P. 2007. 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.* 30(1): 139-144.
- TUAN, R. 2009. Diversidade e distribuição de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop.* 9(1). <http://www.biotaneotropica.org.br/v9n1/pt/fullpaper?bn03009012009+pt>.
- TUAN, R., OHWEILLER, F., PALASIO, R.G.S., ZANNA, R. & GUIMARÃES, M.C.A. 2012. Chapter 15: Pattern of genetic divergence of mitochondrial DNA sequences in *Biomphalaria tenagophila* complex species under barcoding perspective. Book title: Schistosomiasis. Tehran, Iran, Intech.
- VAZ, JF, TELES, HMS, TAKAKU, L. Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo; 7ª região Administrativa. *Ciênc. cult.* (São Paulo), 37(12), 2057-2062. 1985.
- VAZ, J.F. 1989. Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda-Pulmonata). *Ciênc. cult.* (São Paulo). 41(1): 14-27.

- VAZ, J.F., ELMOR, M.R.D. & GONCALVES, L.M.C. 1992. Levantamento planorbídico do estado de São Paulo. 8a região administrativa (grande área de São José do Rio Preto). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 34(6): 527-534.
- VAZ, J.F., ELMÔR, M.R.D., GONÇALVES, L.M.C. & ISHIHATA, G.K. 1983. Resultados do levantamento planorbídico da área de presidente prudente—Estado de São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 25(3): 120-126.
- VAZ, J.F., MANTEGAZZA, E., TELES, H.M.S., MORAIS, L.V.C. & VAZ, J. 1987. Levantamento planorbídico do estado de São Paulo (Brasil): 4a região administrativa. Rev. Saúde Pública. 21(5): 371-379.
- VAZ, J.F., TELES, H.M., LEITE, S.P., CORRÊA, M.A., FABBRO, A.L.D. & ROSA, W.S. 1986. Levantamento planorbídico do estado de São Paulo: sexta região administrativa. Rev. Saúde Pública. 20: 358-61.
- VAZ, J.F., ELMOR, M.R.D., GONCALVES, L.M.C. & ISHIHATA, J. 1983. Resultados do levantamento planorbídico da área de presidente prudente do estado de São Paulo. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 25(3): 120-6.
- VIDIGAL, T.H.D.A., KISSINGER, J.C., CALDEIRA, R.L., PIRES, E.C., MONTEIRO, E., SIMPSON, A.J. & CARVALHO O.S. 2000. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. Parasitology. 121:611-620.
- VIDIGAL, T.H.D.A., COSCARELLI, D. & MONTRESOR, L.C. 2013. Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives. Lundiana. 11(1/2): 47-63.
- WETHINGTON, A.R., ZAVODNA, M., SMITH, M.K., OLIVEIRA, G., LEWIS, F. & MINCHELLA, D.J. 2007. Population genetic structure of *Biomphalaria glabrata* in a schistosomiasis-endemic region in Brazil. J. Molluscan Stud. 73(1): 45-52.
- ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P. & STAMATAKIS, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics. 29(22): 2869–2876.
- WOODRUFF, D.S., MULVEY, M. & YIPP, M.W. 1985. Population genetics of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong: a neotropical schistosome-transmitting snail recently introduced into China. J. Hered. 76(5): 355-360.

6.3 MANUSCRITO 3: Modelagem espacial da distribuição de *Biomphalaria* Preston, 1910, caramujos de água doce, na região Média do Paranapanema (São Paulo, Brasil). Não publicado.

Raquel Gardini Sanches Palasio^{1,2}, Roseli Tuan¹, Beatriz Uliano Guimaraes¹, Andrea Vieira De Souza¹, Francisco Chiaravalloti-Neto².

¹Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Luz, SP, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP), Pinheiros, SP, Brasil. E-mail: raquelpalasio@usp.br

6.3.1- RESUMO

No rio Paranapanema no estado de São Paulo, Brasil, inclui uma infinidade de ecossistemas, que sustentam uma fauna diversa de caramujos de água doce. O objetivo do estudo é avaliar a distribuição contemporânea e prever a distribuição futura das espécies de *Biomphalaria*, em uma escala espacial relevante na bacia hidrográfica do Médio Paranapanema. A modelagem abrangeu 55 municípios do Médio Paranapanema, utilizando o algoritmo de máxima entropia, no programa MaxEnt. Foram utilizadas as coordenadas geográficas das espécies de *Biomphalaria* coletadas em 2015-2018 e os dados de variáveis climáticas e topográfico obtidas no WorldClim, HydroSHEDS e TOPODATA. Para as predições futuras foi utilizado o modelo climático regional HadGEM2-ES do período de 2041-2060, considerando dois cenários de mudança climática possíveis: RCP 2.6 (menor aumento nas emissões de gases de efeito estufa) e RCP 8.5 (maior aumento). A abundância relativa das espécies de *Biomphalaria* foi: *B. occidentalis* (24.1%), *B. peregrina* (19.1%), *B. tenagophila* (17.5%), *B. glabrata* (5.8%), *B. straminea* (4.7%) e *Biomphalaria* spp. (28.9%). A riqueza e a dominância das espécies de *Biomphalaria* apresentaram relação com o tamanho da coleção hídrica e tipo de habitats. O modelo de máxima entropia mostrou que há probabilidade futura da espécie *B. glabrata* permanecer nos municípios de Ourinhos e Assis e uma probabilidade em torno de 50% da espécie expandir para outros municípios da região de estudo em função das mudanças climáticas. Assis e Ourinhos são locais historicamente marcados por casos de esquistossomose no passado. Os resultados para *B. straminea* mostram que esta espécie tem maior probabilidade de expansão de colonização no futuro, especialmente nos municípios próximos a Ourinhos. *B. occidentalis*, *B. peregrina* e *B. tenagophila* tendem a manter no futuro a colonização nos mesmos locais atuais, além disso, *B. tenagophila* poderá futuramente expandir sua distribuição em áreas em torno do município de Iepê. A identificação dos prováveis pontos dos hospedeiros intermediários da esquistossomose pode permitir direcionar medidas de saúde pública para evitar ou reduzir transmissões futuras nesta região.

Palavras-chave: *Biomphalaria*, biodiversidade, distribuição, MaxEnt, mudança climática.

Palasio, R. G. S, Guimaraes, B. U., Souza, A. V., Tuan, R & Chiaravalloti-Neto, F. **Modelling the spatial distribution of *Biomphalaria* (Preston, 1910) freshwater snails in the Middle Paranapanema region (São Paulo, Brazil)**, unpublished.

6.3.2- ABSTRACT

In the Paranapanema river in the state of São Paulo, Brazil, it includes an infinity of ecosystems that support a diverse fauna of freshwater snails. The objective of the study is to evaluate the contemporary distribution and predict the future distribution of *Biomphalaria* species, in a relevant spatial scale in the watershed of the Middle Paranapanema. The modeling encompassed 55 municipalities of the Middle Paranapanema, analyzed through the maximum entropy algorithm, considering the geographic coordinates of the *Biomphalaria* species collected in 2015-2018 and the climatic and topographic data obtained in WorldClim, HydroSHEDS and TOPODATA. For future predictions we used the HadGEM2-ES climate model for the period 2041-2060, considering two possible scenarios of climate change: Representative Concentration Pathways - RCP 2.6 (lower increase in greenhouse gas emissions) and RCP 8.5 (higher increase). The relative abundance of *Biomphalaria* species was *B. occidentalis* (24.1%), *B. peregrina* (19.1%), *B. tenagophila* (17.5%), *B. glabrata* (5.8%), *B. straminea* (4.7%) and *Biomphalaria* spp. (28.9%). The richness and dominance of *Biomphalaria* species were related to the size of the water collection and habitat type. The maximum entropy model showed that the species *B. glabrata* is a future likely to remain in the municipality of Ourinhos and Assis and a probability around 50% of species to expand to the other municipality of the study region due to the climatic changes. Assis and Ourinhos are places historically marked by cases of schistosomiasis in the past. The results showed that it is most likely that *B. straminea* expands its colonization in the future along the Middle Paranapanema watershed, especially in the municipalities near Ourinhos. *B. occidentalis*, *B. peregrina* and *B. tenagophila* seem to maintain their contemporary colonization range in the future and *B. tenagophila* was observed a probable future expansion around Iepê. Identification of the sites of intermediate hosts of schistosomiasis may allow directing public health measures to avoid or reduce future transmissions in this region.

Keys-word: *Biomphalaria*, biodiversity, distribution, MaxEnt, climate change.

6.3.3- INTRODUÇÃO

O rio Paranapanema que flui do leste do estado de São Paulo, Brasil, na direção oeste até a bacia do rio Paraná, inclui uma infinidade de ecossistemas de água doce (CHMYZ, 1967; JUNK et al., 2013; MALTCHIK et al., 2010), permite a introdução e colonização de espécies não nativas de moluscos (ROCHA et al., 2011). Ao longo do setor da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema existem ecossistemas que sustentam uma fauna diversa de moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910), (PIZA et al., 1972; KAWAZOE et al., 1980; TELES e VAZ, 1987; TELES, 1988; 2005; TUAN, 2009; MALTCHIK et al., 2010).

A malacofauna de caramujos de água doce da região do Médio Paranapanema foi descrita pela primeira vez na década de 70 (PIZA et al., 1972) por um grupo de pesquisadores que procurava criar uma base em malacologia sustentável para o controle da esquistossomose no estado de São Paulo. Os princípios fundamentais utilizados para mapear a malacofauna, aplicados por algumas pesquisas posteriores, que foram feitas no Médio Paranapanema, mantiveram-se inalterados em termos da metodologia utilizada: a vigilância de moluscos em corpos de água doce dentro de quadrantes de 100 km², resultando em cartografia convencional, com mapas delimitados pelas as fronteiras e subdivididos em unidades políticas (VAZ et al., 1997; TELES, 2005).

Dada a prioridade à eliminação de locais de transmissão de esquistossomose, por exemplo, com a canalização, que onde antigamente eram valas ao ar livre, com solo e vegetação, representando locais propícios para a sobrevivência dos caramujos, muitas vezes locais considerados focos da doença, depois da transformação em valas com fundo de cimentado, impedindo assim, a sobrevivência dos caramujos. Por isso não se sabe atualmente se as coleções de água doce identificadas com hospedeiros intermediários no passado ainda contam com sua presença. Como consequência, permanece pouco clara, até agora, a distribuição e extensão da ocorrência de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), a espécie mais eficiente para a transmissão da esquistossomose mansoni (MAGALHÃES e Dias, 1973; PARAENSE, 2001). Além *B. glabrata*, os ecossistemas de água doce ao longo da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema também são colonizados pelas espécies de *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848), *B. occidentalis* (Paraense, 1981) e *B. peregrina* (d'Orbigny, 1835) (PIZA et al., 1972; KAWAZOE et al., 1980; TELES e VAZ, 1987; TELES, 1988; 2005; TUAN, 2009), cujas distribuições também necessitam ser atualizadas.

Dentro dessa perspectiva, nossa análise foi desenvolvida para investigar os padrões de distribuição das espécies de *Biomphalaria*, com ferramentas de análise geoespacial combinadas à modelagem de nicho ecológico para mapear a distribuição contemporânea dos caramujos e prever novos cenários de distribuição e implicações nas próximas décadas. A partir da previsão de que irão ocorrer alterações climáticas globais, com aumento na precipitação nas próximas décadas (MARENGO, 2014), podendo agravar as inundações e enchentes, pode-se levantar a hipótese de que as espécies de *Biomphalaria* podem cruzar as áreas naturais de distribuição geográfica, ampliando as áreas de risco de transmissão da esquistossomose ou mesmo gerando novas áreas (GITHEKO et al., 2010).

As informações resultantes de inventários do gênero de *Biomphalaria* no Brasil têm sido comumente exibidas em mapas elaborados manualmente e obtidas a partir de conjuntos de dados limitados e não integrados. Cabe atualizar esta realidade como ferramentas de análise espacial que possibilitam a integração de uma variedade de tipos de dados do meio ambiente como as de alterações climáticas globais e com isso, por exemplo permitir verificar a expansão ou redução da distribuição de caramujos (GAZZINELLI e KLOOS 2007; STENSGAARD et al., 2013, 2019; FONSECA et al., 2018).

O modelo de máxima entropia, por exemplo, é uma destas ferramentas que permite incorporar variáveis climáticas como temperatura e pluviosidade além de dados de distribuição de *Biomphalaria* registrados na literatura, possibilitando testar hipóteses sobre a distribuição atual e futura deste gênero. Vários autores têm utilizado esta ferramenta para predição das distribuições de espécies de *Biomphalaria* nas América, China, na África (PEDERSEN et al., 2014; HABIB et al., 2016; RUMI et al., 2017; YANG et al., 2018) e no Brasil (SCHOLTE et al., 2012; BARBOSA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

Assim, foram objetivos deste estudo e avaliar a distribuição contemporânea das espécies de *Biomphalaria* com base em parâmetros ecológicos e prever sua distribuição, em uma escala espacial relevante na bacia hidrográfica do Médio Paranapanema.

6.3.4- MATERIAL E MÉTODOS

6.3.4.1 Área do estudo

A área de estudo é Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos da região do Médio Paranapanema (UGRHI-17) e está localizada na região Oeste e Sudoeste do estado de São Paulo, na fronteira com o estado do Paraná, Brasil, composta por 55 municípios (CBH-MP

2018a), com área de 16.749 km² (IBGE, 2010a; CBH-MP, 2018ab) (Figura 1ABC) e a população é de 690.692 habitantes (7.7% em áreas rurais) (IBGE, 2010a; ANA, 2016).

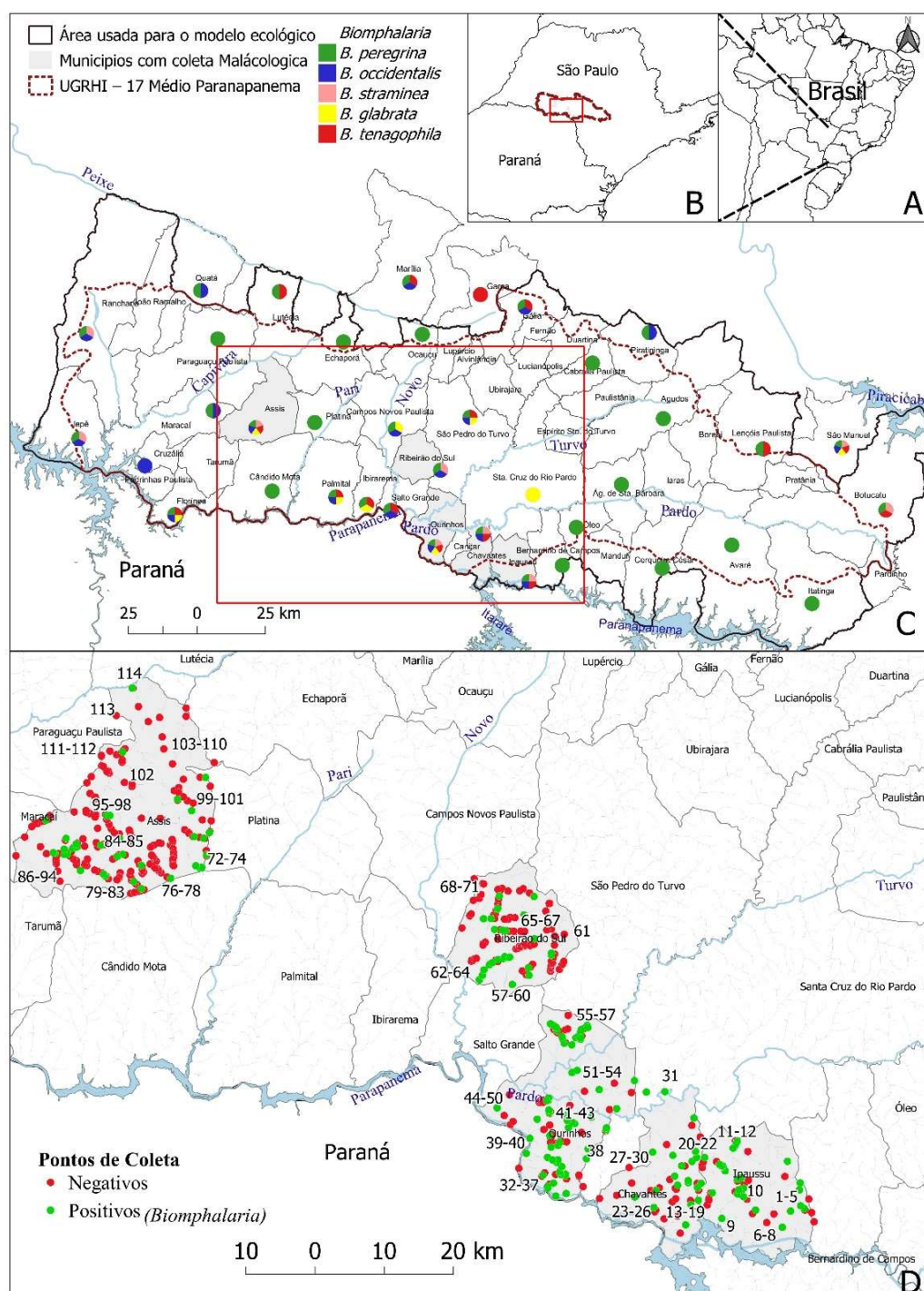


Figura 1 - Mapa do Brasil e estado de São Paulo (A); com a localização da área de estudo (B); os municípios da UGRHI – 17 do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil, presença das espécies de *Biomphalaria* segundo município, referente a levantamentos anteriores (VAZ, 1989; TELES, 1989, 2005, TUAN, 2009; OHLWEILER et al., 2010) e atualizações deste estudo, os principais rios (C); e os pontos de coletas do gênero *Biomphalaria* em 114 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis (D). * números corresponde às coleções hídricas, Anexo B IV. Fonte: IBGE, 2010abc.

Esta região possui uma paisagem bastante antropogênica, com grandes áreas de monoculturas (cana-de-açúcar, soja e café) (IBGE, 2017ab) e pequenas florestas nativas e remanescentes de cerrado próximos aos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis (PERON e PIROLI, 2011; CBH-MP, 2018abc). Esta área é banhada principalmente pelo rio Paranapanema, seguido pelo rio Pardo e pelos: rio Turvo, Novo, Capivara, Pari de menor extensão e largura (SAFRE e MANZIONE, 2015; CBH-MP, 2018a).

Para a pesquisa caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* foram selecionados, na área de estudo, os municípios de Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul, Assis e Chavantes, em função de sua importância histórica na ocorrência de esquistossomose. Nestes municípios foram coletados caramujos em 114 coleções hídricas de água doce (Figura 1D) conforme metodologia utilizado por PALASIO et al. (2019a). Para fornecer uma estimativa fidedigna da diversidade malacológica e da proporção de animais, as amostras de caramujos foram obtidas em intervalos de no mínimo 250m a no máximo de 1000m, cobrindo desta forma toda a extensão das coleções hídricas. Os espécimes foram coletados em um total de 654 pontos (Anexo B II e III) ao longo das 114 coleções hídricas, com concha de captura padronizada pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2008) em março, junho, setembro e dezembro de 2015 a 2018. Todos os pontos foram georreferenciados por meio de aparelho GPS Garmin ®Etrex, com margem de erro exato de +/- 3,6 metros (12 pés).

De cada uma das amostras com a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria* foram separados uma subamostra de até cinco exemplares para a identificação morfológica e molecular. Quando todos os caramujos do agrupamento de uma determinada amostra foram identificados como da mesma espécie, esta classificação estendeu-se para os demais exemplares desta amostra. Estes procedimentos foram realizados conforme preconizado em metodologia para pesquisa de caramujos estabelecida no Programa de Controle de Esquistossomose, que prioriza a identificação da espécie colonizadora da coleção hídrica por análise de uma pequena fração da população total de indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Quando duas espécies diferentes estavam presentes no mesmo agrupamento de determinada amostra, seus demais exemplares foram classificados como *Biomphalaria* spp.

O processo de identificação das espécies do gênero *Biomphalaria* foi por meio características morfológicas do aparelho reprodutor conforme DESLANDES (1959) e PARAENSE (1975, 1981) e uma porção da região podal entre 1-10 mm dos caramujos foi excisada da região cefalo-podal e separada para a identificação molecular.

A porção da região cefalo-podal foi submetida aos procedimentos de extração e purificação de DNA genômico em *Qiagen Blood and Tissue Kit*, conforme instruções do fabricante. O DNA genômico purificado de cada indivíduo foi submetido à amplificação do trecho do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I, utilizando os primers LCO-HCO (FOLMER, 1994), conforme protocolo do DNA *Barcode* e PCR (HERBERT et al., 2003; TUAN et al., 2012).

6.3.4.2 Teste Kruskal-Wallis e índices de diversidade de espécies

Foi feita uma análise estatística dos números de espécimes de caramujos coletados segundo as variáveis categóricas das espécies de *Biomphalaria*. Para isso, foram considerados as variáveis categóricas: dos tipos de habitats tanto com pouco ou nenhum fluxo (beira de lago, banhado e ambientes artificiais) quanto com presença de água em movimento (beira de rio, beira de córrego e nascente); e dos tipos de ambientes (Rural, periurbano e urbano) foram identificados a partir das observações feitas pelas equipes de campo. As medidas desde a nascente até a foz das coleções hídricas foram obtidas a partir dos dados da rede de drenagem do estado de São Paulo (cartas topográficas na escala 1:50.000) da Secretaria de Meio Ambiente do estado de São Paulo (SMA) em parceria com o Instituto Geológico (IG) (SMA, 2013) no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018) e depois categorizadas em uma escala cartográfica em km: <1, 1-5, 6-10, >11 km.

Para as variáveis “Tipos de ambientes” e “Extensão da coleção hídrica”, cada amostra foi obtida pela soma dos exemplares de cada coleção hídrica segundo cada espécie. Em relação ao “Tipo de habitat”, cada amostra representou a soma dos exemplares de cada ponto segundo cada espécie, pois as coleções hídricas não são homogêneas em relação ao tipo de habitat.

A identificação das diferenças estatísticas foi feita por meio do uso do teste Kruskal-Wallis (Anova não paramétrica). Este teste foi utilizado porque as amostras não apresentavam distribuição normal (KRUSKAL e WALLIS, 1952) e foram feitas comparações de três ou mais grupos. Para isso, utilizou-se o pacote PMCMR do programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015). Foram consideradas significantes as análises estatísticas com $p < 0,05$. Com os dados das análises estatísticas do teste Kruskal-Wallis considerados significantes, foram analisados por um segundo teste, o teste de *post-hoc* Nemenyi (NEMENYI, 1963), que consiste em fazer comparações em pares com o intuito de verificar quais dos fatores que diferem entre si.

Para as espécies de *Biomphalaria* foram determinados os índices de Shanno-Wiener (H'), Simpson, rarefação e Riqueza de espécies, em relação a cada coleção hídrica estudada. Os índices foram calculados no programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015) utilizando o pacote *Vegan* (OKSANEN et al., 2015).

6.3.4.3 Modelagem de nicho ecológico

A modelagem de nicho compreendeu os 55 municípios da UGRHI-17 do Médio Paranapanema. Para isso, foi utilizado o algoritmo de máxima entropia. Esse procedimento considera que a melhor distribuição de probabilidades é aquela que maximiza a entropia e satisfaz todas as restrições à distribuição das espécies. Trata-se de um método com o qual é possível realizar previsões ou inferências a partir de informações incompletas (PHILLIPS et al., 2006; PEDERSEN et al., 2014).

Para a construção dos modelos foram consideradas informações sobre a ocorrência das espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* nos pontos em que as espécies foram identificadas. As informações do solo foram obtidas na Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Rossi, 2017). Foram utilizadas 19 variáveis (Bio1-Bio19) climáticas que foram obtidas no WorldClim Versão 2 do período de 1970-2000 (FICK e HILMANS, 2017) em resolução de 30 arc-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$). E foram utilizadas variáveis de drenagem (Acc, Dir, Ccon) obtidas no HydroSHEDS em resolução de 30 arc-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$) (LEHNER et al., 2006). A distância vertical à drenagem mais próxima extraída a partir do algoritmo Hand (*Height Above the Nearest Drainage*), com limiar de 50 pixels (RENNÓ et al., 2008) e a densidade de drenagem (Densi) resolução espacial de $\sim 1 \text{ km}$ (XIMENES, 2008) foram obtidas no AMBDATA. E uma variável de altitude obtida no TOPODATA a partir dos dados em SRTM de resolução espacial de $\sim 1 \text{ km}$ (VALERIANO e ROSSETTI, 2011) (Tabela 1).

Para eliminar a colinearidade foi feita análise das variáveis, por meio do fator de inflação de variância (VIF), com as 26 variáveis descritas acima. Este procedimento é a chave para evitar artefatos analíticos, pois ao utilizar variáveis colineares pode-se alterar o peso das variáveis e com isso alterar os padrões de agrupamento, no modelo. Para isso foram consideradas primeiramente todas as variáveis, sendo eliminada a covariável com o VIF mais alto. Este processo foi repetido até que todos os valores de VIFs fossem menores que um limite pré-selecionado. Autores aceitam o limite do $VIF > 5$ ou $VIF > 10$ (CRANEY e SURLES, 2002; ZUUR et al., 2010), o que indica alto o nível de colinearidade, mas há uma abordagem mais

rigorosa utiliza os valores de VIF menores que dois. (QUINN e KEOUGH, 2002; ZUUR et al., 2010), por isso foi considerado como limite superior aceitável, valores de VIF menores que dois. A análise dos VIF foi realizada utilizando o programa R (R DEVELOPMENT, 2015).

Tabela 1 - Variáveis usadas no modelo ecológico. As temperaturas são expressas em C * 10, precipitações em mm, elevação acima do nível do mar em metros e acúmulo de fluxo em número de células.

Variável = Descrição		
Climática		Hidrologia
Bio1 = Temperatura média anual	Bio11 = Temperatura média do trimestre mais frio	Ccon = Elevação Hidrológicamente condicionada
Bio2 = Variação Diurna Média de Temperatura (Média mensal (Tmax-Tmin))	Bio12 = Precipitação Anual	Dir = Direção da drenagem
Bio3 = Isotermalidade (Bio2/Bio7) (* 100)	Bio13 = Precipitação do mês mais chuvoso	Acc = Acúmulo de fluxo hidrológico
Bio4 = Sazonalidade da Temperatura	Bio14 = Precipitação do mês mais seco	HAND = Distância vertical à drenagem mais próxima
Bio5 = Temperatura máxima do mês mais quente	Bio15 = Sazonalidade da Precipitação (coeficiente de variação)	Densi = Densidade de Drenagem
Bio6 = Temperatura mínima do mês mais frio	Bio16 = Precipitação do trimestre mais chuvoso	
Bio7 = Amplitude térmica anual (Bio5-Bio6)	Bio17 = Precipitação do trimestre mais seco	Altitude e solo
Bio8 = Temperatura média do trimestre mais úmido	Bio18 = Precipitação do trimestre mais quente	Alt = Altitude (Relevo)
Bio9 = Temperatura média do trimestre mais seco	Bio19 = Precipitação do trimestre mais frio	Solo = Pedológico
Bio10 = Temperatura média do trimestre mais quente		

As variáveis selecionadas, após a remoção da colinearidade, foram utilizadas a análise de componentes principais (PCA) (ZUUR et al., 2010), para pré-selecionar as variáveis ambientais que maior influência na distribuição de cada espécie de *Biomphalaria*. Esta análise foi realizada com o pacote *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) no programa R.

Após realizado a PCA, foram selecionadas as quatro variáveis mais representativas através da escolha das variáveis nos 2 eixos principais, mais importantes, através da observação dos autovalores para cada espécie, estas foram utilizados para a análise MaxEnt, para realizar as predições sobre distribuições das cinco espécies de *Biomphalaria* encontradas na área de estudo para o tempo atual e futuro.

Para as predições futuras da presença das espécies de caramujos foram utilizadas informações sobre cenários climáticos futuros com base nos documentos disponibilizados pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC). Utilizou-se o modelo climático regional (RCM) HadGEM2-ES, um modelo estável que representa um estado realista do clima, vegetação e aerossóis antropogênicos e naturais (COLLINS et al., 2011; LORENZ et al., 2017) as quais foram obtidas no WorldClim Versão 1.4 do período de 2041-2060 com resolução de

30 arc-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$). Deste modelo climático, foram considerados dois cenários possíveis dependendo da quantidade de gases de efeito estufa (GEE) que serão emitidos nos próximos: Baixo RCP (*representative concentration pathways*) 2.6, no qual a temperatura global tende a aumentar em $1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,4$ a $1,6 \text{ }^\circ\text{C}$); e alto para RCP 8.5, no qual a temperatura global tende a aumentar em $2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($1,4$ a $2,6 \text{ }^\circ\text{C}$) (IPCC, 2013).

Estas informações foram transformadas em formato ASCII no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS Development Team, 2018), para leitura no MaxEnt, que forneceu as probabilidades da presença de cada uma das espécies de caramujos em mapas de adequação. A escala de probabilidade que varia entre 0 (nenhuma probabilidade de presença da espécie) e 1 (alta probabilidade de presença da espécie), isto é, desde habitat não adequado até habitat totalmente adequado. Curvas do tipo ROC (*receiver operator characteristic*) foram utilizadas para avaliar a acurácia das informações obtidas. O modelo de distribuição potencial foi estimado utilizando-se um algoritmo de máxima entropia no programa MaxEnt 3.4.1 (PHILLIPS et al., 2006; PHILLIPS e DUDÍK, 2008). Os dados foram computados com os um subconjunto de treinamento de 75%, 25% de teste e 25 repetições e a saída foi computada como *logistic*, teste de *jackknife* e através das curvas de resposta em MaxEnt (ZABURLÍN et al., 2016).

6.3.5- RESULTADOS

6.3.5.1 Análise da biodiversidade de espécies do gênero *Biomphalaria*

No período entre 2015-2018, foram coletados 8098 exemplares de *Biomphalaria* presentes nas 365 amostras do total de 894 amostras. Foi possível a identificação ao nível de espécies em 276 amostras contendo no total 5754 exemplares, utilizando-se taxonomia por caracteres morfológicos e moleculares.

B. occidentalis e *B. peregrina* foram as espécies mais abundantes com 24.1% (1949) e 19.1% (1544), seguidas por *B. tenagophila* com 17.5% (1415), *B. glabrata* com 5.8% (468), *B. straminea* com 4.7% (378) e 28.9% (2344) *Biomphalaria* spp. A média total foi $10.2 \text{ IC}=10.2 \pm 1.1$ exemplares por amostra de *Biomphalaria* e desvio (σ) de 40.6.

Em 76 coleções hídricas de 114 pesquisadas foram encontrados espécimes do gênero *Biomphalaria*. As espécies *B. peregrina* e *B. occidentalis* foram as com maior distribuição geográfica, colonizando 43 e 38 coleções hídricas, respectivamente, seguidas por *B. tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata* com 14, 12 e 5 coleções hídricas (Figura 2).

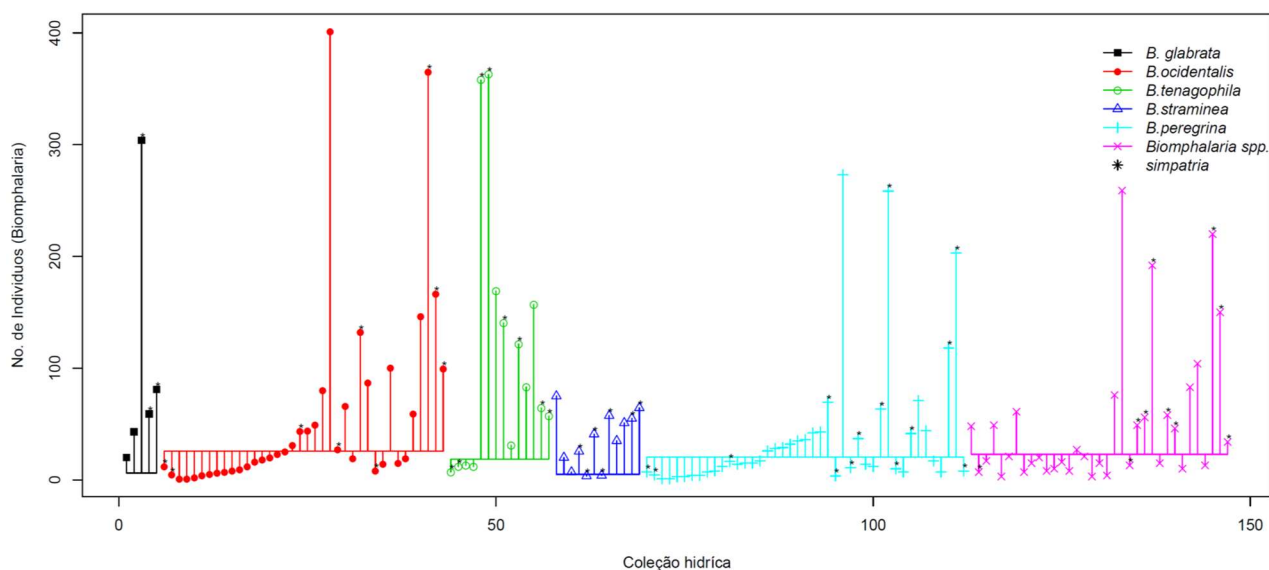


Figura 2 – Gráfico com o número de indivíduos de *Biomphalaria* coletados por coleção hídrica segundo a espécie identificada, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo, Brasil. Linhas horizontais representam a média de números de exemplares coletados por espécie.

As coleções de água doce onde observamos a presença de espécimes do gênero *Biomphalaria*, são formadas em sua maioria por coleções hídricas de pequeno porte, de no máximo 5 km de extensão, representados na maioria em áreas rurais (Tabela 2).

Do total de 654 pontos pesquisados foram encontrados o gênero *Biomphalaria* em 178 pontos, predominando habitats antropomorfizados (açudes, poços e valas) (Tabela 3).

Tabela 2 - Quantidade de *Biomphalaria* coletados em 76 coleções hídricas pelo tamanho de coleção hídrica (Extensão da coleção hídrica) e tipo de urbanização, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, no estado de São Paulo, Brasil.

K-W = Kruskal-Wallis, N= Nemenyi, *# = $p < 0,05$ para Nemenyi, CH= coleção hídrica

	Variáveis categóricas	N° CH	<i>B. glabrata</i>		<i>B. occidentalis</i>		<i>B. peregrina</i>		<i>B. straminei</i>		<i>B. tenagophila</i>		N total	K-W (N*)
			N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)		
Extensão (Km)	<1	29	366*	(15.5)	527	(22.4)	528*	(22.4)	177	(7.5)	757	(32.1)	2355	0.01*
	1-5	37	102*	(4.2)	1096*	(45.6)	851*	(35.4)	176	(7.3)	181*	(7.5)	2406	6.3e-07*
	6-10	6	0		226*	(83.4)	14*	(5.2)	0		31*	(11.4)	271	0.006*
	>11	4	0		100	(30.9)	151	(33.6)	25	(7.0)	446	(93.0)	722	0.43
	K-W(N#)				0.14		0.06		0.21		0.02			
	t-test		0.31											
Tipo de urbanização	Rural	62	124*	(3.7)	1034*	(31.2)	302#*	(39.3)	27	(8.4)	577*	(17.4)	3315	8.1e-13*
	Urbano	11	285	(21.6)	799	(60.6)	2#	(0.2)	75	(5.7)	157	(11.9)	1318	0.01
	Periurbano	3	59	(5.3)	116	(10.3)	240	(21.4)	25	(2.2)	681	(60.7)	1121	0.55
		K-W(N#)		0.03		0.09		0.01#		0.30		0.01		

Tabela 3 - Quantidade de *Biomphalaria* coletados em 178 pontos de coletas pelo tipo de habitat, no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil.

K-W = Kruskal-Wallis, N= Nemenyi, *# = $p < 0,05$ para Nemenyi

Tipo de habitat	Nº pontos	<i>B. glabrata</i>		<i>B. occidentalis</i>		<i>B. peregrina</i>		<i>B. straminea</i>		<i>B. tenagophila</i>		N total	K-W (N*)
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Córrego	16	0		64 (17.9)		241 (67.5)		39 (10.9)		13 (3.6)		357	0.01
Banhado	37	119 (11.2)		160 (15.1)		380* (35.8)		25* (2.4)		376 (35.5)		1060	0.001*
Nascente	31	91 (8.9)		280 (27.5)		203 (19.9)		73 (7.2)		373 (36.6)		1020	0.01
Lago/Lagoa	29	12* (0.8)		637* (43.3)		407 (27.7)		27* (1.8)		387 (26.3)		1470	0.001*
Rio	4	20 (74.1)		0		7 (25.9)		0		0		27	-
Ambientes artificiais	61	226* (12.4)		808* (44.4)		306 (16.8)		214* (11.8)		266* (14.6)		1820	2.1e-11*
K-WI(N#)				0.50		0.02		0.23		0.80			0.18

Foram observadas que as amostras não apresentam distribuição normal (Figura 3AB) e que possuem diferenças significantes para o teste Kruskal-Wallis e Nemenyi, em relação à extensão da coleção hídrica, entre *B. glabrata* e *B. peregrina* em coleções hídricas de <1 Km e das espécies, com exceção de *B. straminea* em coleções de 1-5 km. Além disso, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as espécies e as áreas rurais, as espécies e *B. peregrina* e *B. occidentalis* foram encontradas em maior quantidade nesta área (Tabela 2). Foi observado diferenças significativas em *B. peregrina* em maior quantidade que *B. straminea* em habitats caracterizados em banhados, *B. occidentalis* em maior quantidade que *B. glabrata* em beira de lago e ambiente artificial (Vala, poço, tanque, represa e horta) (Tabela 3).

Os valores de diversidade e riqueza podem ser afetados pelo número de caramujos coletados em cada coleção hídrica. Com a análise do índice rarefação da espécie, foi observado que aproximadamente 25 exemplares coletados são suficientes para quantificar a riqueza de espécies (Figura 3C). Entretanto foram analisados menos de 25 exemplares em 39 coleções hídricas, embora em 85% destas coleções hídricas tenham sido realizadas mais de uma coleta no mesmo ponto ou em pontos diferentes (ANEXO B IV).

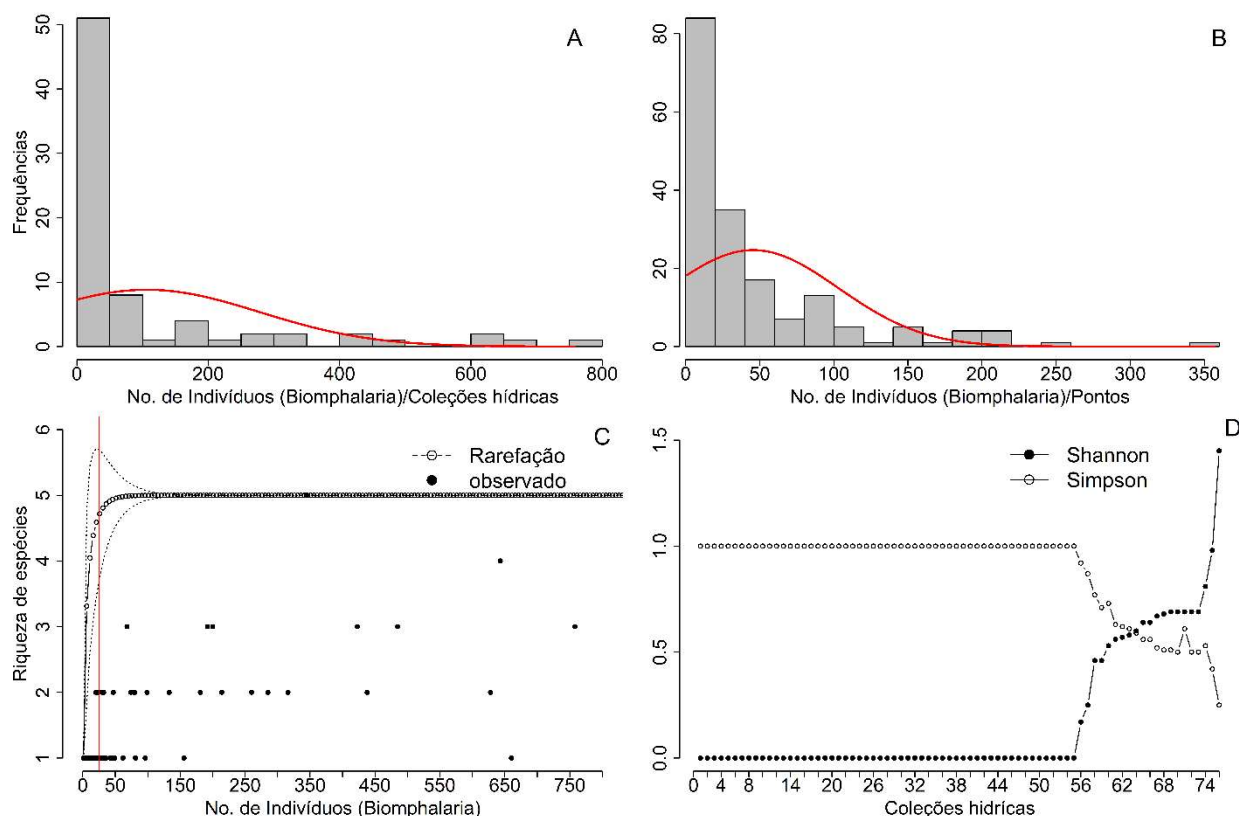


Figura 3 – Histograma de frequência dos números de espécimes de *Biomphalaria* atribuídos as amostras por coleções hídricas (A) e por pontos de coleta (B) e curva estimada da probabilidade amostral. Curva de rarefação para a riqueza de espécies de *Biomphalaria* (C) e o índices de Shannon e Simpson por cada coleção hídrica (D), no período de 2015-2018 coletados em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil.

A análise de diversidade das 76 coleções hídricas pelo índice Shannon e Simpson mostra dominância de uma única espécie na maioria das coleções hídricas (Figura 3D), com dominância de *B. occidentalis* ou *B. peregrina* (Tabela 4). Também foi observado que há uma maior diversidade de espécies de *Biomphalaria* nos córregos Sobra, Jacú (Ourinhos) e no Ribeirão do Pinto (Rib. do Sul), 1,45, 0,98, 0,81 (Shannon) e 0,25, 0,42, 0,53 (Simpson's), respectivamente (Tabela 4). E em 16 coleções hídricas (14,0%) foram encontradas espécies de *Biomphalaria* em sintopia (Tabela 4).

Tabela 4 - Índices de diversidade ecológica, *Shannon* (H), *Richness* (R), *Simpson* (λ), para as cinco espécies de *Biomphalaria* para as 76 coleções hídricas que estas espécies foram encontradas, no período de 2015-2018 em Assis, Ribeirão do Sul, Ourinho, Chavantes e Ipaussu, na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil. x = amostras examinadas apenas qualitativamente, s.i = não foi possível identificar por espécie. *# = espécies sintopicos (Stp). B. g=*B. glabrata*, B.s=*B. straminea*, B.t=*B. tenagophila*, B.o=*B. occidentalis*, B.p=*B. peregrina*, B. spp.=*Biomphalaria* spp.

Código	Coleções hídricas	Nº	B.g	B.s	B.t	B.o	B.p	B.spp	Stp	R	H	D=1/(λ)
32	Lageadinho	43	43							1	0	1
83	Fortuninha	23	20					3		1	0	1
68	Lagoa	7		7						1	0	1
40	Jacuzinho	81		20				61		1	0	1
31	Parque Trianon	96		75				21		1	0	1
21	Piranhas	62			13			49		1	0	1
49	Faz. Paraíso	1				1				1	0	1
112	Ag. do Capão Bonito	1				1				1	0	1
25	Tupanciretã	2				2				1	0	1
80	Cabiuna	5				5				1	0	1
54	Faz. Jaquarerê	6				6				1	0	1
75	Ag. da Lagoa	9				9				1	0	1
58	Burguês	11				8		3		1	0	1
27	Ag. Morna	12				12				1	0	1
72	Ag. da Pirapitinga	18				18				1	0	1
53	Usina São Luiz	20				20				1	0	1
114	Ag. Mombuquinha	25				25				1	0	1
19	Toperó	27				23		4		1	0	1
76	Ag. do Pavão	28				7		21		1	0	1
44	Monjolinho	31				4		27		1	0	1
85	Ag. do Óleo	31				16		15		1	0	1
100	Ag. do Campestre	31				31				1	0	1
18	Rib. Bonito	44				44				1	0	1
34	Café	49				49				1	0	1
45	Chumbiadinha	156				80		76		1	0	1
41	Furnas	660				401		259		1	0	1
52	Faz. Nova Era	1					1			1	0	1
88	Paulista	1					1			1	0	1
99	Ag. do Café	3					3			1	0	1
82	Freire	10					3	7		1	0	1
66	Ag. da Boa Vista	4					4			1	0	1
42	São Joaquim	19					4	15		1	0	1
4	Ag. Úmida	27					7	20		1	0	1
1	Douradão	8					8			1	0	1
59	Ag. do Cascavel	12					12			1	0	1
28	Ag. dos coqueiros	14					14			1	0	1
87	Fortuninha2	15					15			1	0	1
74	Ag. do Barreiro	23					15	8		1	0	1
2	Virtuosa	27					17	10		1	0	1
23	Harmonia	26					26			1	0	1
55	Asa Branca	44					28	16		1	0	1
91	Lagarto Verde	29					29			1	0	1
67	Guariroba	32					32			1	0	1
8	Santa Hermínia	43					35	8		1	0	1
6	Lambari	36					36			1	0	1
63	Capim	42					42			1	0	1
36	Canaã	43					43			1	0	1
22/13	Morais/ Ag. do Triunfo	65						65		S.i	-	-
3	Pau D'Alho	20		x*			13*		7	2*	-	-
16	Boa Vista (Divisa)	21			x*		x*	7	14	2*	-	-
81	Ag. Jacu	24			x*	x*			24	2*	-	-
89	Baixadão	30		21*			x*		9	2*	-	-
56	Fundo	47				40*	x*		7	2*	-	-
5	Palmeiras	74				x*	65*		9	2*	-	-
14	Barranco Vermelho	285			12		273			2	0.17	0.92
9	Faz. Boa Vista	423		25#	331*#		x*	13	54	3*	0.25	0.87
10	São Luiz	485			350*#	14*	37#	49	35	3*	0.46	0.77
86	Fortuna	80				66	14			2	0.46	0.71
38	Barreirinha	200			169	19	12			3	0.53	0.73
15	Rib. Grande	260			115*		38*	56	51	2*	0.56	0.63
46	Christoni	628	265*			93*		192	78	2*	0.57	0.62
11	Mombuca	133			31	87		15		2	0.58	0.61
12	Mombuquinha	438			97*		234*	58	49	2*	0.6	0.59
95	Ag. do Cervo	21				14	7			2	0.64	0.56
24	Colossinho	68		4		x*	2*	46	16	3*	0.64	0.56
73	Ag. Funda	99		47*			31*		21	2*	0.67	0.52
57	Rib. Grande	181				100	71	10		2	0.68	0.51
65	Matão	79		35			44			2	0.69	0.51
20	Santo Antônio	192			83	19	7	83		3	0.69	0.61
47	Água Veada	214		51		59		104		2	0.69	0.50
35	Japoneses	32				15	17			2	0.69	0.50
43	Furninhas	316			157	146		13		2	0.69	0.50
62	Rib. do Pinto	758		55		340*	93*	220	50	3*	0.81	0.53
39	Jacú	643	59		x*	102*	203	150	129	4*	0.98	0.42
33	Sobra	344	81	38*	57	73*	8	34	53	5*	1.45	0.25
	Total	8098	203	247	522	1287	1031	1738	606			

6.3.5.2 Mapeamento e modelagem da distribuição de espécies de *Biomphalaria*

Das 26 variáveis inicialmente consideradas para a modelagem no MaxEnt, 17 foram eliminadas por colinearidade utilizando o VIF e nove variáveis foram consideradas na análise de PCA (Tabela 5). Considerado cada espécie separadamente, elegemos as quatro variáveis mais importantes na análise de PCA. As variáveis de maior contribuição foram para *B. glabrata* (Solo, Dir, Bio7 e Densi), *B. occidentalis* (Bio12, Bio15, Hand e Densi), *B. straminea* (Bio1, Bio7, Bio12 e Hand), *B. tenagophila* (Bio1, Bio15, Hand e Bio12) e *B. peregrina* (Hand, Bio7, Bio12 e Densi) (Tabela 5-Figura 4).

Tabela 5- Variáveis ambientes de maior importância na análise de PCA. As variáveis que mais contribuirão estão em negrito e estas foram consideradas na modelagem do MaxEnt.

Variáveis ambientais	<i>B. glabrata</i>		<i>B. occidentalis</i>		<i>B. straminea</i>		<i>B. tenagophila</i>		<i>B. peregrina</i>		VIF
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	
Solo = Pedológico	0.216	-0.554	0.153	-0.125	-0.298	0.248	0.244	-0.372	0.202	-0.388	1.36
Dir = Direção da drenagem	-0.432	0.341	-0.106	-0.136	0.303	0.213	0.327	-0.346	-0.006	-0.265	1.04
Acc = Acúmulo de fluxo hidrológico	-0.236	0.179	0.106	0.255	0.314	0.029	0.206	0.358	0.087	0.111	1.04
Bio1 = Média da temp. anual	0.000	0.000	0.458	0.273	0.056	0.576	0.469	-0.062	0.485	-0.267	1.59
Bio7 = Amplitude térmica anual	-0.368	-0.441	0.456	-0.350	0.479	0.249	0.184	-0.283	-0.207	-0.556	1.30
Bio12 = Precipitação anual	-0.293	-0.335	0.131	-0.566	0.433	-0.371	-0.253	-0.507	-0.486	-0.234	1.05
Bio15 = Sazonalidade da Precipitação	-0.261	0.422	-0.098	-0.547	0.342	-0.239	-0.235	-0.515	-0.401	-0.311	1.86
Hand = Dist. vert. à drenag. mais próx.	0.431	0.152	-0.475	-0.244	-0.019	-0.517	-0.480	0.085	-0.493	0.146	1.34
Densi = Densidade de Drenagem	-0.485	-0.192	0.532	-0.156	0.429	0.190	0.433	0.008	0.184	-0.462	1.28

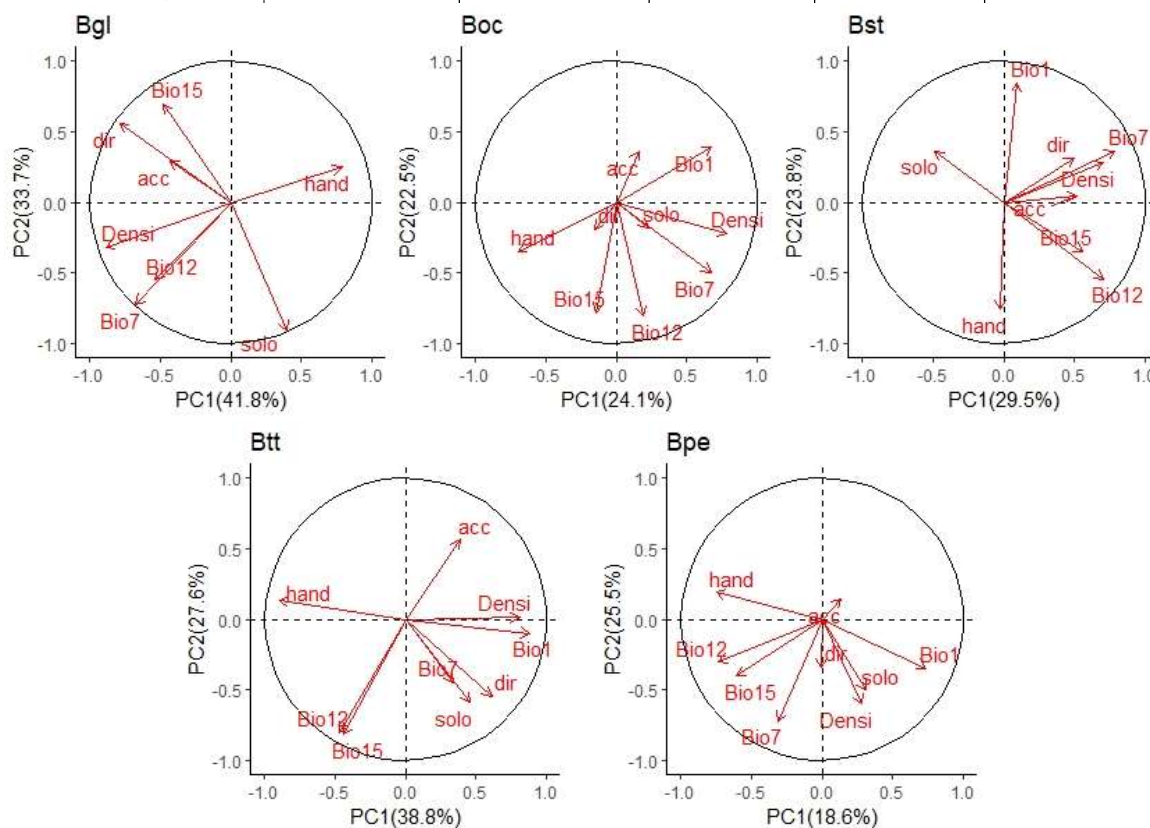


Figura 4 – Gráfico com a análise dos componentes principais (PCA) para as cinco espécies do gênero *Biomphalaria*.

Dentre as quatro variáveis de maior contribuição na análise do PCA, nos resultados finais do MaxEnt, foi observado que as variáveis que mais contribuíram para a distribuição das espécies no presente foram: precipitação anual (Bio12) na espécie *B. tenagophila*, Amplitude térmica anual (Bio7) para as espécies *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. peregrina*, e sazonalidade da precipitação (Bio15) para *B. occidentalis* (Tabela 6,

ANEXO A VI, pg 188).

Tabela 6 - Porcentagem da contribuição de cada variável ambiental para o teste final no modelo de MaxEnt (média) de cada espécie no presente, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.

0% 50% 100% Legenda= Contribuição

Variáveis ambientais	Espécie (Média) -Contribuição (%)				
	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. peregrina</i>	<i>B. occidentalis</i>
Bio1 = Média da temp. anual	17.84		32.85		
Bio7 = Amplitude térmica anual (Bio5-Bio6)		76.31	61.64	50.06	
Bio12 = precipitação anual	55.35		3.50	36.95	4.86
Bio15 = Sazonalidade da Precipitação	23.96				85.88
Densi = Densidade de Drenagem		0.02		11.83	3.90
Dir = Direção da drenagem		0.44			
HAND = distância vertical à drenagem mais próxima	2.86		2.00	1.16	5.37
Solo = Pedológico		23.23			
Test AUC	0.98	0.98	0.83	0.88	0.89
AUC Standard Deviation	0.01	0.01	0.08	0.04	0.02

O modelo MaxEnt, mostrou que há probabilidade futura da espécie *B. glabrata* permanecer nos municípios de Ourinhos e Assis e uma probabilidade em torno de 50% da espécie expandir sua presença para outros municípios da região do Médio Paranapanema (Figura 5) em função de um possível aumento futuro dos GEE. Os resultados para *B. straminea* mostram que esta espécie tem maior probabilidade de expandir sua colonização na região de estudo do que *B. glabrata*, especialmente nos municípios próximos a Ourinhos e no segundo cenário de mudanças climáticas (RCP 8.5).

Atualmente, *B. occidentalis* têm maior distribuição a oeste da região de estudo e *B. peregrina* e *B. tenagophila* nas áreas próxima ao município de Ourinhos e Ipaussu. *B. occidentalis*, *B. peregrina* e *B. tenagophila* tendem a manter no futuro a colonização nos

mesmos locais atuais, com maior probabilidade de colonização nos municípios próximos de Ourinhos, Assis, Ipaussu e Iepê (Figura 5).

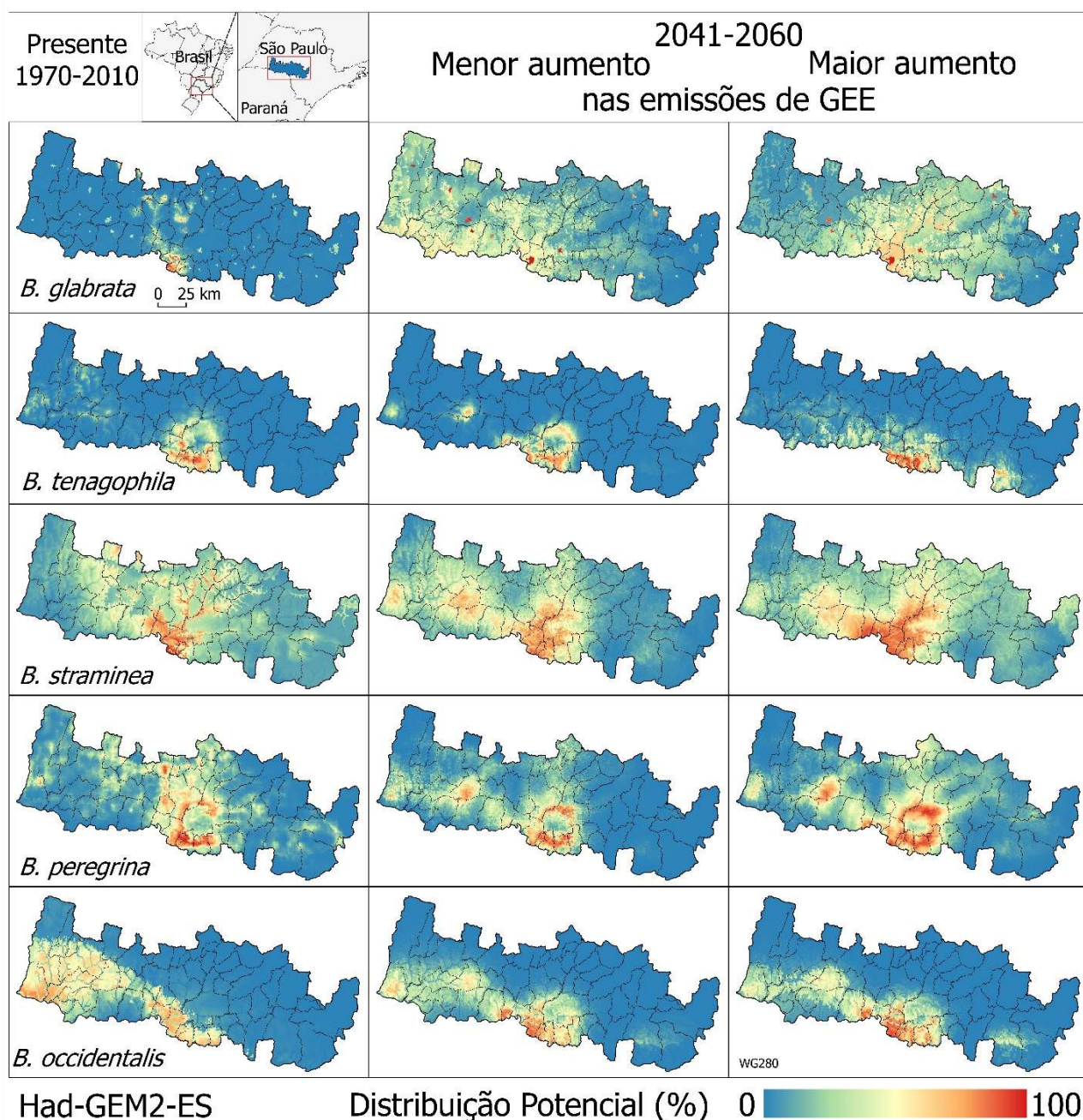


Figura 5 - Os mapas mostram a distribuição potencial em formato logístico no presente e no futuro em dois cenários de mudanças climáticas: RCP 2.6 (menor aumento nas emissões de gás de efeito estufa (GEE)) RCP 8.5 (maior aumento nas emissões de GEE), com base no GCM HadGEM2-ES, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. Os mapas foram construídos com o *software* QGIS 2.18.22.

6.3.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo é o mais abrangente em relação à literatura, no mapeamento da distribuição potencial geográfica de *Biomphalaria*, associada ao uso de novas ferramentas para investigação da biodiversidade das espécies identificadas na URGHI-17 do Médio Paranapanema. Aqui, procurou-se fomentar o desenvolvimento de estratégias para a melhoria do conhecimento da biodiversidade, por meio do uso de ferramentas geoespaciais, e prever as futuras mudanças na distribuição de *Biomphalaria* em função das mudanças climáticas com uso de modelagem de nicho ecológico.

Além disso neste estudo, foi considerada como unidade de amostragem a coleção hídrica em toda a sua extensão. Embora os resultados destas duas abordagens sejam similares em relação à riqueza de espécies, a análise por coleção hídrica amplia o conhecimento para identificar padrões ecológicos e ambientais de colonização das populações de caramujos.

Esta região é historicamente marcada por casos de esquistossomose e presença dos hospedeiros intermediários (REY, 1952; CVE, 2011ab), entretanto as espécies mais abundantes e com maior distribuição neste estudo foram *B. occidentalis* e *B. peregrina*, que não são hospedeiras intermediárias, seguidas por *B. tenagophila*, *B. glabrata*, *B. straminea*, respectivamente. No trabalho de TELES, (1989), havia observado que *B. occidentalis* tinha uma maior colonização em áreas próximas ao rio Paranapanema. *B. glabrata* com maior concentração de áreas de colonização na URGHI-17 do que em outras regiões do estado de São Paulo (CVE, 2007), coloniza atualmente pontos específicos e delimitados.

No cenário futuro, *B. occidentalis* e *B. peregrina* colonizariam as mesmas áreas onde atualmente estas espécies predominam. Estas duas espécies são aquelas com ampla distribuição geográfica na área de estudo, sugerindo haver uma limitação do potencial de colonização futura destas espécies na região. Haveria uma espécie de saturação na distribuição destas espécies dentro da área estudada.

B. occidentalis foi registrada nos cinco municípios onde houve coletas neste estudo e em levantamentos anteriores (TELES, 1989; TUAN, 2009), além de outros 14 municípios da região como Cândido Mota, Salto Grande, Iepê etc. (Figura 1C) (TELES, 1988; 1989; TUAN, 2009; OHLWEILER et al., 2010). A área de distribuição de *B. peregrina* inclui 35 municípios dos 55 da URGHI-17 como por exemplo, Ipaussu, Ourinhos, Ribeirão do Sul, Assis, Chavantes, Cândido Mota, Salto Grande, Platina, Iepê etc. (VAZ, 1989; TELES, 1988; TUAN, 2009; OHLWEILER et al., 2010). Em relação a *B. occidentalis* no modelo de máxima entropia, foi

estimado que a variável que mais contribuiu para explicar a distribuição de *B. occidentalis* foi a sazonalidade da precipitação. Esta variável pode influenciar a concentração de compostos poluentes, nutrientes, pH e outras características das águas superficiais, principalmente em águas com movimentação muito lenta ou paradas (OLIVER e RIBEIRO, 2014; AMORIM et al., 2016). Uma hipótese, é que a distribuição de *B. occidentalis* esteja condicionada a sobrevivência dos caramujos em ambientes antrópicos cujos corpos de água foram já suficientemente alterados por compostos poluentes.

Em relação a espécie *B. peregrina*, como também nas espécies *B. straminea* e *B. glabrata*, a variável que mais contribuiu para a suas distribuições futuras foi a amplitude térmica anual (Bio7). Corroborando desta forma as análises feitas com *B. peregrina* por RUMI et al. (2017). No entanto, estes autores sugerem que não somente a tolerância fisiológica desta espécie a climas mais frios, mas também o aumento da altitude, podem ter implicação na expansão da *B. peregrina*. A região da UGHRI-17 é caracterizada por altitudes entre 600-400 m, o que seria um fator de contenção da espécie na região. A variáveis amplitude térmica e a sazonalidade de precipitação por si só não parecem suficientes para explicar um padrão de expansão futura de *B. peregrina* e *B. occidentalis*, respectivamente, na área de estudo por uma questão de escala geográfica. Para uma avaliação mais acurada de cenários climáticos futuros, seria importante analisar dados de regiões geográficas mais abrangentes do que as utilizadas no nosso estudo.

Entretanto, para *B. glabrata* foi observada uma probabilidade de expansão para outros municípios da região em decorrência das mudanças climáticas seguido pelo tipo de solo, principalmente em áreas urbanas (ANEXO A VI). Em estudos anteriores já foi observado que esta espécie tem uma certa plasticidade e capacidade adaptativa de tolerar temperaturas elevadas (18 a 41°C) (MINISTERIO DA SAUDE, 2008; GOMES, 2011; CARVALHO et al., 2017), podendo ser um dos prováveis motivos da futura expansão geográfica detectada neste estudo. Este mesmo resultado foi observado no estudo de CARVALHO et al., (2017), onde a variável que mais contribuiu para a expansão da distribuição futura da espécie também foi a variável Bio7.

Apesar da probabilidade de permanência de *B. glabrata* em Ourinhos e Assis, locais historicamente marcados por casos de esquistossomose no passado, atualmente ocorre transmissão da doença em baixa intensidade apenas em Ourinhos, quadro resultante da adoção de medidas de saúde pública, especialmente em Assis (PALASIO et al., 2019b). A identificação dos pontos específicos de *B. glabrata* possibilitaria a redução total de transmissão da esquistossomose nesta região, a partir da adoção de medidas que priorizem a profilaxia destas

coleções hídricas e medidas educativas que limitem o acesso humano às cinco coleções hídricas identificadas no estudo.

Esta espécie também foi registrada em outros 10 municípios da região (TELES, 2005; OHLWEILER et al., 2010). Em Ipaussu, não foi mais encontrado exemplares desta espécie, o que pode ser também resultado da melhoria do saneamento básico (PALASIO et al., 2019b). Em tese, o mesmo pode ter ocorrido em Chavantes e Ribeirão do Sul, com melhoria na coleta e tratamento do esgoto (SNSA, 2017).

Entretanto, a provável expansão da distribuição de *B. glabrata* poderá corresponder, futuramente, a um aumento nos casos de esquistossomose, principalmente por esta espécie ser considerada a mais eficiente para a transmissão da infecção (MAGALHÃES e DIAS, 1973; PARAENSE, 2001). Mesmo que a maioria dos municípios tenha um índice de tratamento de esgoto acima de 80%, condições para isso há, uma vez que ainda existem localidades com precário saneamento básico (IBGE, 2010a), o que permitiria a continuidade do ciclo biológico do parasita.

No passado, a espécie *B. straminea* foi registrada nos municípios de Ribeirão do Sul e Ourinhos (TELES, 1988; 1996; 2005), fato que foi confirmado pelo presente estudo, além de registros anteriores em mais quatro municípios (Botucatu, Iepê, Rancharia e Salto Grande) (TELES, 2005; OHLWEILER et al., 2010). Também foi observada a expansão para os outros três municípios com coleta de *Biomphalaria* neste estudo (Chavantes, Ipaussu e Assis). No córrego Sobra, detectou-se, além de *B. straminea*, a presença das outras quatro espécies, sendo o local com mais riqueza de espécies de *Biomphalaria* do estudo. *B. straminea* é uma espécie com alto potencial de colonização de novos ambientes, como observado na Ásia (WOODRUFF et al., 1985) e capacidade de resistência à seca (PARAENSE, 1977), indicando que esta espécie tem capacidade em tolerar o aumento de temperatura, mas em menor grau que *B. glabrata* (GOMES, 2011). Entretanto, há necessidade de novos estudos fisiológicos para confirmar a sua plasticidade ao aumento de temperatura. Não surpreende, portanto, que os modelos aplicados à distribuição de *Biomphalaria* apontem *B. straminea* como a espécie com alto poder de expansão de colonização no futuro ao longo da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema.

Em relação à distribuição de *B. tenagophila*, foi observado que a precipitação anual é uma variável importante, ou seja, a quantidade de chuva proporciona a diminuição de barreiras geográficas e conseqüentemente a dispersão desta espécie. Além disso, em áreas urbanas, devido ao aumento do volume, as águas podem se misturar com o sistema de saneamento de esgoto, sendo uma agravante para dispersão da esquistossomose. Como já foi observado em

outros trabalhos, as doenças transmitidas por água, assim como as doenças de transmissão vetorial, são mais sensíveis às mudanças climáticas (PATZ e CHRISTENSON, 2010; AMORIM et al., 2016).

Em inventários anteriores, esta espécie teve registro em 16 municípios da região de estudo: Assis, Chavantes, Ourinhos, Ipaussu, Salto Grande, Santa Cruz do Rio Pardo, Palmital etc. (VAZ, 1989; TELES, 1989; 2005; TUAN, 2009; SUCEN, 2012; OHLWEILER et al., 2010). Como resultado da modelagem, *B. tenagophila* também tenderia a ocupar futuramente coleções de água doce circunscritas aos municípios onde a espécie já foi registrada, mas apresentado expansão em Iepê, onde estudos anteriores revelaram a presença de exemplares de *B. occidentalis* (TELES, 1989), *B. straminea* (TELES, 1996; 2005) e *B. peregrina* (OHLWEILER et al., 2010).

Uma limitação do estudo foi a impossibilidade de identificar todas as amostras de *Biomphalaria*, pois algumas destas não sobreviveram ao transporte do campo ao laboratório, ou eram animais jovens ou parte destes caramujos foram separados para a análise parasitológica. Esta limitação foi contornada com a ampliação do número de coletas. Destacam-se como pontos fortes do estudo o grande número de pontos amostrados, em relação aos estudos anteriores conduzidos na região do Médio Paranapanema (PIZA et al., 1972; TELES e VAZ, 1987; TELES, 2005; TUAN, 2009), a utilização de técnicas moleculares e espaciais para atualizar a distribuição dos caramujos neste espaço geográfico, além de prever as distribuições futuras dos hospedeiros intermediários relacionadas às mudanças climáticas.

A identificação dos prováveis locais com a presença atual e futura dos hospedeiros intermediários da esquistossomose associados a variáveis ecológicas e levando-se em conta mudanças climáticas pode permitir direcionar medidas de saúde pública para evitar ou reduzir transmissões futuras do agravo na área de estudo.

Conclui-se que há alta probabilidade da distribuição futura da espécie *B. glabrata* permanecer nos municípios de Ourinhos e Assis e uma média probabilidade de a espécie expandir para outros municípios da região de estudo em função das mudanças climáticas. Para *B. straminea*, os resultados mostram que esta espécie é a que tem a maior probabilidade de expansão de colonização no futuro. Para estas espécies, a expansão relacionou-se com o aumento da amplitude térmica anual para os próximos anos. *B. occidentalis*, *B. peregrina* e *B. tenagophila* tendem, em geral, a colonizar no futuro os mesmos locais atuais. As variáveis que mais contribuíram para a modelagem futura destas espécies foram a precipitação e a temperatura.

6.3.7- REFERÊNCIAS

- ANA. **Plano Integrado de Recursos Hídricos da Unidade de Gestão de Recursos Hídricos Paranapanema**. Agência Nacional de Águas (Brasil). 2016
- AMORIM, J.R.A.; CRUZ, M.; NOGUEIRA JUNIOR, L.R.; DOMPIERI, M. **Influência da sazonalidade da precipitação na qualidade da água superficial no polo de produção de milho em Sergipe**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 1º edição, p. 29, 2016.
- BARBOSA, B.C.; ALVES, F.S.; SANTOS, W.G.; BEIER, S.L.; PAES, P.R.O.; FREITAS, P.M.C. **Levantamento dos casos atendidos no setor de emergência e terapia intensiva da escola de veterinária da universidade federal de minas gerais de dezembro de 2014-dezembro de 2015**. In: Semana de Educação Continuada em Medicina Veterinária da UFES, 13, Alegre. Anais da XIII SECOMV, p. 19, 2016.
- CARVALHO, M.E.S.; MENDONÇA F.A.; SANTOS, S.S.C. **Variabilidade climática e a modelagem ecológica da *Biomphalaria glabrata*: cenários futuros (2050 e 2070) para o hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil**. Os desafios da geografia física na fronteira do conhecimento. In I Congresso Nacional de Geografia Física, Instituto de geociência, UNICAMP, 1579-1589, 2017. Disponível em: <https://ocs.ige.unicamp.br/ojs/sbgfa>.
- CBH-MP. **Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2018 (Ano Base: 2017) – UGRHI-17**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema, 2018a. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorios/>.
- CBH-MP. **Plano de bacia da unidade de gerenciamento de recursos hídricos do Médio Paranapanema UGRHI – 17, Relatório n. 986/17 – RES-02 – Oficinas de definição das prioridades para gestão dos recursos hídricos na UGRHI 17 – Etapa Prognóstico**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. 2018b.
- CBN-MP. **Caracterização Da UGRHI-17**. CBHs de Rios Afluentes. São Paulo. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. 2018c. Disponível em: <http://paranapanema.org/ugrh/comites//sp/cbhmp/caracterizacao/> (último acesso em 2019)
- CHMYZ, I. **Dados parciais sobre a arqueologia do Vale do Paranapanema**. PRONAPA 1, Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi. 6: 59-73, 1967.
- COLLINS, W.J.; BELLOUIN, N.; DOUTRIAUX-BOUCHER, M.; GEDNEY, N.; HALLORAN, P.; HINTON, T.; MARTIN, G. **Development and evaluation of an Earth-System model-HadGEM2**. Geosci Model Dev Discuss. 4(4): 1051, 2011.
- CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância Epidemiológica**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Normas e Instruções, [Documento técnico]**, 2007.
- CVE. **Esquistossomose [Dados estatísticos 1981 - 2009 - definitivo]**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo. 2011a. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br> (último acesso em 2018)
- CVE. **Esquistossomose [Dados estatísticos,2008-2010]**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo. 2011b. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/esquistodados.html>.
- CRANEY, T.A.; SURLES, J.G. **Model-Dependent Variance Inflation Factor Cutoff Values**, Quality Engineering, 14:3, 391-403, 2002.
- DESLANDES, N. **Técnica de dissecação e exame de planorbídeos**. Rev. Serv. Espec. Saúde Pública, 4(2):371-382, 1959.
- FICK, S.E.; HIJMANS, R.J. **Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas**. International Journal of Climatology, 2017. Disponível em: <http://www.worldclim.org>.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W.; LUTZ, R., VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates**. Mol Mar Biol Biotechnol. 3:294-299, 1994.
- QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Version 2.18.22 Geographic Information System**. Open Source Geospatial Foundation Project. 2018. Disponível em: <http://www.qgis.org/> (último acesso em 2018)

- FONSECA, G.; FONTANETO, D.; DI DOMENICO, M. **Addressing biodiversity shortfalls in meiofauna**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 502:26-38, 2018.
- GAZZINELLI, A.; KLOOS, H. **The use of spatial tools in the study of *Schistosoma mansoni* and its intermediate host snails in Brazil: a brief review**. *Geospat Health*. 2: 51-58, 2007.
- GITHEKO, A.K.; SCHERAGA, J.D.; WOODWARD, A. **Climate change and human health: risks and responses**. World Health Organization, Geneva. 61-78, 2010.
- GOMES, E.C.S. **Modelo de risco para a esquistossomose: abordagem espaço-temporal da transmissão no litoral de Pernambuco**. Tese de doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2011.
- HABIB, M.R.; GUO, Y.H.; LV, S.; GU, W.B.; LI, X. H.; ZHOU, X.N. **Predicting the spatial distribution of *Biomphalaria straminea*, a potential intermediate host for *Schistosoma mansoni*, in China**. *Geospatial health*. 11(3), 2016.
- HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DE WAARD J. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc Biol Sci*. Feb 7; 270(1512): 313–321, 2003.
- IBGE. **Censo demográfico 2010**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>, 2010a.
- IBGE. **Setor Censitário 2010**. Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>, 2010b.
- IBGE. **Base Contínua 250 mil, Hidrografia**. Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>, 2010c.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2017**. Sistema IBGE de recuperação automática: SIDRA. Banco de dados agregados. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. 2017a.
- IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. Sistema IBGE de recuperação automática: SIDRA. Banco de dados agregados. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6635>. 2017b
- IPCC. **Summary for Policymakers**. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: STOCKER, T.F.; QIN, G.; PLATTNER, K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S.K.; BOSCHUNG, J.; NAUELS, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P.M. eds. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2013.
- JUNK, W.J., PIEDADE, M.T., LOURIVAL, R., WITTMANN, F., KANDUS, P., LACERDA, L.D., BOZELLI, R.L., ESTEVES, F.A., NUNES DA CUNHA, C., MALTCHIK, L., SCHÖNGART, J., SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; AGOSTINHO, A.A. **Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection**. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*, 24: 5-22, 2013.
- KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses (version 1.0. 5)**. R package version, 2017.
- KAWAZOE, U., MAGALHÃES, L., HOTTA, L.K.; TAKAKU, L. **Competição biológica entre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), em criadouros naturais no município de Ourinhos, SP, Brasil**. *Rev. Saúde Publ. S. Paulo*, 14(1):65-87, 1980.
- KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. **Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis**. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260):583-621, 1952.
- LEHNER, B., VERDIN, K.; JARVIS, A. **HydroSHEDS Technical Documentation**. World Wildlife Fund US, Washington, DC. 2006. Disponível em: <http://hydrosheds.cr.usgs.gov>.
- LORENZ, C., AZEVEDO, T.S., VIRGINIO, F., AGUIAR, B.S., CHIARAVALLOTI-NETO, F.; SUESDEK, L. **Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005959, 2017.
- MAGALHÃES, L.A.; DIAS, L.C.S. **Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP)**. *Rev Saúde Pública*, 7(3):295-297, 1973.
- MALTCHIK, L., STENERT, C., KOTZIAN, C.B.; PEREIRA, D. **Responses of freshwater molluscs to environmental factors in Southern Brazil wetlands**. *Brazilian Journal of Biology*. 70(3): 473-482, 2010.
- MARENCO, J.A. **O futuro clima do Brasil**. *Revista USP*. (103):25-3, 2014.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, p.177, 2008.
- NEMENYI, P.B. **Distribution-free Multiple Comparisons**. Tese de Doutorado, Princeton University, 1963.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. **'Vegan' Community Ecology Package**. R package 2.3-0. 2015. Disponível em: <https://cran.r-project.org>. <https://github.com/vegandevs/vegan>.
- OLIVER, S.L.; RIBEIRO, H. **Variabilidade climática e qualidade da água do Reservatório Guarapiranga**. Estudos avançados, 28(82):95-128, 2014.
- 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. 230, 2010.
- PALASIO, R. G.S, ROSA-XAVIER, I. G, CHIARAVALLOTI-NETO, F.; TUAN, R. **Biodiversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated limnic mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools**. Biota Neotropica submitted in 2019a.
- PALASIO, R.G.S; BORTOLETO, A.N; ROSA-XAVIER, I.G; ANDRIGHETTI, M.T.M; TUAN, R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. **Schistosomiasis in Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil": Does it matter today for Public Health?** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2019b.
- PARAENSE, W.L. ***Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata)**. Mem. Ist. Oswaldo Cruz. 76:199-211, 1981.
- PARAENSE, W.L. **Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros (Mollusca, Gastropoda)**. Arq. Mus. Nac, Rio de Janeiro. 55:105-128, 1975.
- PARAENSE, W.L. **Distribuição geográfica dos vetores da xistosomose no Nordeste do Brasil**. Painel Programa Especial de Controle da Esquistossomose, In VI Conferência Nacional de Saude, Brasília, 1-5:311-315, 1977.
- PARAENSE, W.L. **The schistosome vectors in the Americas**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96, suppl.:7-16, 2001.
- PATZ, J.A.; CHRISTENSON, M. **El cambio climático y la salud. In: determinantes ambientales y sociedades de la salud**. México: Organización Panamericana de la Salud, p.215-32, 2010.
- PEDERSEN, U.B.; MIDZI, N.; MDULUZA, T.; SOKO, W.; STENSGAARD, A.S.; VENNERVALD, B. J.; KRISTENSEN, T.K. **Modelling spatial distribution of snails transmitting parasitic worms with importance to human and animal health and analysis of distributional changes in relation to climate**. Geospatial Health. 8(2):335-343, 2014.
- PERON, A.F.; PIROLI, E.L. **Projeto APPs: Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo, CEDIAP-GEO**. Centro de Estudo e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento 1th ed. 23 p., 2011.
- PHILLIPS, S.J.; ANDERSON, R.P.; SCHAPIRED, R.E. **Maximum entropy modeling of species geographic distributions**. Ecological Modelling. 190:231-259, 2006.
- PHILLIPS, S.J.; DUDÍK, M. **Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation**. Ecography. 31:161-175, 2008.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; MORAES, L.V.C.; CORREA, R.R.; TAKAKU, L.; PINTO, A.C.M. **Carta Planorbídica do Estado de São Paulo**. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo. Campanha de Combate à Esquistossomose, 1972.
- R Development Core Team version 3.2.2. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2015.
- QUINN GP, KEOUGH MJ. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge University Press, Melbourne, 2002.
- RENNÓ, C.D.; A.D. NOBRE, L.A CUARTAS, J.V. SOARES, M.G. HODNETT, J. TOMASELLA M.J. WATERLOO. **HAND, a new terrain descriptor using SRTM-DEM: Mapping terra-firme rainforest environments in Amazonia**. Remote Sensing of Environment 112: 3469-81, 2008.

- REY, L. **Primeiro encontro de planorbídeos naturalmente infestados por furcocercárias de *S. mansoni* no planalto paulista (Ourinhos)**. Rev Clín Sao Paulo. 28:57-64, 1952.
- ROCHA, O.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; RIETZLER, A.C.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. **Animal Invaders in São Paulo State Reservoirs**. Oecologia Australis, 15(3):631-642, 2011.
- RUMI, A.; VOGLER, R.E.; BELTRAMINO, A.A. **The South-American distribution and southernmost record of *Biomphalaria peregrina*- a potential intermediate host of schistosomiasis**. PeerJ. 5:3401, 2017.
- SAFRE, A.L.; MANZIONE, R.L. **Estimativa da precipitação na bacia do Rio Pardo no verão 2013/14 e seus efeitos nos municípios da UGRHI – 17**. Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, João Pessoa-PB, Brasil, 25 a 29 de abril de 2015, INPE, 2015.
- SCHOLTE, R.G.C.; CARVALHO, O.S.; MALONE, J.B.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. **Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* in Brazil**. Geospat. Health 6, S95–S101, 2012.
- SNSA, 2017. **Agrupamento dinâmico de indicadores e informações municipais por ano de referência**. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2017 [updated 2019]. Disponível em: <http://app.cidades.gov.br/serieHistorica/>.
- ROSSI, M. **Mapa Pedológico do estado de São Paulo: Revisado e Ampliado**. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, 1:118, 2017. Disponível em: <http://iflorestal.sp.gov.br/2017/09/26/mapa-pedologico-do-estado-de-sao-paulo-revisado-e-ampliado/>
- SMA. **Rede de drenagem do Estado de São Paulo obtida a partir da base do gisat (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental**. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/mapa-da-rede-de-drenagem-do-estado-de-sao-paulo/>
- STENSGAARD, A.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P.; HÜRLIMANN, E.; SCHUR, N.; SAARNAK, C.F.L.; MUSHINGE, G.; SIMOONGA, C.; KABATEREINE, N.B.; TCHUEM TCHUENTÉ, L.; RAHBEK, C.; KRISTENSEN, T. K. **Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter?**. Acta Trop. 128:378–390, 2013.
- STENSGAARD, A.S.; VOUNATSOU, P.; SENGUPTA, M.E.; UTZINGER, J. **Schistosomes, snails and climate change: Current trends and future expectations**. Acta tropica. 190:257-268, 2019.
- SUCEN. **Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 2009-2012**. Serviço Regional 11 - Marília. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias. 2012.
- TELES, H.M.S. **Aspectos ecológicos de *Biomphalaria* (Preston, 1910) (Basommatophora, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. I. Sintopia**. Ciência e Cultura. 40:374-378, 1988.
- TELES, H.M.S. **Distribuição de *Biomphalaria tenagophila* e *B. occidentalis* no Estado de São Paulo (Brasil)**. Revista de Saúde Pública. 23:244-253, 1989.
- TELES, H.M.S.; VAZ, J.F. **Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil**. Rev. Saúde Pública. 21(6):508-512, 1987.
- TELES, H.M.S. **Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical, Brasil**. Revista de Saúde Pública. 30:341-9, 1996.
- TELES, H.M.S. **Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo**. Rev. Soc. Bras. Méd. Trop. 38(5):426-432, 2005.
- TUAN, R. **Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, SP, Brasil**. Biota Neotrop. 9(1):279-283, 2009.
- 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**. In: Schistosomiasis. Tehran, Iran, Intech, 2012.
- VALERIANO, M.M.; ROSSETTI, D.F. 2011. **Topodata: Brazilian full coverage refinement of SRTM data**. Applied Geography, 32:300-309. Disponível em: <http://www.dsr.inpe.br/topodata>
- VAZ, J.F.; MANTEGAZZA, E.; TELES, H.M.S.; LEITE, S.P.S.; MORAIS, L.V.C. **Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo (Brasil): 4a. Região Administrativa**. Rev. Saúde públ., S. Paulo. 21:371-79. 1987.

- Vaz JF, **Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda-Pulmonata)**. São Paulo, Ciênc. cult. 41(1):14-27, 1989.
- WOODRUFF, D.S.; MULVEY, M.; YIPP, M.W. **Population genetics of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong: a neotropical schistosome-transmitting snail recently introduced into China**. Journal of heredity. 76(5):355-360, 1985.
- YANG, Y.; CHENG, W.; WU, X.; HUANG, S.; DENG, Z.; ZENG, X. & ZHOU, Y. **Prediction of the potential global distribution for *Biomphalaria straminea*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni***. PLoS neglected tropical diseases. 12(5),e0006548, 2018.
- ZABURLÍN, N.M.; VOGLER, R. E.; MOLINA, M. J.; LLANO, V. M. **Potential distribution of the invasive freshwater dinoflagellate *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans (Dinophyta) in South America**. Journal of Phycology, 52(2): 200-208, 2016.
- ZUUR, A.T.; LUNDBYE-JENSEN, J.; LEUKEL, C.; TAUBE, W.; GREY, M.J.; GOLLHOFER, A.; NIELSEN, J.B. **Contribution of afferent feedback and descending drive to human hopping**. J Physiol 588 (5):799–807, 2010.
- XIMENES, A.C. **Mapas auto-organizáveis para a identificação de ecorregiões do interflúvio Madeira-Purus: uma abordagem da biogeografia ecológica**. (INPE-15332-TDI/1372). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos. 155, 2008. Disponível em: <http://urlib.net/sid.inpe.br/mtc-m18@80/2008/08.18.14.02>.

6.4 MANUSCRITO 4: Diversidade genética de espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) do Médio rio Paranapanema, São Paulo, Brasil. Não publicado.

Raquel Gardini Sanches Palasio^{1,2}, *Francisco Chiaravalotti-Neto*², *Roseli Tuan*¹.

¹Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, 01027-000, Luz, SP, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública - USP, 01255-000, Pinheiros, SP, Brasil. E-mail: raquelpalasio@usp.br

6.4.1- RESUMO

A região do médio rio Paranapanema no estado de São Paulo é reconhecidamente uma área de alta biodiversidade de espécies de *Biomphalaria*. O objetivo de estudo é analisar a diversidade genética das espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* que colonizam ecossistemas de água doce na região da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. Os caramujos foram coletados em córregos de cinco municípios da região: Assis, Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul e Chavantes. Foram utilizadas 468 sequências obtidas por amplificação de dois genes mitocondriais (COI: 275 sequências e rRNA16S: 193 sequências). As sequências alinhadas COI, 16S e COI+16S foram submetidas à análise filogenética por máxima verossimilhança. A distribuição geográfica da diversidade genética do gene 16S rRNA em haplótipos, analisada por meio do Programa QGIS, serviu como base para a análise da estruturação genética populacional de *Biomphalaria*. A análise filogenética mostrou árvores com cinco ramos monofiléticos com alto suporte estatístico. A diversidade de haplótipos está distribuída de forma diferente em cada um dos cinco *taxa* analisados. A AMOVA mostrou que as taxas de diferenciação genética estão relacionadas com diferenças individuais de caramujos em uma mesma coleção hídrica ou região geográfica. Não existem evidências de estruturação genética das populações a partir de isolamento geográfico.

Palavras-chave: *Biomphalaria*, mtDNA, diversidade haplotípica, análise espacial.

Palasio, R. G.S; Chiaravalloti-Neto F. & Tuan, R. **Genetic diversity of species of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) of the Middle Paranapanema River, São Paulo, Brazil. unpublished.**

6.4.2- ABSTRACT

The Middle region of the Paranapanema river in São Paulo is known for its high biodiversity in *Biomphalaria* species. This study aims to analyze the genetic diversity of species of snails of the genus *Biomphalaria* that colonize freshwater ecosystems in the region of the Paranapanema watershed, São Paulo, Brazil. The snails were collected in streams of five municipalities of the region: Assis, Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul and Chavantes. A total of 468 sequences obtained by amplification of mitochondrial genes (COI: 275 sequences and rRNA 16S: 193 sequences) were used. The aligned sequences COI, 16S and COI + 16S were submitted to phylogenetic analysis by maximum likelihood. Geographic distribution of the genetic diversity of the gene 16S rRNA in haplotype individuals, analyzed in QGIS Software, was used as baseline for the analysis of population genetic structuring of *Biomphalaria*. The phylogenetic analysis shows trees with 5 monophyletic branches with high statistical support. The haplotype diversity is distributed differently in each of the five analyzed taxa. AMOVA shows that the genetic differentiation rate is related to individual characteristics of snails in the same water collection or geographic region. There is no evidence of genetic structuring of the populations from geographic isolation.

Key words: *Biomphalaria*, mtDNA, haplotype diversity, spatial analysis.

6.4.3- INTRODUÇÃO

Os ecossistemas continentais de água doce do Sudeste Brasileiro estão associados com uma das maiores riquezas de espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* na região Neotropical (MALTCHIK et al., 2010; LATINI et al., 2016). Das onze espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* descritas no Brasil, oito colonizam coleções de água doce das principais bacias hidrográficas do estado de São Paulo (TEODORO et al., 2010, OHLWEILER et al., 2010). A região do Médio Paranapanema, uma das importantes áreas endêmicas de esquistossomose do Estado (PIZA e RAMOS, 1960; SILVA, 1985) é caracterizada por altos índices de urbanização e transformações antrópicas (CHMYZ, 1967; JUNK et al., 2013; MALTCHIK et al., 2010).

Nesta região são encontradas *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848), as três espécies em que se desenvolvem as cercárias do parasita *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, trematódeo que infecta o homem causando a esquistossomose. Além dessas espécies, foram reportadas no Médio Paranapanema *B. occidentalis* (Paraense, 1981) e *B. peregrina* (Orbigny, 1835) (PIZA et al., 1972; TELES e VAZ, 1987; TELES, 1988; TELES, 2005, TUAN, 2009).

A taxonomia e sistemática de caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria* extrapolam os limites do conhecimento acadêmico, devido à importância deste grupo para a saúde pública, sendo por este motivo, a prática taxonômica pré-requisito para ações de monitoramento e controle de doenças. Fato é que erros de identificação são comuns, demonstrando que a identificação baseada exclusivamente na anatomia dos caramujos é insuficiente para responder as questões de natureza taxonômica.

A dinâmica populacional de *Biomphalaria* é um aspecto crítico na modelagem e controle da esquistossomose e está relacionada com a drenagem dos sistemas de água doce, ecologia e adaptações dos caramujos ao ambiente aquático. A fragmentação dos habitats naturais de *Biomphalaria*, somada à capacidade fisiológica (TUAN e SIMOES, 1989; TELES e MARQUES, 1989) e reprodutiva dos caramujos (ESCOBAR, 2011) em sobreviver às variações demográficas são fatores que podem explicar a estruturação da variabilidade genética total de *Biomphalaria* em grupos de sequências mitocondriais e nucleares geneticamente diferenciadas (MULVEY e VRIJENHOEK, 1982; LANGAND et al., 1999; MAVÁREZ et al., 2002; TUAN e SANTOS, 2007; TUAN et al., 2012).

Os polimorfismos de nucleotídeos do gene mitocondrial 16S rRNA em *Biomphalaria* sugerem que a variabilidade genética total dentro de uma espécie está fracionada em linhagens

indiferenciadas amplamente distribuídas no espaço geográfico e linhagens diferenciadas encontradas em áreas específicas (DEJONG et al., 2001; TUAN et al., 2012; STANDLEY et al., 2014).

Genes mitocondriais são adequados para investigar aspectos populacionais de *Biomphalaria* (CAMPBELL et al., 2010; RUMI et al., 2017), além de dar suporte aos estudos taxonômicos (PALASIO et al., 2017).

Os dados genéticos, associados aos sistemas de informações geográficas (SIGs) constituem ferramentas de análise que trazem novas perspectivas de compressão da distribuição geográfica e espacial de caramujos. Especialmente a análise espacial, permite indexar dados biológicos e dados de coleta numa mesma plataforma de análise, muito mais precisa e detalhada (STANDLEY et al., 2014). Compreender a distribuição de *Biomphalaria* nestas áreas onde a história natural dos caramujos está sendo constantemente modificada devido às ações humanas pode aumentar nossa capacidade de desenvolver modelos preditivos de risco da esquistossomose.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar as variações nos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase I e 16S rRNA para caracterizar a diversidade taxonômica e populacional de espécies do gênero *Biomphalaria* que colonizam ecossistemas de água doce na região da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.

6.4.4- MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo abrange coleções hídricas circunscritas geograficamente aos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Ribeirão do Sul, Assis e Chavantes localizados na região da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema. Espécimes de caramujos em 65 coleções hídricas de água doce, no total de 143 pontos, no período de 2015 a 2018 (Figura 1), foram coletados e analisados conforme técnicas malacológicas descritas nas normas para vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). A metodologia compreende a coleta de amostras de caramujos em pontos espalhados em uma coleção hídrica e caracterização em laboratório das espécies a partir de subamostras entre 5-10 caramujos de cada ponto de coleta amostrado. As coordenadas geográficas de cada local de coleta foram tomadas por aparelho GPS Garmin ®Etrex, com margem de erro exato de +/- 3,6 metros (12 pés), para subsidiar a análise espacial da distribuição dos caramujos (Tabela 1).

Os espécimes de *Biomphalaria* das amostras coletadas foram dissecados (DESLANDES, 1959) e identificados por meio de características morfológicas do aparelho reprodutor, conforme PARAENSE (1975 e 1981). De um mesmo exemplar foi retirada uma porção inferior do pé (cefalopodal), para a extração de DNA, enquanto o restante do exemplar foi utilizado para a identificação morfológica conforme protocolo de PALASIO et al. 2019.

O DNA genômico de cada animal foi submetido à amplificação dos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase I (COI) e 16S rRNA, conforme protocolos descritos em PALASIO et al. (2017) e TUAN et al. (2012), respectivamente. Para amplificação do COI foi utilizado o par de primers de FOLMER et al. (1994) e para 16S rRNA de PALUMBI et al. (1991). Os produtos amplificados foram sequenciados no sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems®), no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan.

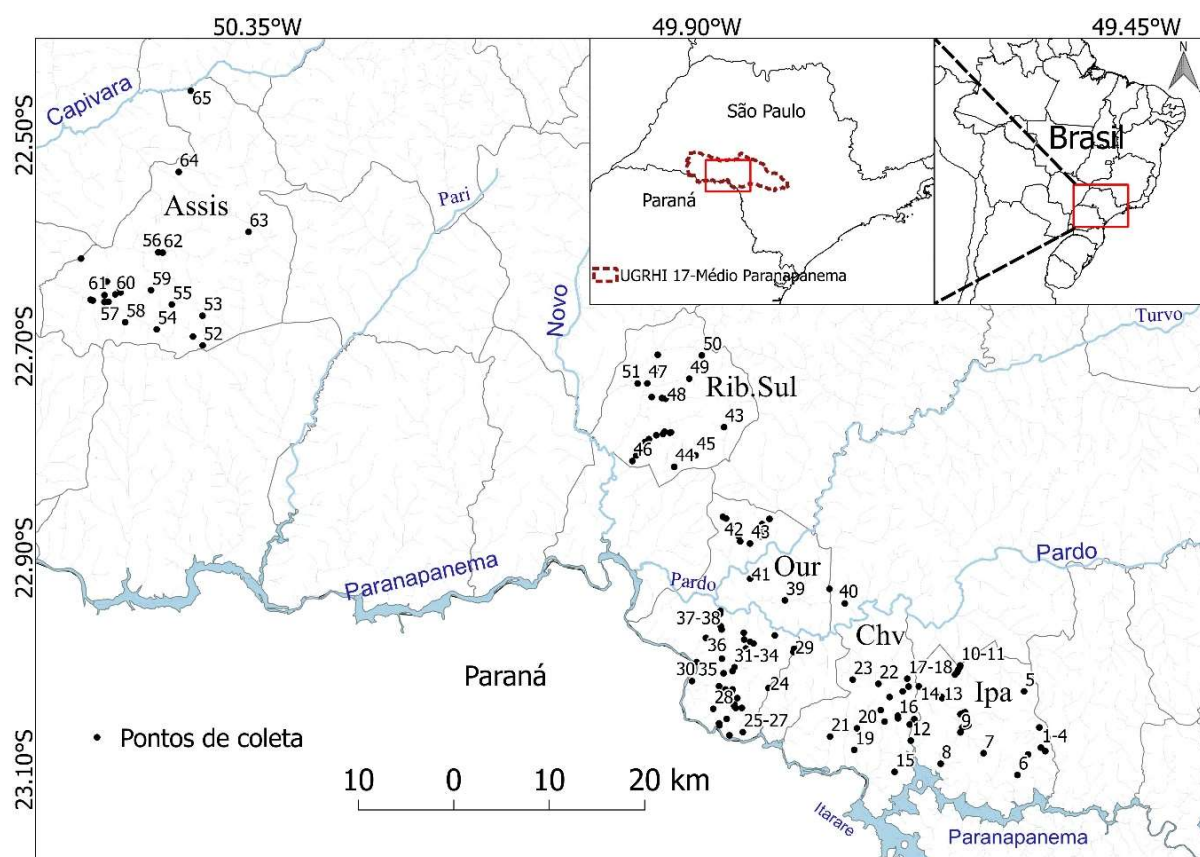


Figura 1 - Pontos de coletas de *Biomphalaria* em 65 coleções hídricas, no período de 2015-2018 nos municípios de Ourinhos, Ipaussu, Chavantes, Ribeirão do Sul e Assis na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. * números corresponde às coleções hídricas, tabela 1.

Tabela 1 - Coordenadas dos pontos de coleta nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. Código GenBank de 275 seqüências de COI e 193 seqüências de rRNA16S.

* Município da amostra: Ipaussu: 1-14; Chavantes: 15-23; Ourinhos: 24-43; Ribeirão do Sul: 43-51; Assis: 52-65. ** Código: em negrito=Apenas seqüência de COI, em azul=Apenas seqüência de16S, restantes com ambos os genes. Linha tracejada = divisão das coleções abaixo no rio pardo 1-38 e acima 39-65

Nº*	LOCAL	LATITUDE	LONGITUDE	GENBANK		CÓDIGO DO ESPÉCIME **
				COI	rRNA16S	
1	Douradão	-23.082450	-49.543300		MK583964	Bp46IP1
2	Virtuosa	-23.060067	-49.549417		MK583965	Bp47IP2
3	Pau D'Alho	-23.079100	-49.547817	MK395801	MK583966	Bp9IP3, Bp48IP3
4	Água Úmida	-23.085533	-49.560900	MK395802	MK583967	Bp33IP4, Bp33IP4
5	Palmeiras	-23.025950	-49.565017	MK395803	MK583968	Bp7IP5
6	Lambari	-23.104900	-49.571800		MK583969	Bp49IP6
7	Santa Hermínia	-23.084400	-49.606533		MK583970	Bp50IP7
8	Faz. Boa Vista	-23.094333	-49.650417	MK395804-05	MK583971-72	Bs5IP8, ma3IP8Bs
		-23.059556	-49.626778	MK395806-09	MK583973-76	Bt17-18, 28, 32IP8
		-23.058889	-49.623722	MK395810-14	MK583977-81	Bt5-6, 13, 27, 34IP8
		-23.058028	-49.622028	MK395815-16	MK583982-83	ma2IP8Bp, ma15IP8Bt
		-23.064750	-49.630250	MK395817-20	MK583984-86	Bt20, 26IP9, Bt38, 42IP9, Bt47IP9
		-23.060083	-49.628333	MK395821-23	MK583987-88	Bt36IP9, Bsp32IP9Bo, Bt41IP9
9	São Luiz, Sapo	-23.047528	-49.630250	MK395824-28	MK583989-90	Bt3-4IP9, Bt12, 31IP9, ma18IP9Bt
		-23.046556	-49.627528	MK395829-32	MK583991-93	Bt21, 23-24IP9, Bt40IP9
		-23.045750	-49.625250	MK395833	MK583994	Bsp23IP9Bp
10	Mombuca	-23.001500	-49.630433	MK395834	MK583995	Bo19IP10
		-23.002883	-49.630583	MK395835-36	MK583996-97	Bo20IP10, Bsp33IP10
11	Mombuquinha	-23.005733	-49.632400	MK395837-38	MK583998	Bsp28IP11Bt, Bt46IP11
		-23.008033	-49.633700	MK395839-40	MK583999	Bsp24IP11Bp, Bp13IP11
12	Barranco Vermelho	-23.010217	-49.635800	MK395841-43	MK584000-03	Bp5, 34IP11, ma16IP11Bt, Bp51IP11
		-23.072517	-49.681050	KX354442, MK395844-47	MK584004-06	Bp3, 8, 12IP12, Bp2, 31IP12
		-23.057333	-49.682083	MK395848-49	MK584007	Bt35IP12, Bp11IP12
		-23.052283	-49.677467	KX354441, MK395850	MK584008-09	Bp4, 37IP12
13	Ribeirão Grande	-23.032350	-49.648867	MK395851-54	MK584010	Bt15IP13, Bt29, 45IP13, Bp41IP13
		-23.031267	-49.649600	MK395855-57	MK584011-12	Bt14, 33IP13, ma12IP13Bt
		-23.031400	-49.650567	MK395858-63	MK584013-17	Bt1-2, 7, 11, 16IP13, ma13IP13Bt
14	Boa Vista (Divisa)	-23.029617	-49.653433	KX354440, MK395864-65	MK584018-19	Bt39IP13, Bsp25IP13Bp, Bp32IP13
		-23.021400	-49.672833	MK395866	MK584020	Bt30IP14
15	Ribeirão Bonito	-23.101983	-49.697600	MK395867-68	MK584021	Im7CV15Bo, Im6CV15Bo
		-23.054567	-49.707883	MK395869		ma30CV15Bo
		-23.051450	-49.694083	MK395870		Bsp49CV16Bo
		-23.048983	-49.694250	MK395871-72	MK584022	Im4CV16Bo, Im5CV16Bo
		-23.031383	-49.702767		MK584023	Bp52IP17
		-23.026033	-49.689300	MK395873-76	MK584024-25	Bo6CV17, Bsp15CV17Bo, ma24-25CV17Bo
		-23.021483	-49.683233	MK395877-82	MK584026-30	Bt8-10, 22, 25CV17, Bt44CV17
		-23.014033	-49.684667	MK395883-84	MK584031	ma26CV18Bt, ma27CV18Bt
		-23.081233	-49.738933	MK395885-86	MK584032	Bsp47CV19Bp, Bsp48CV19Bp
		-23.060900	-49.736117	MK395887	MK584033	Bs1CV20
20	Colossinho	-23.043700	-49.711800	MK395888-89	MK584034-35	Bp6CV20, ma8CV20Bo
		-23.068683	-49.763700	MK395890	MK584036	Bo48CV21
22	Ag. Morna	-23.018850	-49.714133	MK395891-92	MK584037	ma28CV22Bo, ma29CV22Bo
23	Ag. coqueiros	-23.014950	-49.740517	MK395893-95	MK584038	Bp29CV23, Bp28, 30CV23
24	Lageadinho	-23.022833	-49.826733	MK395896-98	MK584039	Bsp34OU24Bg, Bsp35OU24Bg, Bg17OU24
		-23.064467	-49.853000	MK395899-901		Bo31OU25, ma21-23OU25Bo
		-23.041633	-49.853950	MK395902		Bsp36OU25Bo
		-23.041650	-49.860233	MK395903	MK584040	Bg16OU25
		-23.039750	-49.861900	MK395904		Bo29OU25
		-23.038333	-49.861400	MK395905	MK584041	Bo62OU25
		-23.032400	-49.858617	MK395906	MK584042	Bsp37OU25Bt
		-23.027467	-49.864867	MK395907-908	MK584043-44	Bg14-15OU25
		-23.025063	-49.863847	MK395909	MK584045	Bs6OU25
		-23.024133	-49.863600	MK395910	MK584046	Bp16OU25
26	Café	-23.067500	-49.866617	MK395911	MK584047	Bo32OU26
		-23.058017	-49.876933	MK395912	MK584048	Bo30OU27
27	Japoneses	-23.056117	-49.877333	MK395913-14	MK584049	Bp20OU27, Bp18OU27
		-23.052000	-49.869517	MK395915		Bp17OU27
28	Canaã	-23.042533	-49.883267	MK395916	MK584050	Bp15OU28
		-22.988750	-49.801167	MK395917	MK584051	Bt43OU29
29	Barreirinha	-22.987583	-49.800600	MK395918-19	MK584052	Bp23OU29, Bp24OU29
		-22.985800	-49.800517	MK395920	MK584053	ma20OU29Bt
		-23.016306	-49.905000	MK395921-26	MK584054-56	Bsp1-2, 21OU30Bo, Bo23, 25, 28OU30
30	Jacu	-23.021167	-49.877278	MK395927-30	MK584057-58	Bo5OU30, Bt19OU30, Bo22, 27OU30
		-23.024183	-49.870817	MK395931-32		ma33-34OU30Bo
		-23.008944	-49.872750	KX354436, KX354434, MK395933-34	MK584059-60	Bsp26-27OU30Bg, Bg6, 13OU30
31	Jacuzinho	-23.006889	-49.863528	KX354444, MK395935-36	MK584061	Bsp19OU30Bp, Bp10, 14OU30
		-23.003194	-49.861500	KX354443, MK395937	MK584062	Bsp22OU30Bp, Bp11OU30
32	Furnas	-22.995111	-49.874333	MK395938	MK584063	Bsp18OU31Bs
		-22.980783	-49.842067	MK395939-41	MK584064-66	Bo11-12OU32, Bsp29OU32Bo
32	Furnas	-22.979222	-49.845389	MK395942-44	MK584067-69	Bsp30OU32Bo, ma6, 9OU32Bo
32	Furnas	-22.970617	-49.852000	MK395945-47	MK584070-71	Bo18OU32, Bsp31OU32Bo, Bsp40OU32Bo

OURINHOS	33	Sao Joaquim	-22.973133	-49.820267	MK395948	MK584072	Bp25OU33
	34	Furminhas	-22.985556	-49.849972	MK395949-51	MK584073	Im3OU34Bt, Bsp20OU34Bt, ma11OU34Bo
	35	Monjolinho	-22.977056	-49.851667	MK395952-54	MK584074-75	ma14OU34Bo, Bsp3OU34Bo, Bo24OU34
	36	Chumbiadinha	-22.998333	-49.900278	MK395955-56	MK584076	Bsp17OU35Bo, Bo49OU35
			-22.975483	-49.890850	MK395957-60	MK584077-78	Bo1, 21OU36, Bo4, 26OU36
			-22.967600	-49.874683	KX354433, MK395961-66	MK584079-80	Bg4OU37, Im2OU37Bg, Im1OU37Bg, Bg8-10, 42OU37
	37	Christoni	-22.964467	-49.875633	MK395967-68	MK584081	Bo15OU37, Bo16OU37
			-22.952833	-49.876333	MK395969-74, KX354437-38	MK584082-86	Bg1, 3, 7OU37, ma1, 10OU37Bo, Bg2, 11-12OU37
			-22.950050	-49.875850	KX354435, MK395975-76	MK584087-88	Bo17OU37, ma4OU37Bg, Bg5OU37
	38	Ag. da Veadia	-22.953222	-49.878306	MK395977-88	MK584089-99	Bsp5-11, 13OU38Bo, Bsp16OU38Bs, Bol3-14OU37, Bsp12OU38Bo
RIBEIRÃO DO SUL	39	Usina Sao Luiz	-22.940050	-49.809950	MK395989	MK584100	Bo43OU39
			-22.929217	-49.764217	MK395990-91		Bo40-41OU39
	40	Faz. Jaquarere	-22.942983	-49.748633	MK395992	MK584101	Bo42OU40
	41	Asa Branca	-22.919556	-49.845508	MK395993-94	MK584102-03	Bp21-22OU41
			-22.884333	-49.855633	MK395995		Bo37OU42
			-22.879600	-49.857267	MK395996	MK584104	ma19OU42Bo
	42	Fundo	-22.876783	-49.858283	MK395997		Bsp38OU42Bo
			-22.869083	-49.865350	MK395998		Bo36OU42
			-22.862717	-49.870083	MK395999		Bo35OU42
			-22.861133	-49.873417	MK396000-01	MK584105	Bo34OU42, Bo33OU42
			-22.886367	-49.845650	MK396002		Bsp43OU43Bo
			-22.876200	-49.837750	MK396003	MK584106	Bo39OU43
			-22.870717	-49.834083	MK396004	MK584107	Bsp41OU43Bp
	43	Ribeirão Grande	-22.867917	-49.833267	MK396005	MK584108	Bo38OU43
			-22.863067	-49.825700	MK396006	MK584109	Bp19OU43
			-22.879583	-49.834433	MK396007		Bsp40OU43Bo
			-22.878050	-49.834300	MK396008	MK584110	Bsp39OU43Bo
	43	Ribeirão Grande	-22.776300	-49.872217	MK396009-10	MK584111	Bp26RB43, Bp27RB43
	44	Burguês	-22.813850	-49.923183	MK396011	MK584112-13	Bo2RB44, Bo59RB44
	45	Ag. do Cascavel	-22.802867	-49.901350	MK396012	MK584114	Bsp45RB45Bp
			-22.808367	-49.966117	MK396013		ma23RB46Bo
		-22.803083	-49.962167		MK584115	ma17RB46Bp	
		-22.796433	-49.960117	MK396014-15	MK584116	Bo46RB46, Bo47RB46	
		-22.781633	-49.927700	MK396016		Bsp44RB46Bo	
46	Ribeirão do Pinto	-22.790300	-49.953033	MK396017-19	MK584117-18	Bs3-4RB46, Bs7RB46	
		-22.787617	-49.949150	MK396020-21	MK584119-21	Bp53CV46, ma5RB46Bo, ma7RB46Bp	
		-22.783950	-49.941600	MK396022-23	MK584122	Bs2RB46, Bsp46RB46Bs	
		-22.782850	-49.934800	MK396024	MK584123	Bo10RB46	
		-22.780583	-49.933117	MK396025-26	MK584124-25	Bo3, 9RB46	
		-22.781150	-49.926533	MK396027-30	MK584126-27	Bo7-8RB46, Bo44-45RB46	
		-22.734850	-49.950800		MK584128	Bp54RB47	
47	Capim	-22.723650	-49.942667		MK584129	Bp55RB47	
		-22.722550	-49.942217		MK584130	ma35RB47Bp	
		-22.707817	-49.940100		MK584131	Bp56RB47	
		-22.749467	-49.931983		MK584132	ma36RB48Bp	
48	Matão	-22.748750	-49.935733		MK584133	ma37RB48Bp	
		-22.747833	-49.946317	MK396031-32	MK584134-35	Bs8RB48, Bsp14RB48	
49	Ag. da Boa Vista	-22.730467	-49.907850		MK584136	Bp57RB49	
50	Guariroba	-22.708367	-49.894967		MK584137	ma38RB50Bp	
51	Lagoa	-22.735033	-49.960667	MK396033	MK584138	Bs9RB51	
ASSIS	52	Cabiuna	-22.698967	-50.405933	MK396034-35	MK584139	Bsp51AS52Bo, Bsp50AS52Bo
			-22.690600	-50.415883	MK396036-37		Bo55-56AS52
	53	Jacu	-22.670850	-50.406117	MK396038-40	MK584140	Bo52AS53, Bo50-51AS53
	54	Freire	-22.683800	-50.453000	MK396041-42	MK584141	Bp35AS54, Bp36AS54
	55	Fortuninha	-22.660240	-50.437510	MK396043-44	MK584142	ma31AS55Bg, ma32AS55Bg
	56	Ag. do Óleo	-22.610850	-50.451410	MK396045-46	MK584143	Bo53AS56, Bo54AS56
			-22.657567	-50.502367	MK396047-48	MK584144	Bsp53AS57Bo, Bsp52AS57Bo
			-22.657900	-50.506517	MK396049-50	MK584145	Bo58AS57, Bo57AS57
	57	Fortuna	-22.656450	-50.518517	MK396051-52		Bp37-38AS57
			-22.655733	-50.520683	MK396053-54	MK584146	Bp40AS57, Bp39AS57
	58	Fortuninha2	-22.677017	-50.485283	MK396055	MK584147	Bsp54AS58Bp
	59	Paulista	-22.646640	-50.458840	MK396056	MK584148	Bsp55AS59Bp
			-22.650717	-50.495433	MK396057	MK584149	Bs11AS60
	60	Baixadão	-22.648800	-50.489983	MK396058		Bs10AS60
			-22.645400	-50.490810	MK396059-60	MK584150	Bsp56AS60Bs, Bsp57AS60Bs
61	Lagarto Verde	-22.651417	-50.506533	MK396061-62		Bp44-45AS61	
		-22.638550	-50.504017	MK396063-64	MK584151	Bp43AS61, Bp42AS61	
62	Ag. do Cerco	-22.611133	-50.446867		MK584152	Bo60AS62	
		-22.616750	-50.530500		MK584153	Bp58AS62	
63	Ag. Campestre	-22.591450	-50.359000		MK584154	ma39AS63Bo	
64	Ag. Capão Bonito	-22.534670	-50.430460		MK584155	ma40AS64Bo	
65	Mombuquinha	-22.457790	-50.418090		MK584156	Bo61AS65	

Os eletrocromatogramas dos genes COI e 16S rRNA foram visualizados e analisados em Chromas (Technelysium Pty Ltd.), alinhadas em MAFFT versão 7 (KATO et al., 2017) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) sob o parâmetro Q-INS-I altamente rigoroso; as sequências foram visualmente corrigidas em BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). As sequências foram analisadas individualmente no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para a obtenção dos valores de similaridade entre a sequência alvo e as sequências previamente depositadas no GenBank.

Para a análise da diversidade genética e filogenética foram usados grupos de sequências alinhadas dos genes COI e 16S rRNA (16S) além de um conjunto de sequências alinhadas comuns ao mesmo indivíduo com ambos os genes concatenado (COI + 16S), de animais previamente identificados morfologicamente, e as sequências de espécimes imaturos (Im) e com morfologia ambígua (ma). Para concatenar estas sequências foi usado o programa SeaView 4 (GOUY et al., 2010).

Os índices de polimorfismo genético dos genes COI, 16S rRNA e COI+ 16S rRNA foram calculados com o *software* DnaSP (LIBRADO e ROZAS, 2009). Os valores estimados de diversidade gênica e desvio padrão relacionados aos haplótipos mitocondriais (h , Hd), a diversidade de nucleotídeos (π) com correção Jukes-Cantor (Nei, 1987, equations 10.5) e o número médio de diferenças entre nucleotídeos entre pares de sequências (k).

As análises filogenéticas foram feitas com os três grupos de sequências (COI, 16S e COI+16S), mais duas sequências dos caramujos africanos das espécies *B. stanleyi* (Smith, 1888) e *B. choanomphala* (Martens, 1879) (DQ084850 e 58: 16S rRNA, HM768906 e DQ084837: COI), ambas utilizadas como *outgroup*.

A análise filogenética foi feita tendo como base o princípio de Máxima-Verossimilhança (ML) por algoritmos implantados no *software* PHYML3.2 (GUINDON e GASCUEL, 2003), que usa o método heurístico NNI para a obtenção da árvore inicial e busca exaustiva (SSR) para obtenção da árvore com maior valor de verossimilhança. Os valores de suporte para os ramos foram obtidos por método paramétrico *approximate Likelihood Ratio Test* (aLRT,) associado ao método não-paramétrico Shimodaira-Hasegawa (SH) (SHIMODAIRA e HASEGAWA, 1999; ANISIMOIVA et al., 2011). As análises foram feitas sob modelo *General Time Reversible* (GTR). As árvores obtidas foram visualizadas em Treeview (PAGE, 2001).

O banco de dados de sequências alinhadas do gene 16S rRNA foi utilizado para obtenção dos haplótipos mitocondriais em DnaSP. Os números de sequências de cada haplótipos mitocondriais foram associados aos dados de referência geográfica (Latitudes/longitudes

correspondentes) das 65 coleções de água doce, para a produção de mapas de diagramas do tipo gráfico a partir de seus atributos no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018). Os materiais cartográficos foram obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA) (IBGE, 2010ab; SMA, 2013).

O banco de dados de sequências 16S rRNA foi analisado quanto a distribuição da diversidade genética populacional (AMOVA) em *software* Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). A hipótese que exista uma estruturação genético-populacional, para isso foi testada em grupos de sequências 16S rRNA de espécies com haplótipos diferenciados. Foram testadas hipóteses de estruturação populacional relacionadas com a distribuição dentro de uma mesma área geográfica e entre sequências obtidas em coleções hídricas separadas (Em indivíduos dentro de coleções nas margens direita e esquerda do rio Pardo, para a espécie *B. peregrina* e *B. straminea*; e indivíduos dentro e fora da coleção hídrica de Christoni para a espécie *B. glabrata*). Para verificar a significância estatística foi efetuado uma análise de variância molecular (AMOVA). Esta análise foi feita após 1023 permutações dos dados de modo a simular a hipótese nula. Para estimar a diferenciação genética entre os grupos foi considerado baixa quando o que índice de fixação ($F_{st} = < 0,05$), moderado ($F_{st} = 0,05$ a $0,15$), alta ($F_{st} = 0,15$ a $0,25$) e muito alta ($F_{st} = > 0,25$) (WRIGHT, 1978).

6.4.5- RESULTADOS

6.4.5.1 Análise da diversidade genética e Filogenética dos genes COI, 16S rRNA e COI+16S.

A análise de diversidade genética dos genes COI, 16S e COI + 16S foi feita a partir de conjuntos de sequências alinhadas obtidas de *taxa* identificados via caracteres morfológicos e por similaridade do Genbank: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. occidentalis*, *B. straminea* e *B. peregrina*. Esses conjuntos de dados se referem a 275 sequências de COI (651pb), 193 sequências de rRNA 16S (426pb) e 169 sequências concatenadas dos genes COI e 16S (1077pb) (Tabela 2).

As sequências dos *taxa* *B. peregrina*, *B. glabrata* e *B. straminea* mostram valores significativos de diversidade genética que contrastam com a ausência ou baixa variabilidade de *B. occidentalis* e *B. tenagophila* (Tabela 2). A variabilidade dos genes COI, 16S e COI+16S em *B. peregrina* em função de K representa de 4-25% da variabilidade total destes genes nas demais espécies analisadas. O maior valor relacionado às diferenças de nucleotídeos (K) foi

obtido para os genes mitocondriais concatenados. Deste conjunto de sequências foram identificados 17, 16 e 22 haplótipos para o gene COI e rRNA16S e COI+16S, respectivamente.

Tabela 2 - Tabelas com os valores da análise de polimorfismo genético estimado para as 275 sequências de COI, 193 de 16S e 169 dos genes COI e 16S concatenados das espécies de *Biomphalaria*, identificadas por morfologia, nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, calculados em DnaSP

(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).

	mtDNA	N	S	h	Hd±VHd	Π	K
COI	<i>B. glabrata</i>	20	5	3	0.563±0.00401	0.00201	01.311
	<i>B. tenagophila</i>	58	0	1	0	0	0
	<i>B. occidentalis</i>	114	0	1	0	0	0
	<i>B. straminea</i>	18	13	2	0.471±0.00678	0.00940	06.118
	<i>B. peregrina</i>	58	63	10	0.817±0.00069	0.02785	18.128
	Total	275	140	17	0.771±0.00040	0.06564	42.732
16S	<i>B. glabrata</i>	13	3	3	0.603±0.00783	0.00207	00.821
	<i>B. tenagophila</i>	44	1	2	0.130±0.00433	0.00033	0.130
	<i>B. occidentalis</i>	70	0	1	0	0	0
	<i>B. straminea</i>	14	7	3	0.670±0.00670	0.00779	03.099
	<i>B. peregrina</i>	52	21	7	0.741±0.00160	0.01169	04.669
	Total	193	62	16	0.803±0.00040	0.05240	20.226
COI+16S	<i>B. glabrata</i>	13	8	4	0.679±0.08900	0.00225	02.359
	<i>B. tenagophila</i>	42	1	2	0.136±0.06800	0.00013	00.136
	<i>B. occidentalis</i>	65	0	1	0	0	0
	<i>B. straminea</i>	14	20	3	0.670±0.08200	0.00840	08.813
	<i>B. peregrina</i>	34	84	12	0.877±0.03200	0.02294	24.160
	Total	169	202	22	0.790±0.02400	0.05941	61.606

A análise filogenética feita com máxima verossimilhança (PhyML) com as 275 sequências COI, 193 16S rRNA e 126 concatenadas, produziram árvores com topologias similares (Figura 2-4). Foram recuperados cinco clados monofiléticos com alto suporte estatístico de Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT (Figura 2-4, ANEXO A VII e VII [pag. 190] com a análise filogenética das sequências identificadas apenas por morfologia). *Vis-à-vis*, os valores de suporte de ramos monofiléticos recuperados com os dois genes mitocondriais concatenados são significativamente superiores aos obtidos na análise de COI e 16S individualmente. Além da alta resolução para os ramos internos das árvores, é possível observar a razoável resolução para os ramos internos aos clados.

Politomias relacionadas com a ausência de polimorfismos genéticos em nós terminais da árvore são encontradas principalmente em *B. tenagophila* e *B. occidentalis* e uma alta diversidade de *B. peregrina* (Figura 2-4).

COI ML Log Likelihood of the tree -2072.64793

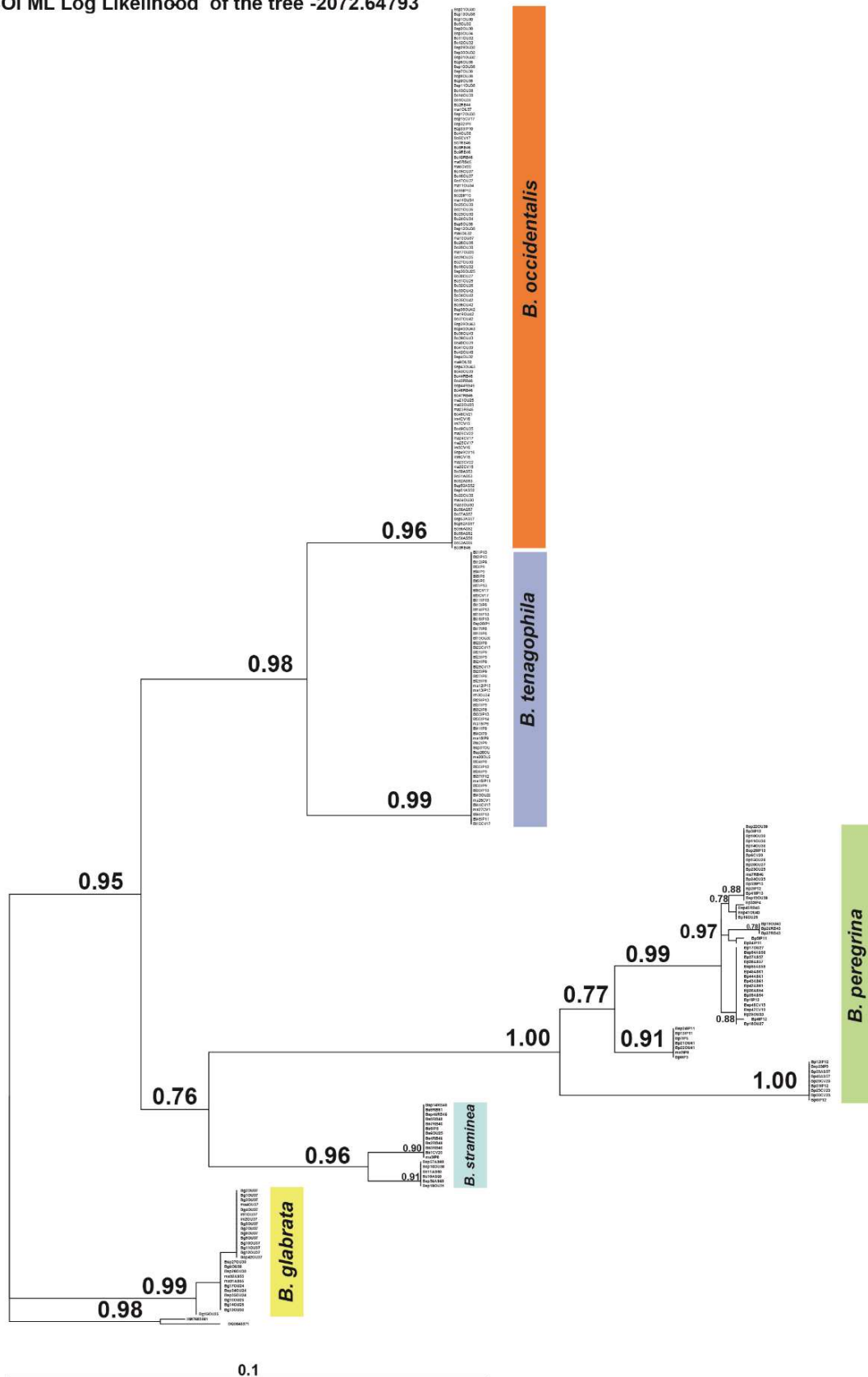


Figura 2 – Arvore filogenética de Máxima Verossimilhança com o alinhamento de 275 seqüências de COI de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas seqüências de *outgroup* sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira-Hasegawa [SH]-aLRT.

16S rRNA Log likelihood of the 16S tree: -1165.365042.

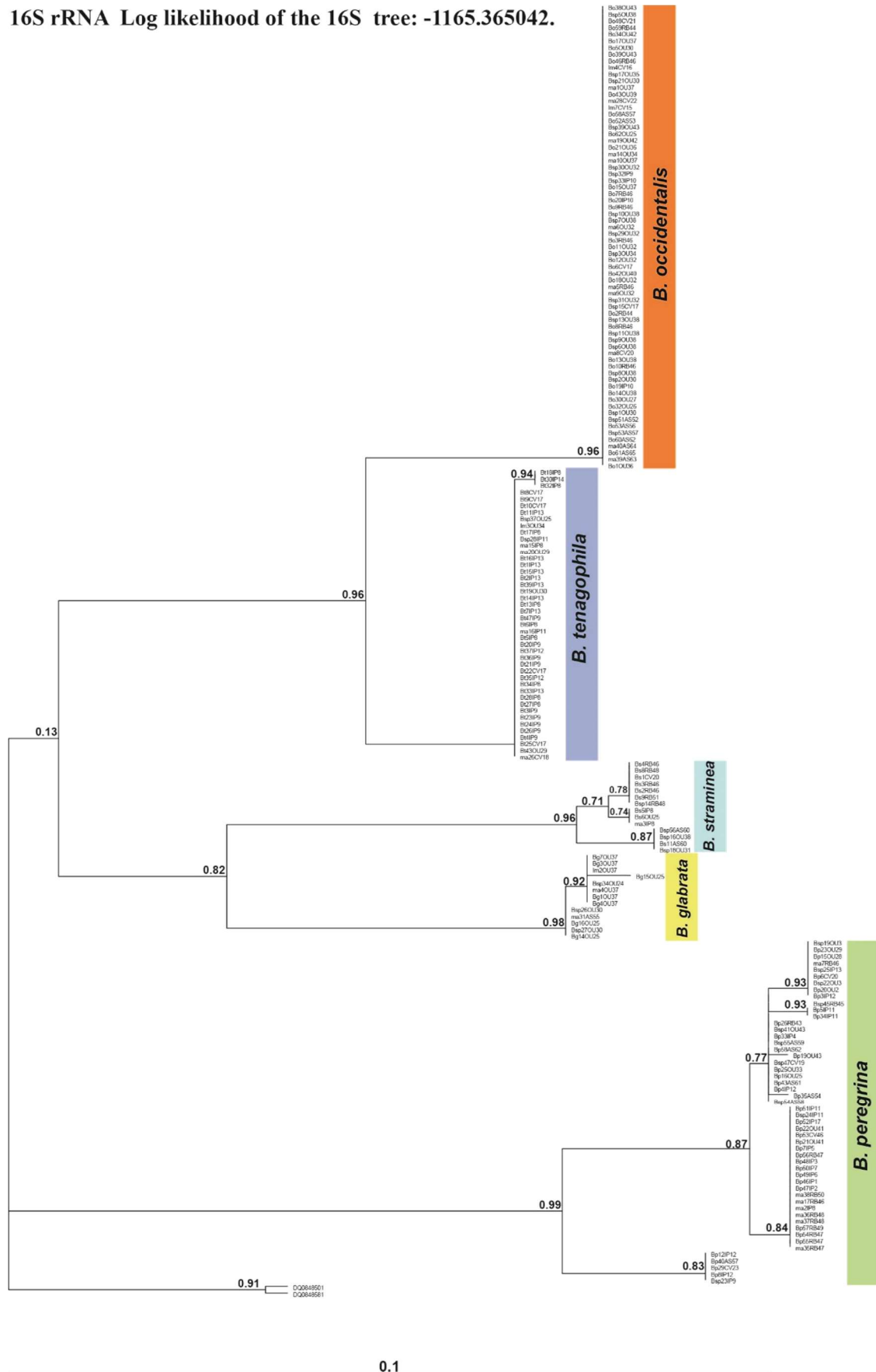


Figura 3 - Arvore filogenética correspondentes às 193 sequências rRNA16S de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletados em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018 e duas sequências de *Outgroup* obtidas por Máxima Verossimilhança e modelo de substituição de nucleotídeos GTR

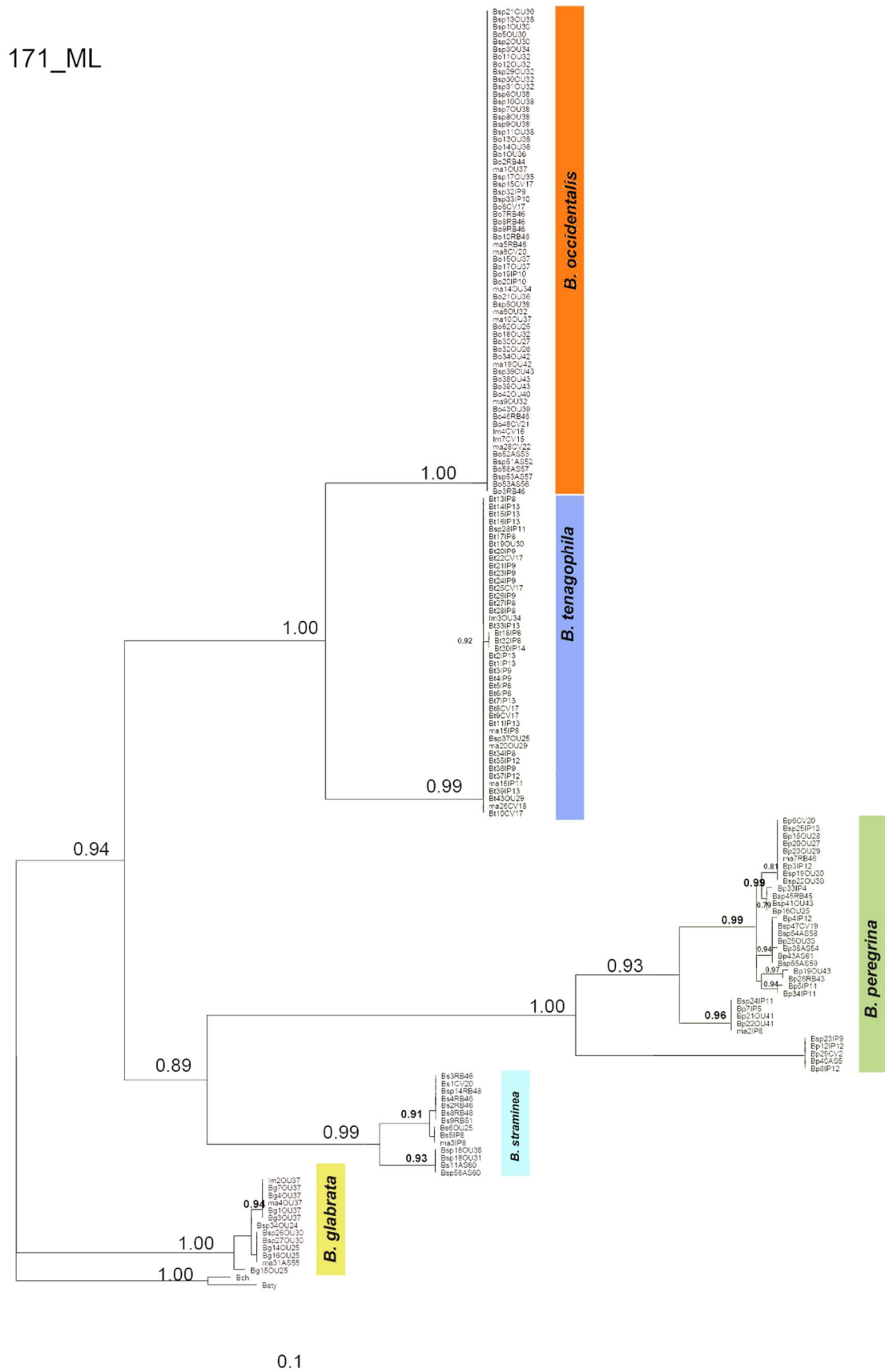


Figura 4 - Arvore filogenética construída por máxima verossimilhança para 169 seqüências concatenadas do gene de COI e 16S rRNA de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletados em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas seqüências do *outgroup*, sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT.

6.4.5.2 Estrutura genética populacional de *Biomphalaria* spp.

A análise da estrutura populacional das espécies de *Biomphalaria* identificadas no Médio Paranapanema foi feita a partir do padrão de diferenciação genética dos haplótipos de 193 sequências do gene mitocondrial 16S rRNA (Tabela 3, ANEXO B X, XI, pg. 215, do gene COI).

A distribuição dos haplótipos nas 65 coleções hídricas mostra um padrão diferenciado para as cinco espécies analisadas (Figura 5). *B. tenagophila* e *B. glabrata* mostram um padrão de distribuição de haplótipos mitocondriais focais, limitados às coleções hídricas de Ipaussu na primeira e na coleção hídrica de Christoni em Ourinhos na segunda. *B. occidentalis*, *B. peregrina* e *B. straminea* mostram um padrão de distribuição de haplótipos disseminado ao longo das coleções hídricas do Médio rio Paranapanema (Figura 5).

Tabela 3 - Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial rRNA16S calculados em DnaSP a partir de 193 sequências (123 sequências identificadas por morfologia e 70 sequências de indivíduos imaturas e morfologia ambígua) de caramujos do gênero *Biomphalaria*, coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.

CH*	Bo	Bt		Bg			Bs			Bp						
	H1	H1	H2	H1	H2	H3	H1	H2	H3	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
1																1
2																1
3																1
4												1				
5																1
6																1
7																1
8			8	2				2								1
9	1		9												1	
10	3															
11			2							2						2
12			2								1		1		2	
13			9								1					
14				1								1				
15	1															
16	1															
17	2		5													1
18			1													
19													1			
20	1								1			1				
21	1															
22	1															
23																1
24					1											
25	1		1		2	1		1					1			
26	1															
27	1											1				
28												1				
29			2									1				
30	4		1		2						2					
31								1								
32	8															
33													1			
34	2		1													
35	1															
36	2															
37	4				6											
38	10							1								
39	1															
40	1															
41																2
42	2															
43	3											1		1		
44	2												1			
45													1			
46	7								3		1					2
47																4
48									2							2
49																1
50																1
51								1								
52	1															
53	1															
54														1		
55					1											
56	1															
57	2														1	
58													1			
59													1			
60								2								
61													1			
62	1												1			
63	1															
64	1															
65	1															
TOTAL	70	41	3	7	5	1	4	3	7	2	9	1	12	1	5	22

* CH= Coleção Hídrica. Município de amostra: Ipaussu: 1-14; Chavantes: 15-23; Ourinhos: 24-43; Ribeirão do Sul: 43-51; Assis: 52-65. Bg=*B. glabrata*, Bs=*B. straminea*, Bt=*B. tenagophila*, Bo=*B. occidentalis*, Bp=*B. peregrina*.

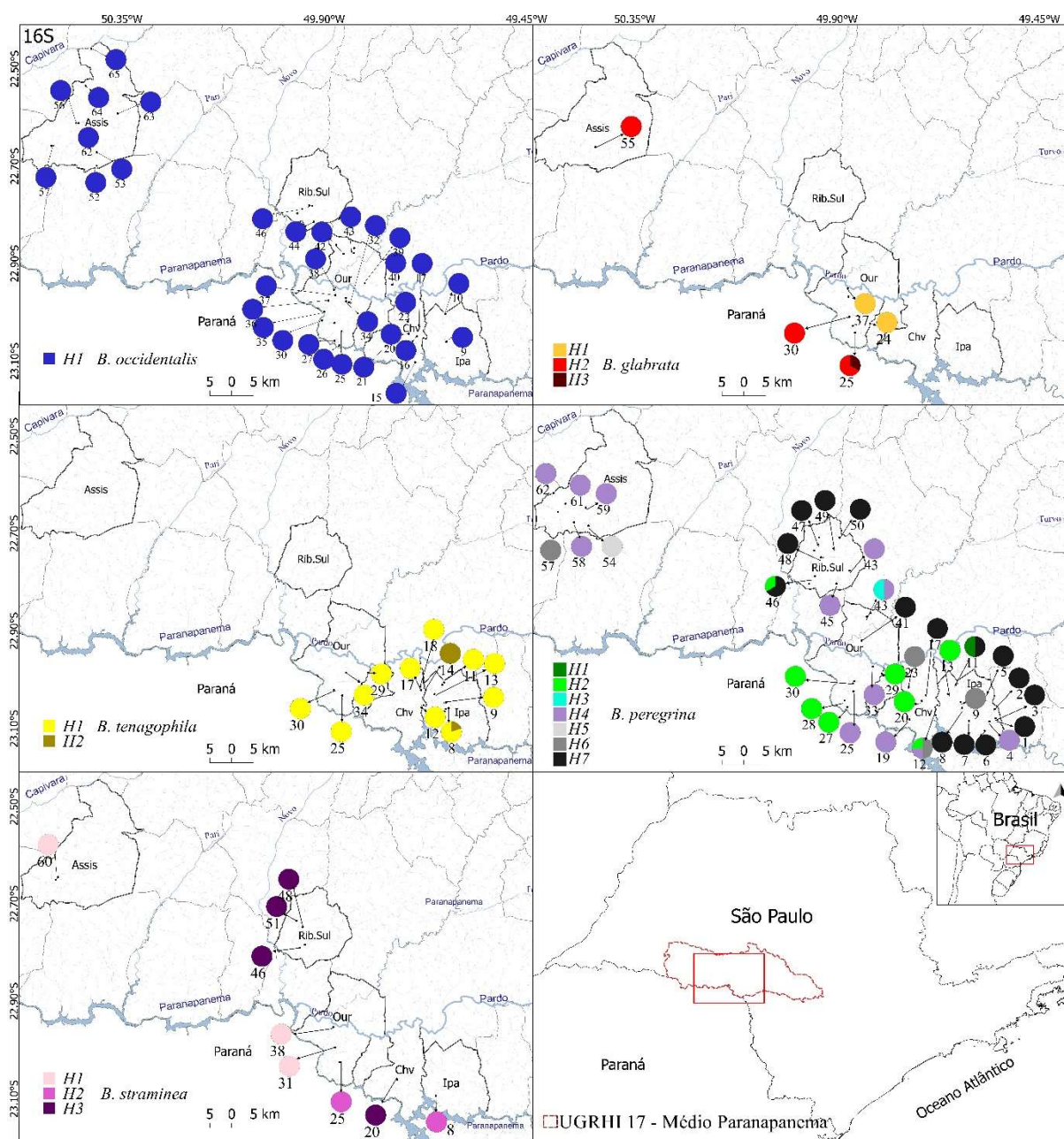


Figura 5 - Mapas da distribuição dos haplótipos do gene 16S rRNA gerados no DnaSP das espécies de *B. occidentalis*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. peregrina* nos municípios de Assis, Ribeirão do Sul (Rib. Sul), Ourinhos (Our), Chavantes (Chv) e Ipaussu (Ipa), São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.

A ausência de polimorfismo genético entre as sequências 16S rRNA de *B. tenagophila* e *B. occidentalis*, impossibilitou o uso das sequências destas espécies na análise genético-populacional. As diferenças encontradas na diversidade e distribuição geográfica dos haplótipos nos permitiu testar diferentes hipóteses sobre a estruturação genético-populacional de *B. peregrina*, *B. straminea* e *B. glabrata*. Para isso, foram usados diferentes bancos de dados.

Com o banco de dados de sequências alinhadas 16S rRNA de *B. glabrata* testamos a probabilidade de a estruturação genética estar relacionada com a colonização destas espécies nos cinco diferentes córregos, em que foram coletados os espécimes. Os bancos de dados de sequências 16S de *B. peregrina* e *B. straminea* foram usados para testar a hipótese da estruturação genética populacional ocorrer devido a separação das populações pelo rio Pardo.

Os resultados da AMOVA mostram que em *B. peregrina* e *B. straminea* 89-98% da variação genética ocorre indistintamente em ambas as margens do rio Pardo, não havendo, portanto, estruturação genética em subpopulações destas espécies baseada na barreira geográfica criada pelo rio Pardo. Em *B. glabrata*, existe fluxo gênico entre caramujos das coleções hídricas ($F_{st} = 0.30$), porém aproximadamente 70% da variação genética total da espécie está contida no córrego Christoni (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos de 16S entre e dentro das populacional de *B. peregrina*, *B. glabrata* e *B. straminea* coletadas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018.

(GL = Grau de liberdade, F_{st} = índice de fixação)

	AMOVA	GL	SQ	Componentes de variação	% Variação	<i>p</i> -valor
<i>B. peregrina</i>	Entre indivíduos das margens direita e esquerda do rio Pardo	1	6.177	0.06679 Va	1.47	0.0000
	Em indivíduos dentro de coleções nas margens direita e esquerda do rio pardo	50	223.169	4.46339 Vb	98.53	
	Total	51	229.346	4.53018		
	Fst			0.01474		
<i>B. glabrata</i>	Entre indivíduos de diferentes coleções hídricas	1	1.978	0.22573 Va	30.29	0.00391
	Em indivíduos do córrego Christoni	11	5.714	0.51948 Vb	69.71	
	Total	12	7.692	0.74521		
	Fst			0.30290		
<i>B. straminea</i>	Entre indivíduos das margens direita e esquerda do rio Pardo	1	4.214	0.28038 Va	10.90	0.01466
	Em indivíduos dentro de coleções nas margens direita e esquerda do rio pardo	12	27.500	2.29167 Vb	89.10	
	Total	13	31.714	2.57205		
	Fst			0.10901		

6.4.6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este estudo apresenta resultados genéticos e populacionais das três espécies hospedeiras intermediárias naturais do parasita *S. mansoni*, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, além de *B. occidentalis* e *B. peregrina*, esta última com potencial de infecção por *S. mansoni* em laboratório (PARAENSE e CORREA, 1973).

As reconstruções filogenéticas feitas com as sequências dos genes COI, e COI+16S rRNA por máxima verossimilhança mostram árvores com topologias similares, e maiores valores de suporte estatístico para o agrupamento das sequências em cinco ramos monofiléticos. O gene 16S rRNA retornou valores mais imprecisos em relação à *B. tenagophila* e *B. occidentalis*, taxa considerados filogeneticamente próximos (PARAENSE, 1984; SPATZ et al., 1999; CARVALHO et al., 2008) e menos consistentes em relação a *B. glabrata*, agrupada em 16S-ML num mesmo clado junto a *B. straminea*. Esses dados corroboram os resultados que mostram o limitado uso do gene 16S para análises filogenéticas em moluscos Gastropoda (FREY e VERMEIJ, 2008).

Resultados recentes mostram que ao longo do tempo ocorreram modificações na fauna planorbídica das coleções hídricas do médio rio Paranapanema, com substituição de populações de *B. tenagophila* por *B. occidentalis* e *B. peregrina*, duas espécies que hoje predominam na região (PALASIO et al., 2019).

Os resultados da AMOVA mostram que em *B. glabrata* a maior parte da variação genética total poderia ser explicada por variações individuais que ocorrem em caramujos que colonizam o córrego Christoni. A Figura 6, obtida a partir do cálculo de diferenças entre nucleotídeos em TCS (CLEMENT et al., 2000), mostra que a diversidade genética está particionada no espaço geográfico, porém, parte significativa desta diversidade está realmente concentrada no córrego Christoni. O que poderia explicar esse padrão?

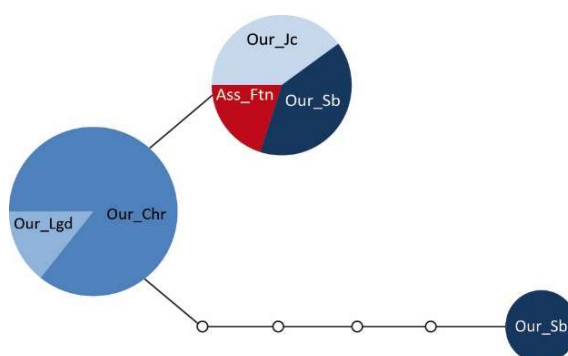


Figura 6 - Rede de relações entre as sequências 16S rRNA de *B. glabrata* coletadas em Ourinhos (córregos Christoni-Chr, Jacu-Jc, Lageadinho-Lgd e Sobra-Sb) e Assis (córrego Fortuninha-Ftn), no período de 2015-2018, geradas em TCS.

Alguns estudos demonstram haver forte diferenciação populacional em *Biomphalaria* em escala geográfica de poucos quilômetros (CHARBONNEL et al., 2002; MAVÁREZ et al., 2002; WETHINGTON et al., 2007; THIELE et al., 2013, PALASIO et al., 2018). A área do córrego Christoni compreende uma área de ocupação urbana, dominada por hortas de várzea próximas a sua cabeceira e áreas transformadas para abrigar atividades de esporte e lazer (LAURENTI e PIROLI, 2011). As hortas do córrego Christoni formam um ecossistema único e isolado dos demais ecossistemas ao longo do córrego, e pode ser um fator determinante para a proliferação de uma subpopulação de *B. glabrata* diferenciada das demais.

Embora neste trabalho nenhum espécime de *B. glabrata* do córrego Christoni tenha sido encontrado parasitado por cercárias de *S. mansoni*, a história natural desta espécie no médio rio Paranapanema está historicamente associada ao parasita (REY, 1952; MAGALHÃES e DIAS, 1973), o que poderia sugerir uma coadaptação local parasita-hospedeiro. No entanto, a hipótese de seleção de uma linhagem de *B. glabrata* via parasita é difícil de ser avaliada sem o suporte de métodos moleculares mais sensíveis à identificação de formas imaturas do parasita.

A diferenciação populacional baseada nas diferenças individuais de caramujos de uma mesma coleção é ainda mais acentuada em *B. peregrina* e *B. straminea*. É mais provável coletar caramujos com diferenças genéticas dentro das coleções hídricas em cada uma das margens do rio Pardo, do que entre caramujos coletados em ambas as margens. Apesar da largura e extensão do rio Pardo, este não constitui uma barreira natural à dispersão desta espécie.

Concluindo: As populações das espécies analisadas mostram um padrão de distribuição genética dos caramujos em subpopulações em fina escala geográfica. Isso pode representar para a esquistossomose uma associação entre o risco de transmissão da doença a pontos específicos dentro de uma mesma coleção de água doce.

6.4.7- REFERÊNCIAS

- ANISIMOVA, M.; GIL, M.; DUFAYARD, J.F.; DESSIMOZ, C.; GASCUEL, O. **Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes.** Systematic biology, 60(5):685-699, 2011.
- CAMPBELL, G.; NOBLE, L.R.; ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V.R.; WEBSTER, J.P.; JONES, C.S. **Low genetic diversity in a snail intermediate host (*Biomphalaria pfeifferi* Krass, 1848) and schistosomiasis transmission in the Senegal River Basin.** Mol. ecology, 19(2):241-256, 2010.
- 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: CARVALHO, O.S.; ZECH COELHO,

- P.M.; LENZI, H.L. (Eds.), *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p 395-418, 2008.
- CHARBONNEL, N.; ANGERS, B.; RASATAVONJIZAY, R.; BREMOND, P.; JARNE, P. **Evolutionary aspects of the metapopulation dynamics of *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*.** Journal of Evolutionary Biology, 15(2):248-261, 2002.
- CHMYZ, I. **Dados parciais sobre a arqueologia do Vale do Paranapanema.** PRONAPA 1, Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi. 6: 59-73, 1967.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9:1657-1659, 2000.
- DEJONG, R.J.; MORGAN, J.A.; PARAENSE, W.L.; POINTIER, J.P.; AMARISTA, M.; AYEHKUMI, P.F.; DE SOUZA, C.P. **Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*.** Molecular biology and evolution, 18(12), 2225-2239, 2001.
- DESLANDES, N. **Técnica de dissecação e exame de planorbídeos.** Rev. Serv. Espec. Saúde Pública 4(2):371-382, 1959.
- ESCOBAR, J.S.; AULD, J.R.; CORREA, A.C.; ALONSO, J.M.; BONY, Y.K.; COUTELLEC, M.A.; KOENE, J.M.; POINTIER, J.P.; JARNE, P.; DAVID, P. **Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction.** Evolution 65-5: 1233-1253, 2011.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular ecology resources, 10(3): 564-567, 2010.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** Mol Mar Biol Biotechnol. 3:294-299, 1994.
- FREY, M.A.; VERMEIJ, G.J. **Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods (Genus: Nerita): implications for regional diversity patterns in the marine tropics.** Mol Phylogenet Evol. 2008 Sep;48(3):1067-86. doi: 10.1016/j.ympev.2008.05.009. Epub 2008.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** Molecular biology and evolution. 27(2):221-4, 2010.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.** Systematic biology, 52(5), 696-704, 2003.
- HALL, T.A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl Acids Symp Ser 41:95-98, 1999.
- IBGE. **Setor Censitário 2010.** Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010b. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>>.
- IBGE. **Base Contínua 250 mil, Hidrografia.** Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010c. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>>.
- JUNK, W.J.; PIEDADE, M.T.; LOURIVAL, R.; WITTMANN, F.; KANDUS, P.; LACERDA, L.D.; BOZELLI, R.L.; ESTEVES, F.A.; CUNHA, C.N.; MALTCHIK, L.; SCHÖNGART, J.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; AGOSTINHO, A.A. **Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection.** Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 24: 5-22, 2013.
- LAURENTI, A.E.M.; PIROLI, E.L.; **Evolução do uso e ocupação do solo sobre as áreas de preservação permanente da microbacia urbana do córrego Christone 1972-2006 Ourinhos-SP.** Revista Tópos, 5(1):87-102, 2011.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. **MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.** Briefings in Bioinformatics, 1-7, 2017.
- LANGAND, J.; THÉRON, 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.** Journal of Molluscan Studies, 65(4):425-433, 1999.
- LATINI, A. O.; RESENDE, D. C.; POMBO, V. B.; CORADIN, L. **Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil.** Brasília: MMA. 791p. (Série Biodiversidade, 39), 2016.

- LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. *Bioinformatics*. 25 (11):1451-1452, 2009.
- MAGALHÃES, L.A.; DIAS, L.C.S.; **Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP)**. *Rev. Saúde Pública* 7(3):295-297, 1973.
- MALTCHIK, L.; STENERT, C.; KOTZIAN, C.B.; PEREIRA, D. **Responses of freshwater molluscs to environmental factors in Southern Brazil wetlands**. *Brazilian Journal of Biology*. 70(3): 473-482, 2010.
- MAVÁREZ, J.; POINTIER, J.-P.; DAVID, P.; DELAY, B.; JARNE, P. **Genetic differentiation, dispersal and mating system in the schistosome-transmitting freshwater snail *Biomphalaria glabrata***. *Heredity*, 89:258–265, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **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.
- 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*, 31(6):1195-1200, 1982.
- PAGE, R.D. **TreeView**. Glasgow University, Glasgow, UK. 2001.
- PALASIO, R.G.S.; GUIMARÃES, M.C.A.; OHLWEILER, F.P.; TUAN, R. **Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil**. *ZooKeys*, 668:11, 2017.
- PALASIO, R.G.S.; ZANOTTI-MAGALHÃES E.M.; TUAN, R. **Genetic diversity of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (d’Orbigny, 1835) (Gastropoda: Hygrophila: Planorbidae) across two coastal areas of southeast Brazil**. *Folia Malacológica*, 26(3), 2018.
- PALASIO, R.G.S, ROSA-XAVIER, I.G.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; TUAN, R. **Diversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated limnic mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools**. *Biota Neotropica* submitted in 2019.
- PALUMBI, S.R.; MARTIN, A.P.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. **The Simple Fool’s Guide to PCR**. Depart. of Zoology, University of Hawaii, Honolulu. 1991.
- PARAENSE, W.L. **Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros**. *Arq Mus Nac* 55:105-128, 1975.
- PARAENSE, W.L. ***Biomphalaria occidentalis* sp.n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata)**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz online* 76(2):199-211, 1981.
- PARAENSE, W.L. ***Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp. n. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4), 465-469, 1984.
- PARAENSE, W.L.; CORREA, L.R. **Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni***. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 15(3), 127-30, 1973.
- PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S. **Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo**. *Arq. Hig.* 25(86):261-271, 1960.
- PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S.; MORAES, L.D.C.; CORRÊA, R.D.R.; TAKAKU, L.; PINTO, A.D.M. **Carta planorbídica do Estado de São Paulo**. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Campanha de Combate à Esquistossomose, CACEsq, sd., 1972.
- QGIS Development Team. **QGIS Version 2.18.22. Geographic Information System**. Open Source Geospatial Foundation Project, 2018. Disponível em: < <http://www.qgis.org/>>.
- REY, L. **Primeiro encontro de planorbídeos naturalmente infestados por furcocercárias de *S. mansoni* no planalto paulista (Ourinhos)**. *Rev. Clín. S. Paulo* 28:57-64, 1952.
- RUMI, A.; VOGLER, R.E.; BELTRAMINO, A.A. **The South-American distribution and southernmost record of *Biomphalaria peregrina* potential intermediate host of schistosomiasis**. *Peer J*, 5:3401, 2017.
- SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. **Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference**. *Molecular biology and evolution*, 16(8), 1114-1114. 1999.

- SILVA, L.J. **Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil)**. Rev. Saúde Pública 19(1):1-7, 1985.
- SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; NETO, E.D.; CAPP, 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):143-149, 1999.
- STANDLEY, C.J.; GOODACRE, S.L.; WADE, C.M.; STOTHARD, J.R. **The population genetic structure of *Biomphalaria choanophala* in Lake Victoria, East Africa: implications for schistosomiasis transmission**. Parasites & vectors, 7(1), 524, 2014.
- SMA. **Rede de drenagem do Estado de São Paulo obtida a partir da base de dados GIS (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental**. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2013.
- TELES, H.M.S. **Ecological aspects of *Biomphalaria* Preston, 1910 in the State of São Paulo, Brazil**. I. Syntopia. Cienc. Cult. 40(4):374-379, 1988
- TELES, H.M.S. **Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no estado de São Paulo**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38(5):426-32, 2005.
- TELES, H.M.S.; VAZ, J.F. **Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no estado de São Paulo, Brasil**. Rev. Saúde Pública 21(6):508-512, 1987.
- TELES, H.M.S.; MARQUES, C.C.A. **Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae)**. Revista de Saúde Pública, 23(1):76-8, 1989.
- 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, 57(1):144-151, 2010.
- THIELE, E.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, G.; GAZZINELLI, A.; MINCHELLA, D.J. **Elucidating the temporal and spatial dynamics of *Biomphalaria glabrata* genetic diversity in three Brazilian villages**. Tropical Medicine & International Health, 18(10):1164-1173, 2013.
- TUAN, R.; SANTOS, P. **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. 30(1):139-144, 2007.
- TUAN, R.; SIMÕES, L.C.G. **Spermatogenesis and desiccation in *Biomphalaria tenagophila* (orbigny, 1835) (gastropoda, planorbidae)**. Rev. Brasil. Genet. 12,4,881-885, 1989.
- TUAN, R. **Diversidade e distribuição de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil**. Biota Neotrop. 9(1), 2009.
- 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**. In: Schistosomiasis. Tehran, Iran, Intech, 2012.
- WETHINGTON, A.R.; ZAVODNA, M.; SMITH, M.K.; OLIVEIRA, G.; LEWIS, F.; MINCHELLA, D.J. **Population genetic structure of *Biomphalaria glabrata* in a schistosomiasis-endemic region in Brazil**. Journal of Molluscan Studies, 73(1):45-52, 2007.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 580p., 1978.

6.5 MANUSCRITO 5: “Associação entre a distribuição das espécies de caramujos hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* e a ocorrência histórica dos casos autóctones em Ourinhos, SP, Brasil” Não publicado.

Raquel Gardini S. Palasio^{1,2}, Aline N. Bortoleto¹, Roseli Tuan² & Francisco Chiaravalloti-Neto¹

1-Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública - USP, 01255-000, Pinheiros, SP, Brasil. 2-Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, 01027-000, Luz, SP, Brasil.

6.5.1- RESUMO

O objetivo deste estudo foi reconhecer áreas suscetíveis para a transmissão da esquistossomose a partir da associação entre a distribuição das espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, e a ocorrência histórica da doença em Ourinhos, na região da bacia hidrográfica do Médio Paranapanema no estado de São Paulo, Brasil. Ourinhos é um município com transmissão endêmica da doença na região e é percorrido por coleções de água doce localizadas entre os rios Pardo e Paranapanema. Foram utilizados dados de casos de esquistossomose notificados em Ourinhos entre 2007 a 2016 e a distribuição de caramujos coletados nos anos de 2015 e 2016. Em 20 pontos analisados, foram identificados morfologicamente nove pontos colonizados por *B. glabrata*, sete por *B. tenagophila* e quatro por *B. straminea*, sendo a abundância relativa de *B. glabrata* maior do que os outros hospedeiros intermediários encontrados. Através da estatística espacial Gi foi identificado um aglomerado significativo de casos autóctones sobrepostos às coleções hídricas do Christoni e Água da Veada com distâncias em torno de 300m e 2000m dos pontos com presença de hospedeiros intermediários onde *B. glabrata* e *B. straminea* foram identificadas, respectivamente. Concluiu-se que o endereço de residência aliado à análise espacial da distribuição dos hospedeiros intermediários da esquistossomose traz informações importantes sobre os potenciais locais de transmissão, sendo ferramentas convenientes para direcionar as ações de vigilância e possivelmente controle e eliminação da esquistossomose na região.

Palavras-chave: esquistossomose; *Biomphalaria*; análise espacial, georreferenciamento, epidemiologia.

Palasio, R. G.S; Bortoleto, A. N; Tuan, R. & Chiaravalloti-Neto, F. "**Spatial distribution of schistosomiasis and *Biomphalaria* intermediate host snails, in Ourinhos, SP, Brazil**" unpublished.

6.5.2- ABSTRACT

The objective of this study is to recognize areas of susceptible for the transmission of schistosomiasis from the association between the distribution of species of snails of the genus *Biomphalaria* intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and the historical occurrence of the disease in Ourinhos, in the region of the Middle Paranapanema watershed, state of São Paulo, Brazil. Ourinhos is a municipality with endemic transmission of the disease in the region and is covered by collections of freshwaters located between the Pardo and Paranapanema rivers. Data from cases of schistosomiasis reported in Ourinhos between 2007 to 2016 and the distribution of snails collected in the years of 2015 and 2016 were used. In 20 analyzed points, nine colonies colonized by *B. glabrata*, seven by *B. tenagophila* and four by *B. straminea*, being the relative abundance of *B. glabrata* larger than the other intermediate hosts found. Through spatial statistics Gi was identified a significant cluster of autochthonous cases overlapping on the Christoni and Água da Veada streams with distances around 300m and 2000m from the points with presence of intermediate hosts where *B. glabrata* and *B. straminea* were identified, respectively. It is concluded that the address of residence together with the spatial analysis of the distribution of intermediate hosts of schistosomiasis carries important information about potential transmission sites, being convenient tools to direct the actions of surveillance and possibly control and elimination of the schistosomiasis in the region.

Key words: schistosomiasis; *Biomphalaria*; spatial analysis, georeferencing, epidemiology.

6.5.3- INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada que ocorre em regiões relacionadas às precárias condições de saneamento básico, a migração de habitantes de locais com elevada ocorrência da infecção e a presença de hospedeiro intermediário do parasita trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em coleções hídricas de água doce. Estes fatores criam o ambiente favorável para a ocorrência dos casos (ROLLEMBERG et al., 2011). No Brasil a esquistossomose mansônica está relacionada com o desenvolvimento do *S. mansoni*, em três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) (TEODORO et al., 2010).

No Brasil a doença está presente, predominantemente, nos estados das regiões do Nordeste, onde apresenta alta prevalência, e Sudeste com focos de transmissão. Em São Paulo a doença ocorre com baixa endemicidade em pontos localizados do Estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Entre os locais endêmicos para esquistossomose no estado de São Paulo, destaca-se a região do médio rio Paranapanema, na fronteira com o estado do Paraná. Essa região é historicamente marcada pela transmissão da esquistossomose, com casos autóctones assinalados desde 1952 no município de Ourinhos (FERREIRA e MEIRA, 1952). As ocorrências destes casos autóctones foram associadas à espécie *B. glabrata*, encontrada naturalmente infectada com *S. mansoni* em Ourinhos neste mesmo ano (REY, 1952; MAGALHÃES e DIAS, 1973). Esta espécie, assinalada pela primeira vez em Ourinhos em 1919 (PARAENSE, 1986), é ainda hoje abundante em coleções hídricas neste município (TUAN, 2009). Também são encontradas no Médio Paranapanema as outras duas espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (TELES et al., 2005; TUAN, 2009).

O objetivo deste estudo foi reconhecer áreas de suscetíveis para a transmissão da esquistossomose a partir da associação entre a distribuição das espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, e a ocorrência histórica da doença em Ourinhos, estado de São Paulo, Brasil.

6.5.4- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Ourinhos, localizado no sudoeste do estado de São Paulo (22° 58' 44" S, 49° 52' 15" W) (Figura 1AB), com área de 296 km² e população de 103.035 habitantes, sendo 97% residentes em área urbana (IBGE, 2010a). Ourinhos agrega mais de 80% dos casos de esquistossomose da Unidade de Gerenciamento de Recursos

Hídricos do Médio Paranapanema (UGRHI-17) (CVE, 2011ab, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O município é percorrido por coleções de água doce localizadas entre os rios Pardo e Paranapanema, estes dois rios são afluentes do rio Paraná (PERON e PIROLI, 2011; CBH-MP, 2018).

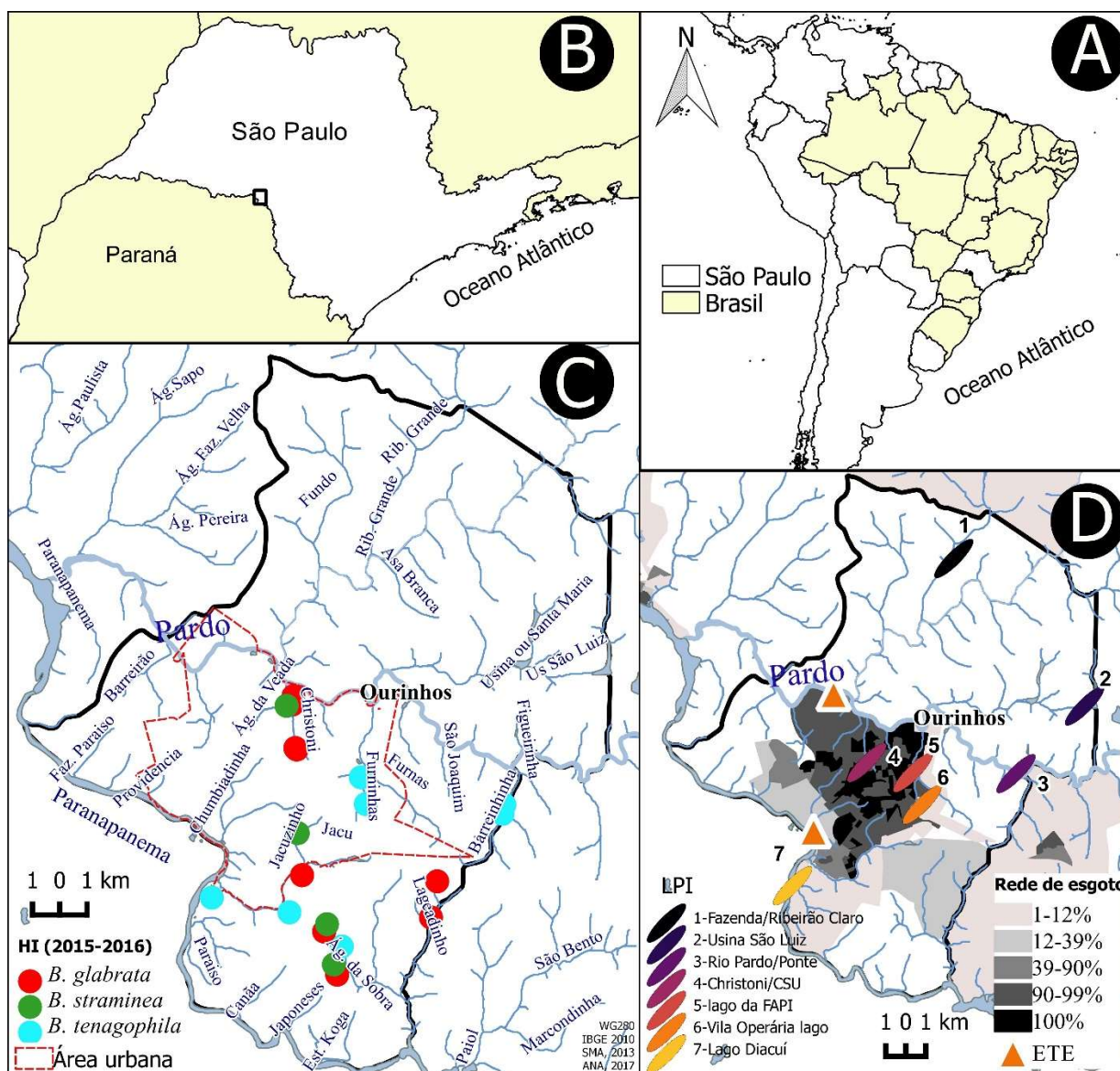


Figura 1 - Mapa da América do Sul, Brasil e o estado de São Paulo (A), destacando em (B) o município de Ourinhos e em (C) a distribuição das espécies de hospedeiros intermediários (HI) do *S. mansoni* identificados em 2015-2016, as coleções hídricas de ourinhos (D), os principais LPis (PIS), porcentagem de moradores atendidos com rede de esgoto segundo setor censitário e estação de tratamento de esgotos (ETE). Fonte: IBGE 2010bc; SMA, 2013; SNSA/ANA, 2017.

Os caramujos foram coletados em áreas urbanas, peri-urbanas e rurais nas coleções hídricas próximas aos rios Paranapanema e Pardo. As coletas foram realizadas em 141 pontos em 26 coleções hídricas, mas apenas 20 pontos em oito coleções hídricas (Água Veada, Barreirinha, Christoni, Furnas, Jacú, Jacuzinho, Lageadinho e Sobra) foram consideradas

neste estudo porque apenas nestes locais foram identificados a presença dos hospedeiros intermediários em trabalho anterior. Os outros pontos eram negativos para a presença do gênero *Biomphalaria* ou tinha a presença de outra espécie não hospedeira intermediária (PALASIO et al., 2019a). As coletas foram realizadas nos meses de março, junho, setembro e dezembro entre 2015-2016. As coletas de espécimes de *Biomphalaria* foram feitas com concha de captura padronizada pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2008). As coordenadas geográficas dos locais com ocorrência de caramujos foram obtidas no momento da coleta com aparelho GPS Garmin ®Etrex.

No laboratório, os caramujos coletados foram examinados para observação de liberação de cercárias de trematódeos. Para isso os caramujos foram expostos à luz artificial e a identificação de cercárias *in vivo* foi feita por observação em microscópio óptico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Para identificar as espécies hospedeiras intermediárias, os caramujos coletados no campo foram dissecados e identificados por meio de características morfológicas do aparelho reprodutor, conforme PARAENSE (1975; 1981) e identificados por meio da análise molecular, através da amplificação do gene Citocromo C Oxidase I (COI) utilizando os primers LCO/HCO (FOLMER et al., 1994), conforme preconiza o protocolo DNA *Barcode* (HERBERT et al., 2003; TUAN et al., 2012).

Informações sobre os casos autóctones de esquistossomose (data de notificação, endereço de residência, informações sobre o local provável de infecção (LPI) e classificação epidemiológica) do período de 2007-2016, foram obtidas por meio de consulta aos bancos de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjac (CVE). A partir dos endereços de residência dos casos de esquistossomose, utilizou-se a ferramenta *batch geocoding* (www.findlatitudeandlongitude.com), que faz a busca no Google Earth, para obtenção das respectivas coordenadas geográficas (ZWIEFELHOFER, 2008). Os materiais cartográficos (mapas com camadas de rios, setores censitários e dados de saneamento) foram obtidos entre as informações disponibilizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na Secretaria de Meio Ambiente do estado de São Paulo (SMA) e na Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA) em parceria com Agência Nacional de Água (ANA) (IBGE, 2010abc; SMA, 2013, ANA, 2017).

Os pontos correspondentes às coordenadas geográficas dos caramujos hospedeiros intermediários e casos de esquistossomose foram importados e visualizados no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018).

A relação entre a distribuição espacial da ocorrência autóctone de esquistossomose nos períodos de 2007-2016, e a ocorrência dos caramujos hospedeiros intermediários (HI) do período de 2015-2016 foi avaliada com o uso da estatística espacial G_i , que é um indicador de associação espacial local (GETIS e ORD, 1992; 1996; ORD e GETIS, 1995). Esta estatística considerou a ocorrência de casos autóctones, em torno de pontos de ocorrência dos caramujos hospedeiros intermediários.

Para isso foram calculadas as taxas de incidência de esquistossomose segundo setores censitários, por meio do complemento MMQGIS (MINN, 2018) no QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018). Para isso foram consideradas as populações de 2010 (IBGE, 2010a) e as coordenadas dos centroides dos setores censitários (IBGE, 2010b). A estatística G_i foi calculada para cada um dos pontos com a presença detectada de hospedeiros intermediários, tomando-se como base as taxas de incidência. Isso permitiu traçar um perfil da esquistossomose em Ourinhos baseado no padrão de transmissão dos casos autóctones e sua relação com as coleções de água doce, e na malacofauna que coloniza essas coleções.

Adotou-se nível de significância de 5%, que correspondeu ao valor mínimo da estatística G_i igual a 3.2889 ($N=100$) conforme tabela (i.i.d.) (ORD e GETIS, 1995). Esta estatística G_i , ao não levar em conta atributo do ponto analisado (no caso, local com a presença de caramujos hospedeiros intermediários), é considerada uma estatística focal. No caso deste estudo, o encontro de um resultado significativo para esta estatística corresponderia a afirmar que o local em questão poderia ser caracterizado como um potencial foco de transmissão de esquistossomose.

As estatísticas G_i foram obtidas com a utilização do pacote *spdep* (BIVAND et al., 2016) do programa R versão 3.2.2 (R DEVELOPMENT, 2015). Foi testada a existência de aglomerados considerando-se uma distância máxima de 4000m entre cada ponto com a presença de hospedeiro intermediário e os centroides dos setores censitários.

Além disso, também foi avaliado se há uma existência ou não de dependência espacial entre as duas distribuições (independentes quando curva estiver dentro do envelope e dependentes quando estiver fora do envelope da função), por meio das coordenadas dos pontos dos casos autóctones e dos HI, utilizando-se a função $K12$ de Ripley (LOTWICK e SILVERMAN, 1982, TEIXEIRA-NETO et al., 2014). O resultado da função $K12$ permitiu verificar o raio de influência.

A partir das coordenadas dos casos autóctones de esquistossomose e o raio de influência da função $K12$ foi feita a estimativa da densidade de Kernel, com complemento disponível no programa QGIS versão 2.18.22 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018). Com

as coordenadas dos pontos dos hospedeiros intermediários e os raios de influências de cada ponto (distancias consideradas significantes na estatística G_i , limite maior) foi possível identificar no mapa os aglomerados dos casos autóctones em torno de pontos com hospedeiro intermediário. Para esse procedimento foi utilizado o complemento MMQGIS (MINN, 2018) com operação geográfica *create buffers* disponível no QGIS e depois concatenadas em um único aglomerado, restringiu-se à área urbana de Ourinhos, pois 97,4% da população reside nesta área (IBGE, 2010a).

6.5.5- RESULTADOS

Foram coletados 1394 caramujos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* em 20 pontos localizados ao longo das oito coleções hídricas de Ourinhos, no período de 2015-2016 (Figura 1C). Nos pontos analisados, foram identificados morfologicamente nove pontos colonizados por *B. glabrata*, sete por *B. tenagophila* e quatro por *B. straminea*, sendo a abundância relativa de *B. glabrata* maior do que as outras espécies encontradas (Tabela 1 e Figura 2). Não foram encontrados caramujos infectados com *S. mansoni* na análise parasitológica. As três espécies hospedeiras intermediárias naturais de *S. mansoni* estão distribuídas em áreas urbanas, periurbanas e rurais de Ourinhos (Figura 1C-2).

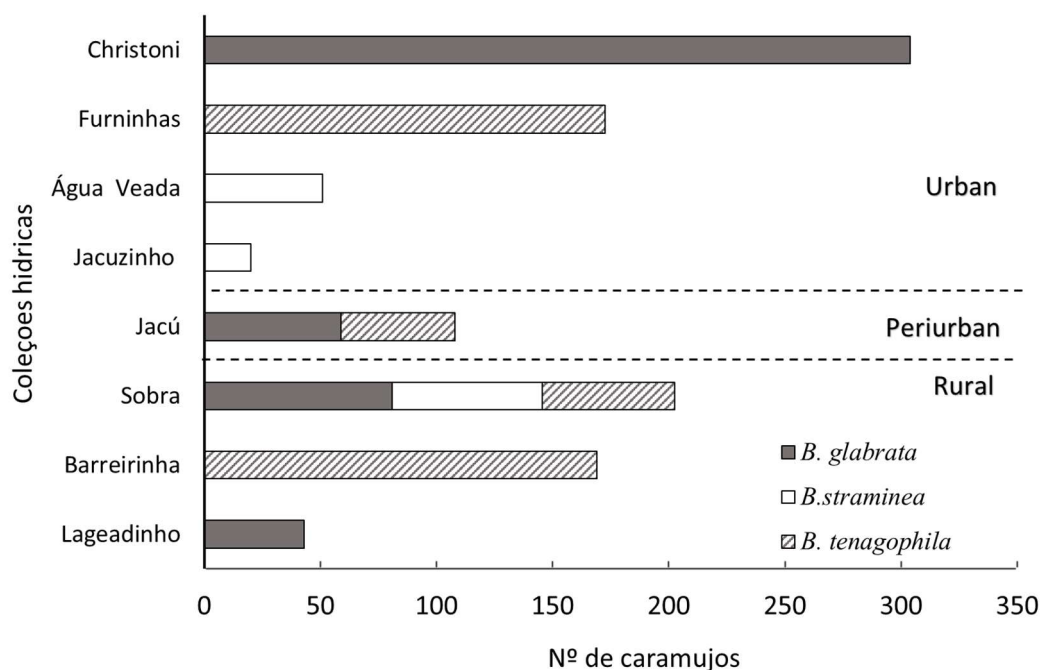


Figura 2- Número de espécimes de hospedeiros intermediários coletadas entre 2015-2016 em 8 coleções hídricas, segundo localização nas áreas urbana, periurbana e rural, no município de Ourinhos, SP, Brasil.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas e número de caramujos coletados/espécies/pontos de coleta nas oito coleções hídricas com o encontro de espécies de *Biomphalaria* hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no município de Ourinhos, São Paulo, Brasil, no período de 2015-2016. *Bgla*=*B. glabrata*, *Bst*=*B. straminea*, *Btte*=*B. tenagophila*, *Boc*=*B. occidentalis*

Coleção Hídrica	Ponto	Latitude (°)	Longitude (°)	N° de caramujos					
				<i>Btt</i>	<i>Bgl</i>	<i>Bst</i>	<i>Boc/gla</i>	<i>Boc/Btt</i>	<i>Boc/Bst</i>
Christoni	1	-22.967600	-49.874683		170				
	2	-22.967117	-49.875167		25				
	3	-22.952833	-49.876333		45		68		
	4	-22.950050	-49.875850		25		10		
Água da Veada	5	-22.953222	-49.878306			51			
Furninhas	6	-22.985556	-49.849972	125					
	7	-22.976766	-49.851745	32					
Jacu	8	-23.016306	-49.905000					31	
	9	-23.008944	-49.872750		59				
	10	-23.021167	-49.877278					98	
Jacuzinho	11	-22.995111	-49.874333			20			
Lageadinho	12	-23.010972	-49.824500		12				
	13	-23.022833	-49.826733		31				
Sobra	14	-23.041650	-49.860233		35				
	15	-23.032400	-49.858617	57					
	16	-23.027467	-49.864867		46				
	17	-23.025063	-49.863847			38			
	18	-23.038333	-49.861400						53
Barreirinha	19	-22.985800	-49.800517	27					
	20	-22.988750	-49.801167	142					
Total				383	448	109	194	78	129

As frequências de casos autóctones, importados e indeterminados foram, respectivamente, 39,7% (25), 7,9% (5) e 52,4% (33) e ocorreram em média 6,3 casos por ano. Foram possíveis geocodificar sete LPI's com as fichas dos casos de esquistossomose (entretanto a maioria dos LPI's são genéricos e 48% sem informação impossibilitando a geocodificação) e nestes locais foram encontrados HI. Por exemplo, nas proximidades do LPI-4 (Christoni) foi identificada a espécie *B. glabrata* (Figura 1D) e foram encontrados HI em locais com alta porcentagem de moradores atendidos com rede de esgoto, como também em locais não atendidos com rede de esgoto (Via fossa ou outros) (Figura 1D).

A Figura 3A apresenta, os resultados da estatística Gi com os locais considerados como focos de transmissão de esquistossomose, bem como a extensão dos aglomerados de casos autóctones em torno destes pontos. Foram sobrepostos a este mapa, os respectivos *hotspots* de casos autóctones obtidos usando a ferramenta Kernel.

Foram encontrados aglomerados significantes de casos autóctones sobrepostos ao córrego Christoni, com distâncias em torno de 300m e 2000m dos pontos com presença de hospedeiros intermediários e um aglomerado de casos sobreposto ao córrego Água da Veada, com distância em torno de 2000m (Figura 3AB). Todos os aglomerados encontrados foram reunidos em um único (aglomerado 1 na Figura 3A).

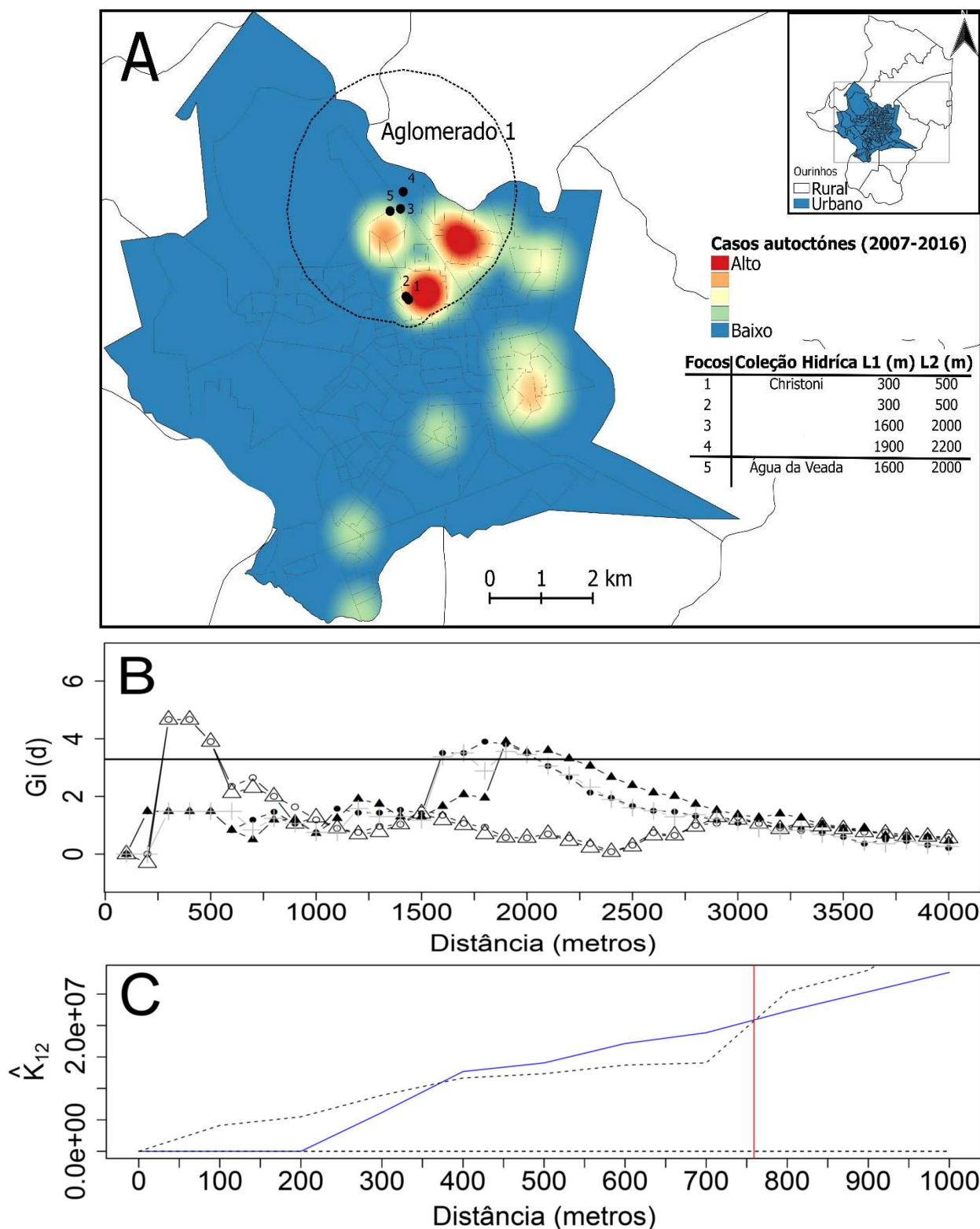


Figura 3 – (A) Mapa da densidade de Kernel na área urbana (raio de influência de 759m) mostrando a distribuição dos casos autóctones de esquistossomose e aglomerados significantes na estatística G_i de casos autóctones em torno de pontos com o hospedeiro intermediário (focos). (B) Gráfico com os valores dos aglomerados significantes de casos autóctones em torno dos pontos do córrego Christoni (1- \triangle , 2- \circ , 3- \bullet , 4- \blacktriangle) e do ponto do córrego Água da Veada (5- $+$) com presença de hospedeiros intermediários. Gráfico da análise função K12 bivariada (C), em Ourinhos, São Paulo, Brasil, no período de 2007-2016; valores significantes acima da linha horizontal ($G_i[d] > 3.28$, $P < 0.05$). A curva azul continua acima do envelope mostra uma dependência espacial positiva entre os casos importados e autóctones de esquistossomose, linha vermelha limite da dependência espacial de ~ 759 m.

Destaca-se que foram encontradas as espécies *B. glabrata* e *B. straminea* respectivamente nos córregos Christoni e Água da Veada no levantamento realizado em 2015-2016 (Tabela 1). O gráfico da análise função K12 (Figura 3C) indica existência de dependência espacial positiva até uma distância de ~759 m entre os casos autóctones e os HI na região e período de estudo.

6.5.6-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A partir da associação de casos autóctones com indicadores malacológicos foi possível identificar locais específicos nos córregos Christoni e Água da Veada como áreas suscetíveis a transmissão da esquistossomose em Ourinhos. O resultado obtido com a estatística G_i , a partir da geocodificação dos endereços de residência, identificou aglomerados significantes em torno do córrego Christoni. Estas áreas já tinham sido identificadas como importantes para ocorrência de casos autóctones e que, na maioria, tratava-se de transmissão peri-domiciliar (SILVA, 1985; COURA-FILHO, 1997; FIGUEIREDO, 2000).

O inventário de espécies no córrego Christoni, afluente do rio Pardo, mostra predominância e abundância da *B. glabrata* em apenas quatro pontos específicos neste estudo e predominância desta espécie nos levantamentos anteriores deste 1979 a 2012 (SUCEN 1980; TELES, 1988; SUCEN, 2012; TUAN, 2009). Apesar da investigação de eliminação de cercárias por *B. glabrata* tenha resultado negativa neste estudo, sabe-se que a espécie é o hospedeiro intermediário melhor adaptado ao desenvolvimento e veiculação do parasita (MAGALHÃES e DIAS, 1973; PARAENSE, 2001), sendo considerada na região do Paranapanema a espécie mais competente para a transmissão de *S. mansoni* no passado (TELES e VAZ, 1987; FIGUEIREDO, 2000). E ainda há setores censitários no município no qual os moradores não são atendidos com rede de esgoto sendo o esgotamento via fossa séptica e/ou rudimentar, no caso do setor censitário onde está localizado o córrego Christoni, 90% dos moradores são atendidos por rede de esgoto e 10% por fossa rudimentar (IBGE, 2010a), provavelmente essa pode ser uma das explicações de o número de casos autóctones ter diminuído nos últimos anos neste município, mas ainda continuar sua transmissão (PALASIO et al., 2019b).

Outro exemplo do potencial de colonização de ecossistemas de água doce por espécies hospedeiras intermediárias se refere à identificação de *B. straminea* em ecossistemas de água doce em áreas urbanas (Água da Veada), provavelmente introduzida recentemente na região através da piscicultura (CORREIA et al., 1970). Neste córrego anteriormente foi registrada *B. tenagophila* (TUAN, 2009; SUCEN, 2012). Dados de 2010, apontam que 95% dos moradores,

do setor censitário onde está o córrego Água da Veada, são atendidos por rede de esgoto e 4% por via fossa séptica e 1% fossa rudimentar (IBGE, 2010a).

B. straminea não é o hospedeiro melhor adaptado a infecção por *S. mansoni* tendo como característica ser mais resistente à seca (JANNOTTI-PASSOS e SOUZA, 2000; PARAENSE, 1977). Esta espécie apareceu como foco no córrego Água da Veada, mas este resultado pode estar relacionado a proximidade do córrego Christoni do que devido a presença de *B. straminea*.

Como resultado deste estudo pode-se afirmar o uso dos sistemas de informação geográfica e de ferramentas de análise espacial são adequados para a identificação dos locais suscetíveis a transmissão da esquistossomose. A associação da malacologia, epidemiologia e georreferenciamento na elaboração de estratégias de trabalho tem potencial para aprimorar o sistema de vigilância e controle da esquistossomose com perspectivas de eliminação da doença nos próximos anos.

O estudo tem como limitação a utilização de dados secundários, com consequências prováveis falhas na classificação dos casos podem ter acontecido, como foi observado no estudo de EDUARDO (1985) que casos autóctones poderiam ter sido classificados como indeterminados tendo uma subnotificação dos casos autóctones. Entre as limitações deste estudo há uma discordância no período entre as informações de coleta dos caramujos que são recentes de 2015-2016 e os dados de casos de esquistossomose são de 2007-2016. Entretanto os hospedeiros intermediários continuaram sendo encontrados na região de Ourinhos neste período, nas coleções hídricas de Christoni (TUAN, 2009) a mesma espécie foi observada nas coletas deste trabalho (2015-2016). Já na coleção hídrica da Água da Veada foi observado o encontro de *B. straminea* e não mais de *B. tenagophila*, ambas hospedeiras intermediárias.

A estatística Gi possibilitou identificar, para o período de estudo (2007 a 2016), aglomerado de casos autóctones em torno de locais com a presença de hospedeiros intermediários (córrego Christoni com a presença da espécie *B. glabrata*), o qual pode ser caracterizado como foco de esquistossomose. Além disso, o uso desta técnica permitiu constatar que os locais de residência dos casos autóctones aliado à análise espacial da distribuição dos hospedeiros intermediários trazem informações importantes sobre os potenciais locais de transmissão, pois a infecção é peri-domiciliar (FIGUEIREDO, 2000), e como as coleções hídricas muitas vezes estão próximas as residências. Com a significância na estatística Gi em torno de até dois km, de modo que na ausência de informações precisas dos LPI's esta informação e esta ferramenta podem ser convenientes para o desenvolver e

direcionar as ações de vigilância e possivelmente controle e eliminação da esquistossomose na região.

6.5.7 REFERÊNCIAS

- ANA. **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Agência Nacional de Águas (Brasil). Brasília, 88, 2017. ISBN: 978-85-8210-050-9. Disponível em: < <http://metadados.ana.gov.br/geonetwork/srv/pt/main.home>>.
- BIVAND, R.; ALTMAN, M.; ANSELIN, L.; ASSUNÇÃO, R.; BERKE, O. **Package 'spdep'**. Spatial Dependence: Weighting Schemes, Statistics and Models, 2016.
- CBH-MP, **CBHs de Rios Afluentes**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Rio Paranapanema, 2018. Disponível em: < <http://paranapanema.org/ugrh/comites>>.
- CORREIA, R.D.R.; MURGEL, J.M.D.T.; PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S.; DIAS, L.C.D.S.; MORAIS, L.V.C.; ROSÁRIO, F.F.D. **Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes**. Revista de Saúde Pública, 4, 117-127, 1970.
- COURA-FILHO, P. **Schistosomiasis mansoni in urban territory**. 2. A theoretical approach to the accumulation, concentration, and centralization of capital and the production of disease. Cad. Saúde pública, 13(3):415-424, 1997.
- CVE, **Esquistossomose [Dados estatísticos 1981 - 2009 - definitivo]**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo, 2011a. Disponível em: < <http://www.cve.saude.sp.gov.br>>.
- CVE. **Esquistossomose [Dados estatísticos,2008-2010]**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de vigilância epidemiológica “prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo. 2011b. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/esquistodados.html>>.
- 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. Bepa, 18:2-8, 2005.
- FERREIRA, J.M.; MEIRA, J.A. **Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipaucu)**. Foco autóctone na cidade de Ourinhos. Rev. Paul. Med, 41(1):15-18, 1952.
- FIGUEIREDO, W.S.A. **Epidemiologia da esquistossomose mansônica e o processo de organização espacial: o caso do município de Ourinhos, S.P.** Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia (Master dissertation). pp 40-52, 127-137, 2000.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates**. Mol Mar Biol Biotechnol, 3:294-299, 1994
- GETIS, A.; ORD, J.K. **The analysis of spatial association by use of distance statistics**. Geographical Analysis, 24:255-66, 1992.
- GETIS, A.; ORD, J.K. **Local spatial statistics: an overview**. In P. Longley and M. Batty (eds) **Spatial analysis: modelling in a GIS environment**. Cambridge: Geoinformation International 261-277, 1996.
- HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; WAARD, J. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proc Biol Sci, 7; 270(1512): 313–321. 2003.
- IBGE. **Censo demográfico 2010a**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010a. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>>.
- IBGE. **Setor Censitário 2010b**. Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010b. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>>.
- IBGE. **Base Contínua 250 mil, Hidrografia**. Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010c. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>>.
- JANNOTTI-PASSOS, L.K.; SOUZA, C.P.D. **Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction**. Rev. do Inst. de Medicina Tropical de São Paulo, 42(5):291-294, 2000.

- LOTWICK, H.W.; SILVERMAN, B.W. **Methods for analyzing spatial processes of several types of points**. J R Stat Soc. 44:406–413, 1982.
- MAGALHÃES, L.A.; DIAS, L.C.S. **Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP)**. Rev. Saúde Pública 7(3):295-297, 1973.
- MINISTERIO DA 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.
- MINISTERIO DA SAUDE. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde 13-20, 2014.
- MINISTERIO DA SAUDE. **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS)** [online]. Brasília [s.d.], 2016. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defectohtm.exe?sinanet/cnv/esquistosp.def>>, Acessado em: 2016.
- MINN, M. **MMQGIS**. A collection of QGIS vector layer operation plugins. 2018. Disponível em: <<http://michaelminn.com/linux/mmqgis/>>
- ORD, J.K.; GETIS, A. **Local spatial autocorrelation statistics: distributional issues and an application**. Geographical Analysis 27:286-306, 1995.
- PALASIO, R.G.S.; ROSA-XAVIER, I.G.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; TUAN, R. **Biodiversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated limnic mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools**. Biota Neotropica submitted in 2019a.
- PALASIO, R.G.S; BORTOLETO, A.N; ROSA-XAVIER, I.G; ANDRIGHETTI, M.T.M; TUAN, R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. **Schistosomiasis in Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil": Does it matter today for Public Health?** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2019b.
- PARAENSE, W.L. **Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros**. Arq. Mus. Nac. 55:105-128, 1975.
- PARAENSE, W.L. 1977. **Distribuição geográfica dos vetores da xistosomose no Nordeste do Brasil**. Painele Programa Especial de Controle da Esquistossomose, In VI Conferência Nacional de Saude, Brasília, 1-5:311-315.
- PARAENSE, W.L. ***B. occidentalis* sp.n. from South America**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76(2):199-211, 1981.
- PARAENSE, W.L. **Distribuição dos caramujos no Brasil**. An. Acad. Mineira Med. 14:117-128, 1986.
- PERON, A.F.; PIROLI, E.L. **Projeto Apps: Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo, CEDIAP-GEO**. Centro de Estudo e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento 1th ed. 23 p., 2011.
- PARAENSE, W.L. **The schistosome vectors in the Americas**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96, suppl.:7-16, 2001.
- QGIS Development Team. **QGIS Version 2.18.22**. Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project, 2018. Disponível em: <<http://www.qgis.org/>>.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna. R Foundation for Statistical Computing, 2015.
- REY, L. **Primeiro encontro de planorbídeos naturalmente infestados por furcocercárias de *S. mansoni* no planalto paulista (Ourinhos)**. Rev. Clín. S. Paulo, 28:57-64, 1952.
- ROLLEMBERG, C.V.V.; SANTOS, C.M.B.; SILVA, M.M.B.L.; SOUZA, A.M.B.; SILVA, Â.M.; ALMEIDA, J.A.P.; ALMEIDA, R.P.E.; JESUS, A.R. **Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose**. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical 44(1):91-96. 2011.
- SILVA, L.J. **Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil)**. Rev. Saúde Pública 19(1):1-7, 1985.
- SMA. **Rede de drenagem do Estado de São Paulo obtida a partir da basedo gisat (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental**. Secretaria de Meio Ambiente do estado de São Paulo. 2013. Disponível em:

<http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/mapa-da-rede-de-drenagem-do-estado-de-sao-paulo/>. Acesso em: 2018.

- SUCEN. **Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 1979-1980, do serviço Regional 11 - Marília**. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias, 1980.
- SUCEN. **Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do ano de 2009-2012, do serviço Regional 11 - Marília**. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias, 2012.
- TEIXEIRA-NETO, R.G.; SILVA, E.S.; NASCIMENTO, R.A.; BELO, V.S.; OLIVEIRA, C.D.L.; PINHEIRO, L.C.; GONTIJO, C.M. F. **Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis**. *Parasites & vectors*, 7(1):485, 2014.
- TELES, H.M.S. **Ecological aspects of *Biomphalaria* Preston, 1910 in the State of Sao Paulo, Brazil. I. Syntopia**. *Cienc. Cult.*, 40(4):374-379, 1988.
- TELES, H.M.S. **Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 38(5):426-32, 2005.
- TELES, H.M.S.; VAZ, J.F. **Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil**. *Rev. Saúde Pública*, 21(6):508-512, 1987.
- 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* 57(1):144-151, 2010.
- TUAN, R. **Diversity and distribution of the *Biomphalaria* species in the middle reaches of the Paranapanema River, São Paulo, SP, Brazil**. *Biota Neotrop.* 9(1):279-283, 2009.
- 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**. In: *Schistosomiasis*. Tehran, Iran, Intech, 2012.
- ZWIEFELHOFER D.B. **Batch Geocoding** [Internet]. Find Latitude and Longitude, 2008 [updated 2017]. Disponível em: <http://www.findlatitudeandlongitude.com/batch-geocode/>.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Objetivo 1: Atualizar a carta malacológica com base em parâmetros ecológicos, genéticos, epidemiológicos e geográficos.

As espécies do gênero *Biomphalaria* representam cerca de 75,5 % das espécies de moluscos límnicos encontrados na região UGRHI-17 do Médio Paranapanema no estado de São Paulo, Brasil. *B. occidentalis* é a espécie com maior abundância na região de estudo, sendo junto com *B. tenagophila*, espécies geneticamente homogêneas. A segunda espécie com maior abundância é *B. peregrina*, sendo também a espécie com maior distribuição e diversidade genética dentre as espécies analisadas neste estudo.

A atualização da carta malacológica feita neste estudo, mostra atualmente predominância de *B. tenagophila* em coleções hídricas em torno do município de Ipaussu. Isso pode ter ocorrido em função da redução dos habitats favoráveis à proliferação desta espécie. Os resultados mostraram que ao longo do tempo ocorreram modificações na fauna planorbídica das coleções hídricas do Médio Paranapanema, com substituição de populações de *B. tenagophila* por *B. occidentalis* ou *B. peregrina*.

B. glabrata está restrita a um ponto em Assis e coloniza nove pontos em quatro das 26 coleções hídricas em Ourinhos, sendo estes pontos quentes para a vigilância malacológica continuada, com a perspectiva da eliminação da esquistossomose neste município em curto prazo, fato que teria reflexo para toda a região. Além disso, destaca-se o encontro de *Lymnaea columela* (Say, 1817) no município de Assis, no qual se desenvolve o parasita da *Fasciola hepática*.

Nos resultados do DNA *Barcode* o método ABGD foi o que mais se aproximou da delimitação feita por caracteres morfológicos. Além disso a aplicação do DNA *Barcode* é promissora em espécimes jovens e adultos com resultados de identificação morfológica imprecisa, podendo dessa forma contribuir para o aperfeiçoamento dos levantamentos malacológicos.

Objetivo 2: Descrever e avaliar a relação entre a distribuição espacial de casos de esquistossomose e dos caramujos do gênero *Biomphalaria*.

Pode-se concluir que houve diminuição geral da incidência da esquistossomose nas unidades GeoSentinelas pertencentes à UGRHI-17 do Médio Paranapanema. Nos municípios de Assis e Ipaussu, foram detectados aglomerados de casos de esquistossomose apenas no passado. Atualmente, a esquistossomose não representaria um problema de saúde pública nestes municípios, devido, provavelmente, às melhorias no saneamento básico.

Já em Ourinhos foram detectados aglomerados no passado e no último período de estudo. Em Ourinhos, a esquistossomose persiste em baixa prevalência e incidência, representando ainda um problema de saúde pública. O mapa de fluxo de casos importados demonstra que Ourinhos é um importante núcleo de dispersão regional da doença na região.

De forma geral, o uso de técnica de varredura e da estatística GI permitiram constatar que os locais de residência dos casos autóctones trazem informações importantes sobre os locais de transmissão, de modo que esta informação pode ser utilizada para o desenvolvimento de atividades de vigilância e controle. A estatística G_i possibilitou identificar, no período entre 2007 e 2016, aglomerados de casos autóctones em torno de locais com a presença de *B. glabrata* na coleção hídrica de Christoni em Ourinhos.

Objetivo 3: Construir mapas de distribuição de nichos de espécies de *Biomphalaria*, por meio de modelos espaciais.

O modelo estatístico de máxima entropia mostrou que há média probabilidade futura de expansão geográfica da presença de *B. straminea* nas coleções hídricas de Assis e de outros municípios e alta probabilidade em torno do município de Ourinhos, em função de um possível aumento futuro dos GEE, sendo que a variável que maior contribuiu para a modelagem da distribuição futura foi a amplitude térmica anual. Além disso já foi observada uma expansão para os municípios de Assis, Ipaussu e Chavantes.

Foi observada a permanência de *B. glabrata* em Ourinhos e Assis e uma provável expansão futura da distribuição desta espécie para outros municípios da região, mesmo que em menor potencial que *B. straminea*. A distribuição de *B. glabrata* relacionou-se às mudanças climáticas futuras e possivelmente à capacidade desta espécie tolerar temperaturas elevadas.

Em relação de *B. tenagophila*, foi observado que a precipitação é um ponto importante para sua distribuição, ou seja, a quantidade de chuva proporciona a diminuição de barreiras geográficas e conseqüentemente a dispersão desta espécie, com provável expansão no município de Iepê. Entretanto esta espécie tende a manter no futuro a colonização no mesmo locais atuais, próximos a Assis, Ourinhos e Ipaussu.

B. occidentalis e *B. peregrina* tendem, em geral, a colonizar no futuro os mesmos locais atuais. As variáveis que mais contribuiram para a modelagem futura destas espécies foram a precipitação e a temperatura, respectivamente.

Objetivo 4: Descrever o padrão de distribuição genético-populacional de *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. occidentalis* e *B. glabrata*, por meio de sequências dos genes COI e 16S.

As reconstruções filogenéticas feitas com as sequências dos genes COI, e COI+16S rRNA por máxima verossimilhança mostram árvores com topologias similares, e maiores valores de suporte estatístico para o agrupamento das sequências em cinco ramos monofiléticos.

As populações de caramujos não mostraram estruturação genética ao longo do espaço geográfico analisado, sendo a maior parte da diversidade genética das espécies explicada por variações individuais que ocorrem em caramujos que colonizam a mesma coleção hídrica. A diferenciação populacional baseada nas diferenças individuais de caramujos de uma mesma coleção é ainda mais acentuada em *B. peregrina* e *B. straminea*.

Apesar da largura e extensão do rio Pardo, este não constitui uma barreira natural à dispersão destas espécies. As populações das espécies analisadas mostram um padrão de distribuição genética dos caramujos em subpopulações em fina escala geográfica. Isso pode representar para a esquistossomose uma associação entre o risco de transmissão da infecção a pontos específicos dentro de uma mesma coleção de água doce.

8 REFERÊNCIAS

- ADEMA, C.M.; HILLIER, L.W.; JONES, C.S.; LOKER, E.S.; KNIGHT, M.; MINX, P.; ARICAN-GOKTAS, H. D. **Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail.** Nature communications, 8, 15451. 2017.
- AGUIAR-SILVA, C.; MENDONÇA, C.L.F.; PINHEIRO, P. H. da C.K. **Evaluation and updating of the Medical Malacology Collection (Fiocruz-CMM) using molecular taxonomy.** SpringerPlus, 3:446, 2014.
- ALMEIDA, A.; RESENDES, A.P.; COSTA, M.J.; ALARTA, J.E.S.; ILONA, M.B.; NASCIMENTO, R.S.; ROGERIO, S. **Analysis of spatial distribution of mortality from mansonic schistosomiasis in municipalities of Pernambuco State in the period 1997 - 2000.** Abstracts of the 9th International Symposium on Schistosomiasis, Salvador, Brazil, 55, 2003.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; MORAES, G.; LEONARDO, J.; SPAROVEK, G. **Köppen's climate classification map for Brazil.** Meteorologische Zeitschrift, 22(6):711-728, 2013.
- ANA, **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas.** Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Agência Nacional de Águas (Brasil). Brasília: 88 p. ISBN: 978-85-8210-050-9 <http://metadados.ana.gov.br/geonetwork/srv/pt/main.home>. 2017.
- ANA, **Plano Integrado de Recursos Hídricos da Unidade de Gestão de Recursos Hídricos Paranapanema.** Agência Nacional de Águas (Brasil), 2016.
- ANARUMA FILHO, F.; SANT'ANA, J.M.; FERREIRA DOS SANTOS, R.; CASTAGNA, C.L. **Environmental inducers of schistosomiasis mansoni in Campinas, Brazil.** Geospatial Health, 5(1):79-91, 2010.
- ANISIMOVA, M.; GIL, M.; DUFAYARD, J.F.; DESSIMOZ, C.; GASCUEL, O. **Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes.** Systematic biology, 60(5), 685-699, 2011.
- AUSTIN, M.P. **Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling.** Ecological modelling, 157(2):101-118, 2002.

- BARBOSA, V.S.; LOYO, R.M.; BARBOSA, C.S. **Modelling of the distribution of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* in the metropolitan region of Recife, Pernambuco, Brazil.** *Geospatial health*, 11(3):362-372, 2016.
- BARBOZA, D.M.; ZHANG, C.; SANTOS, N.C.; SILVA, M.M.B.L; ROLLEMBERG, C.V.V; AMORIM, F.J.R; UETA, M.T.; MELO, C.M.; ALMEIDA, J.A.P; JERALDO, V.L.S.; JESUS, A.R. ***Biomphalaria* species distribution and its effect on human *S. mansoni* infection in an irrigated area used for rice cultivation in northeast Brazil.** *Geospat Health*, 6:S103-S109, 2012.
- BAVIA, M.E.; HALE, L.F.; MALONE, J.B.; BRAUD, D.H.; SHANE, S.M. **Geographic Information Systems and the environmental risk of Schistosomiasis in Bahia, Brazil.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(4):566-572, 1999.
- BIVAND, R.; ALTMAN, M.; ANSELIN, L.; ASSUNÇÃO, R.; BERKE, O. **Package ‘spdep’**, 2016.
- BIVAND, R.; ROWLINGSON, B.; DIGGLE, P.; PETRIS, G.; EGLIN, S. **Package ‘spplancs’**. **R package version 2.01-40.** URL, 2017. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/spplancs/spplancs.pdf>.
- BLOUIN, M.S.; BONNER, K.M.; COOPER, B.; AMARASINGHE, V.; O’DONNELL, R.P.; BAYNE, C.J. **Three genes involved in the oxidative burst are closely linked in the genome of the snail, *Biomphalaria glabrata*.** *International journal for parasitology*, 43(1), 51-55, 2013.
- CALDEIRA, R.L.; TEODORO, T.M.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; LIRA-MOREIRA, P.M.; GOVEIA, C.D.O.; CARVALHO, O.D.S. **Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP.** *BioMed Research International*, 2016.
- 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], 99(5): 499-502, 2004.
- 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]. 95(2):171-177, 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], 93(suppl.1):219-225, 1998.
- CAMPBELL, G.; JONES, C.S.; LOCKYER, A.E.; HUGHES, S.; BROWN, D.; NOBLE, L.R.; ROLLINSON, D. **Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1460), 2351, 2000.
- CAMPBELL, G.; NOBLE, L.R.; ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V.R.; WEBSTER, J.P.; JONES, C.S. **Low genetic diversity in a snail intermediate host (*Biomphalaria pfeifferi* Krass, 1848) and schistosomiasis transmission in the Senegal River Basin.** *Mol. ecology*, 19(2):241-256, 2010.
- CARDIM, L.; FERRAUDO, A.S.; PACHECO, S.T.A.; REIS, R.B.; SILVA, M.M.N.; CARNEIRO, D.D.M.T.; BAVIA, M.E. **Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil.** *Cad. Saúde Pública*, 899-908, 2011.
- CARVALHO, M.S.; PINA, M.F.; SANTOS, S.M. **Conceitos Básicos de Sistemas de Informação Geográfica e Cartografia Aplicados à Saúde.** Brasília. Organização Panamericana de Saúde, Ministério da Saúde. p.124, 2000.
- 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. 395-418, 2008a.
- CARVALHO, O.S.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CALDEIRA, R.L. **Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*.** OS Carvalho, PM Zech Coelho, HL Lenzi (Eds.), *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 302-339. 2008b.
- CARVALHO, M.E.S.; MENDONÇA F.A.; SANTOS, S.S.C. **Variabilidade climática e a modelagem ecológica da *Biomphalaria glabrata*: cenários futuros (2050 e 2070) para o hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil.** Os desafios da geografia física na fronteira do conhecimento. *In I*

- Congresso Nacional de Geografia Física, Instituto de geociência, UNICAMP, 1579-1589, 2017. Disponível em: <https://ocs.ige.unicamp.br/ojs/sbgfa>.
- CASIRAGHI, M.; LABRA, M.; FERRI, E.; GALIMBERTI, A.; DE MATTIA, F. **DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method**. Briefings in bioinformatics, 11(4), 440-453, 2010.
- CBH-MP. **Relatório Zero Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da UGRHI-17 | ano: 1999. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema**, 1999. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorioz/>
- CBH-MP. **Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2018 (Ano Base: 2017) – UGRHI-17. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema**. 2018a. Disponível em: <http://cbhmp.org/publicacoes/relatorios/>
- CBH-MP. **Plano de bacia da unidade de gerenciamento de recursos hídricos do Médio Paranapanema UGRHI – 17, Relatório n. 986/17 – RES-02 – Oficinas de definição das prioridades para gestão dos recursos hídricos na UGRHI 17 – Etapa Prognóstico**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema, 2018b.
- CBH-MP, **CBHs de Rios Afluentes**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Médio Paranapanema. 2018c. Disponível em: <http://paranapanema.org/ugrh/comites>.
- CHARBONNEL, N.; ANGERS, B.; RAZATAVONJIZAY, R.; BREMOND, P.; JARNE, P. **Microsatellite variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi***. Molecular ecology, 9(7): 1006-1007, 2000.
- CHIEFFI, P.P.; WALDMAN, E.A. **Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil**. Cad. Saúde Pública. 4(3):257-275, 1988.
- COLLINS, W.J.; BELLOUIN, N.; DOUTRIAUX-BOUCHER, M.; GEDNEY, N.; HALLORAN, P.; HINTON, T.; MARTIN, G. **Development and evaluation of an Earth-System model-HadGEM2**. Geosci Model Dev Discuss. 4(4): 1051, 2011.
- CORREIA, R.R.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; CAMARGO, L.V. **Planorbídeos do estado de São Paulo, sua relação com a esquistossomose**. Arq. Hig. e Saúde Pública, 27(92):139-159, 1962.
- CPTI- **Primeiro Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da UGRHI-17 (“Relatório Zero”). CIERGA, Assis**. Cooperativa De Serviços E Pesquisas Tecnológicas E Industriais, 1999.
- CRANEY, T.A.; SURLES, J.G. **Model-Dependent Variance Inflation Factor Cutoff Values**, Quality Engineering, 14(3):391-403, 2002.
- CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância Epidemiológica. 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 1981 - 2009 - definitivo]**. São Paulo, 2011a. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- CVE - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Esquistossomose [Dados estatísticos, 2008-2010]**. SP, 2011b. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/esquistodados.html>.
- DE JONG, R.J.; MORGAN J.Á.; PARAENSE W.L.; POINTIER J.P.; AMARISTA M.; AYEK-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; 18:2225-2239. 2001.
- DEJONG, R.J.; EMERY, A.M.; ADEMA, C.M. **The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni***. Journal of Parasitology, 90(5):991-997, 2004.
- DEJONG, R.J.; MORGAN, J.A.T.; WILSON, W.D.; AL-JASER, M.H.; APPLETON, C.C.; COULIBALY, G.; MAGALHÃES, L.A. **Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old-World tropics**. Molecular Ecology, 12(11):3041-3056, 2003.
- DESLANDES, N. **Técnica de dissecação e exame de planorbídeos**. Rev. Serv. Espec. Saúde Pública, 4(2):371-382, 1959.
- EDUARDO, M.B.P. **Avaliação da Esquistossomose no Estado de São Paulo. Documento técnico/Relatório de Avaliação**. Secretaria do Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 59, 2008.
- ESCOBAR, J.S.; AULD, J.R.; CORREA, A.C.; ALONSO, J.M.; BONY, Y.K.; COUTELLEC, M.A.; KOENE, J.M.; POINTIER, J.P.; JARNE, P.; DAVID, P. **Patterns of mating-system evolution in**

- hermaphroditic animals: correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction.** *Evolution* 65-5: 1233–1253, 2011.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** *Molecular ecology resources*, 10(3): 564–567, 2010.
- FAN, J.; YUAN, X.; WANG, M.; ZHU, G. **Mapping the potential distribution of the schistosomiasis intermediate host *Biomphalaria straminea* in China.** *Geospatial health*, 13(2):201–208, 2018.
- FERREIRA, J.M.; MEIRA, J.A. **Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do Estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipaçu). Foco autóctone na cidade de Ourinhos.** *Rev. Paul. Med.*, 41(1):15–18, 1952.
- FICK, S.E.; HIJMANS, R.J. **Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas.** *International Journal of Climatology*. <http://www.worldclim.org>. 2017.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3:294–299, 1994.
- FONSECA, F.; FREITAS, C.; DUTRA, L.; GUIMARÃES, R.; CARVALHO, O. **Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression.** *Acta tropica*, 133:56–63, 2014.
- FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T.G. **Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets.** *Systematic biology*, 62(5), 707–724. 2013.
- GAZZINELLI, A.; KLOOS, H. **The use of spatial tools in the study of *Schistosoma mansoni* and its intermediate host snails in Brazil: a brief review.** *Geospatial health*, 2(1):51–58, 2007.
- GETIS, A.; ORD, J.K. **Local spatial statistics: an overview.** In P. Longley and M. Batty (eds) *Spatial analysis: modelling in a GIS environment* (Cambridge: Geoinformation International), 261–277, 1996.
- GETIS, A.; ORD, J.K. **The analysis of spatial association by use of distance statistics.** *Geographical Analysis*, 24:255–66, 1992.
- GITHEKO, A.K.; SCHERAGA, J.D.; WOODWARD, A. **Climate change and human health: risks and responses.** World Health Organization, Geneva, 61–78, 2010.
- GOMES, E.; LEAL-NETO, O.B.; ALBUQUERQUE, J.; DA SILVA, H.; BARBOSA, C.S. **Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco-Brazil.** *International journal of health geographics*, 11(1):1, 2012.
- GOMES, E.C.S.; MESQUITTA, M.C.S.; WANDERLEY, L.B.; MELO, F.L.; BARBOSA, C.S. **Spatial risk analysis on occurrences and dispersal of *Biomphalaria straminea* in and endemic area for schistosomiasis.** *Journal of vector borne diseases*, 55(3):208–214, 2018.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Molecular biology and evolution*. 27(2):221–4, 2010.
- GOLDMAN, M.A. **Chromosomal evolution in planorbid snails of the genera *Bulinus* and *Biomphalaria*.** *Malacol.* 25:427–446, 1984.
- GREGORY, T.R. **Genome size estimates for two important freshwater molluscs, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the schistosomiasis vector snail (*Biomphalaria glabrata*).** *Genome*, 46(5):841–844, 2003.
- GUIMARÃES, R.J.P.S.; FONSECA, F.R.; DUTRA, L.V.; FREITAS, C.C.; OLIVEIRA, G.C.; CARVALHO, O.S. **A Study of Schistosomiasis Prevalence and Risk of Snail Presence Spatial Distributions Using Geo-Statistical Tools,** *Schistosomiasis*, Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, InTech, 2012.
- GUIMARÃES, R.J.P.S.; FREITAS, C.C.; DUTRA, L.V.; FELGUEIRAS, C.A.; MOURA A.C.M.; AMARAL, R.S.; DRUMMOND, S.C.; SCHOLTE, R.G.C.; OLIVEIRA, G.; CARVALHO, O.S. **Spatial distribution of *Biomphalaria* mollusks at Sao Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil, using geostatistical procedures.** *Acta Trop.*, 109:181–186, 2009.
- GUIMARÃES, R.J.P.S.; FREITAS, C.C.; DUTRA, L.V.; SCHOLTE, R.G.C.; MARTINS-BEDÉ, F. T.; FONSECA, F.R.; AMARAL, R.S.; DRUMMOND, S.C.; FELGUEIRAS, C.A.; OLIVEIRA, G.C.O.; CARVALHO, O.S. **A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(4):524–531, 2010.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.** *Systematic biology*, 52(5), 696–704. 2003.

- GÜLLÜOĞLU, C. **FlowMapper v 0.4.1**. [Internet]. QGIS Python Plugins Repository; 2016 [updated 2018]. Disponível em: <https://plugins.qgis.org/plugins/FlowMapper/version/0.4.1/>.
- HABIB, M.R.; GUO, Y.H.; LV, S.; GU, W.B.; LI, X. H.; ZHOU, X.N. **Predicting the spatial distribution of *Biomphalaria straminea*, a potential intermediate host for *Schistosoma mansoni*, in China**. *Geospatial health*, 11(3), 2016.
- HALL, T.A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98, 1999.
- HEBERT, P. D.; RATNASINGHAM, S. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species**. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96, 2003.
- HERBERT, P.D., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proceedings. J. Biol. Sci.*, 270(1512): 313-21, 2003.
- IBGE. **Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010a. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>.
- IBGE. **Setor Censitário 2010**. Mapas, bases e referenciais, bases cartográficas, malhas digitais, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010b. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>.
- IBGE. **Base Contínua 250 mil, Hidrografia**. Mapas, interativos, serviços, serviços do ArcGIS, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010c. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br>.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2017**. Sistema IBGE de recuperação automática: SIDRA. Banco de dados agregados, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017a. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>.
- IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. Sistema IBGE de recuperação automática: SIDRA. Banco de dados agregados, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017b. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6635>.
- IBGE. Estimativas de população residente nos Municípios Brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2018. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018 Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html?=&t=resultados>. Acesso em: 2019.
- IPCC. **Summary for Policymakers**. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2013.
- JANNOTTI-PASSOS, L.K.; SOUZA, C.P.D. **Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction**. *Rev. do Inst. de Medicina Tropical de São Paulo*, 42(5):291-294, 2000.
- JANNOTTI-PASSOS, L.K. Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)(Mollusca: Gastropoda). Belo Horizonte: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.
- 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*, 92(2):401-403, 2006.
- JARNE, P.; VIANEY-LIAUD, M.; DELAY, B. **Selfing and outcrossing in hermaphrodite freshwater gastropods (*Basommatophora*): where, when and why**. *Biol J Linn Soc* 49: 99–125. 1993.
- JONES, C.S.; LOCKYER, A.E.; ROLLINSON, D.; PIERTNEY, S.B.; NOBLE, L.R. **Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni***. *Molecular ecology*, 8(12):2149-2151, 1999.
- KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses (version 1.0. 5)**, 2017.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. **MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization**. *Briefings in Bioinformatics*, 1-7, 2017.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e geo-helmintoses**. Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. *Série Esquistossomose* – 17: 90. 2018.
- KAWAZOE, U.; MAGALHAES, L.A.; HOTTA, L.K.; TAKAKU, L. **Competição biológica entre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835) em criadouros naturais no município de Ourinhos, SP (Brasil)**. *Revista de Saúde Pública*, 14(1):65-87, 1980.

- KEANE, T.M.; CREEVEY, C.; PENTONY, M.M.; NAUGHTON, T.J.; MCLNERNEY, J.O. **Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified.** BMC Evol Biol, 6:29, 2006.
- KNIGHT, M.; MILLER, A.N.; GEOGHAGEN, N.S.M.; LEWIS, F.A.; KERLAVAGE, A.R. **Expressed sequence tags (ESTs) of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*: use in the identification of RFLP markers.** Malacologia, 39(1-2):175-182, 1998.
- KNIGHT, M.; MILLER, A.N.; PATTERSON, C.N.; ROWE, C.G.; MICHAELS, G.; CARR, D.; LEWIS, F.A. **The identification of markers segregating with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(4):1510-1515, 1999.
- KNIGHT, M.; RAGHAVAN, N.; GOODALL, C.; COUSIN, C.; ITTIPRASERT, W.; SAYED, A.; BAYNE, C.J. ***Biomphalaria glabrata* peroxiredoxin: effect of *Schistosoma mansoni* infection on differential gene regulation.** Molecular and biochemical parasitology, 167(1):20-31, 2009
- KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. **Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis.** Journal of the American Statistical Association, 260:47, 1952.
- KULLDORFF, M. **A spatial scan statistic.** Commun Stat A- Theor 26:1481-1496, 1997.
- KULLDORFF, M. **SatScan Version 9.4. SaTScan Manual do Usuário.** Tradução, Pellini, A.C.G. Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Care Institute, Boston, MA, USA. 2016.
- KULLDORFF, M. **SaTScan-Software for the spatial, temporal, and space-time scan statistics.** Boston: Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health Care, <http://www.satscan.org/>, 2015.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; L.I.M.; KNYAZ C.; TAMURA, K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms,** Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549. 2018.
- LANGAND, J.; THÉRON, 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.** Journal of Molluscan Studies, 65(4):425-433, 1999.
- LEHNER, B.; VERDIN, K.; JARVIS, A. **HydroSHEDS Technical Documentation.** World Wildlife Fund US, Washington, DC, 2006. Disponível em:<<http://hydrosheds.cr.usgs.gov>>.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics. 25 (11):1451-1452, 2009.
- LORENZ, C.; AZEVEDO, T.S.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B.S.; CHIARAVALLI-NETO, F.; SUESDEK, L. **Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 11(9):e0005959, 2017.
- LOTWICK, H.W.; SILVERMAN, B.W. **Methods for analyzing spatial processes of several types of points.** J R Stat Soc. 44:406-413, 1982.
- MAGALHÃES, L. A.; DIAS, L.C. de S. **Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP).** Rev. Saúde públ., S. Paulo, 7:295-7, 1973.
- MALEK, E.A.; FILE, S.K. **Electrophoretic studies on the digestive gland esterases of some *Biomphalarid* and *Lymnaeid* snails.** Bull. W.H.O. 45:819, 1971.
- MARENGO, J.A.; CHOU, S.C.; KAY, G.; ALVES, L.M.; PESQUERO, J.F.; SOARES, W.R.; CHAGAS, D.J. **Development of regional future climate change scenarios in South America using the Eta CPTEC/HadCM3 climate change projections: climatology and regional analyses for the Amazon, São Francisco and the Paraná River basins.** Climate Dynamics, 38(9-10), 1829-1848, 2012.
- MARENGO, J.A. **O futuro clima do Brasil.** Revista USP. (103):25-3, 2014.
- MASCARA, D.; MORGANTE, J.S. **Enzyme polymorphism and genetic structure of *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda, Planorbidae) populations: founder effect.** Rev. bras. genét, 14(3): 631-44, 1991.
- MAVÁREZ, J.; AMARISTA, M.; POINTIER, J-P.; JARNE, P. **Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *B. glabrata*.** Mol. Ecology, 9:1009-1011, 2000.
- MAVÁREZ, J.; POINTIER, J-P.; DAVID, P.; DELAY, B.; JARNE, P. **Genetic differentiation, dispersal and mating system in the schistosome-transmitting freshwater snail *Biomphalaria glabrata*.** Heredity, 89:258-265, 2002.
- MEDRONHO, R.D.A. **Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença.** In Política de Saúde. Vol. 15, CICT., 1995.
- MELO, C.I.P.; CARVALHO, J.C.; CAMARGOS, L.D.M.M.; FILGUEIRAS, J.A.R. **Glossário de Termos Relacionados à Gestão de Recursos Hídricos.** I Oficina do Sistema Estadual de Informações sobre Recursos Hídricos, 2008.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **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. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas.** – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 13-20, 2014.
- MINN, M. **MMQGIS.** A collection of QGIS vector layer operation plugins. 2018. Disponível em: <http://michaelminn.com/linux/mmqgis/>
- MOSER, W.; GRETER, H.; SCHINDLER, C.; ALLAN, F.; NGANDOLO, B.N.; MOTO, D.D.; ZINSSTAG, J. **The spatial and seasonal distribution of *Bulinus truncatus*, *Bulinus forskalii* and *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host snails of schistosomiasis, in N'Djamena, Chad.** *Geospatial health*, 9(1):109-118, 2014.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** In *Methods in enzymology*. Academic Press, 155: 335-350, 1987.
- MULVEY, M.; VRIJENHOEK, R.C. **Genetic variation among laboratory strains of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*.** *Biochemical Genetics*, 19(11-12), 1169-1182. 1981.
- 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*, 31(6):1195-1200, 1982.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics.** Columbia University. Press, New York, 1987.
- NEMENYI, P.B. **Distribution-free Multiple Comparisons.** PhD thesis, Princeton University, 1963.
- NOYA, O.; KATZ, N.; POINTIER, J.P.; THERON, A.; DE NOYA, B.A. **Schistosomiasis in America. In: Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean.** Springer Vienna, 11-43, 2015.
- 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. 230, 2010.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. **'Vegan' Community Ecology Package.** R package 2.3–0. 2015. <https://github.com/vegandevs/vegan>.
- OPAS-ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Uso de los Sistemas de Información Geográfica en Epidemiología (SIG-EPI).** *Boletín epidemiológico*, 17(1):1-6, 1996.
- ORD, J.K.; GETIS A. **Local spatial autocorrelation statistics: distributional issues and an application.** *Geographical Analysis*, 27:286-306, 1995.
- PAHO. **Control and elimination of five neglected diseases in Latin America and the Caribbean, 2010-2015: analysis of progress, priorities and lines of action for Lymphatic filariasis, Schistosomiasis, Onchocerciasis, Trachoma and Soil-transmitted helminthiasis.** Washington, DC. Pan American Health Organization. 96 p, 2010.
- PALASIO, R.G.S.; GUIMARÃES, M.C.A.; OHLWEILER, F.P.; TUAN, R. **Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil.** *ZooKeys*, 668:11, 2017.
- PALASIO, R.G.S.; ZANOTTI-MAGALHÃES E.M.; TUAN, R. **Genetic diversity of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Hygrophila: Planorbidae) across two coastal areas of southeast Brazil.** *Folia Malacologica*, 26(4):221-229, 2018.
- PALUMBI, S.R.; MARTIN, A.P.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. **The Simple Fool's Guide to PCR.** Depart. of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, 1991.
- PARAENSE, W.L. ***Biomphalaria occidentalis* sp.n. from South América (Mollusca Basommatophora Pulmonata).** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 76(2):199-211, 1981.
- PARAENSE, W.L. **Distribuição dos caramujos no Brasil.** *An. Acad. Mineira Med.*, 14:117-128, 1986.
- PARAENSE, W.L. **Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros.** *Arq Mus Nac*, 55:105-128, 1975.
- PARAENSE, W.L. **Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 53(2-3-4):277-291, 1955.
- PARAENSE, W.L. **The schistosome vectors in the Americas.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96, suppl.:7-16, 2001.
- PEDERSEN, U.B.; STENDEL, M.; MIDZI, N.; MDULUZA, T.; SOKO, W.; STENSGAARD, A.S.; KRISTENSEN, T.K. **Modelling climate change impact on the spatial distribution of fresh water snails hosting trematodes in Zimbabwe.** *Parasites & vectors*, 7(1):1-12, 2014.
- PAGE, R.D. **TreeView.** Glasgow University, Glasgow, UK. 2001.

- PEREZ, M.D.; SANTOS, M.R. **Contribuições ao levantamento da carta planorbídica do Estado de São Paulo: pesquisa de focos com formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*. I: Área da bacia dos córregos Matão e Jacu, tributário do Rio Pari (Vale do Paranapanema).** Revista Paulista de Medicina. 68(8):348, 1966.
- PEREZ, M.D.; SANTOS M.R.; ISHIHATA, J.K. **Contribution to the survey of the Planorbis map in the State of São Paulo; investigation of centres of *Schistosoma mansoni* infection in its evolutionary form. III. Hydrographic area of Assis-Cândido Mota (Paranapanema Valley).** Hospital, Rio de Janeiro. 74:495-507, 1968.
- PERON, A.F.; PIROLI, E.L. **Projeto APPs: Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo, CEDIAP-GEO.** Centro de Estudo e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento 1th ed. 23, 2011.
- PHILLIPS, S.J.; DUDÍK, M. **Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation.** Ecography. 31:161-175. 2008.
- PHILLIPS, S.J.; ANDERSON, R.P.; SCHAPIRE, R.E. **Maximum entropy modeling of species geographic distributions.** Ecological Modelling, Amsterdam, 190:231-259, 2006.
- PINTO, H.A.; GRIFFIN, M.J.; QUINIOU, S.M.; WARE, C.; MELO, A.L. ***Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus spp.* (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study.** Parasitology research, 115(1):51-62, 2016.
- PIROLI, E.L. **Geoprocessamento Aplicado ao Estudo do Uso da Terra das Áreas de Preservação Permanente dos Corpos d'água da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo** (Tese de doutorado para obtenção de Livre docência. UNESP-Universidade Estadual Paulista/SP). 2013.
- PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S. **Planorbídeos do Estado de São Paulo: sua relação com a esquistossomose.** Arq. Hig. 1962.
- PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S. **Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo.** Arq. Hig. 25(86):261-271. 1960.
- PIZA, J.D.T.; RAMOS, A.D.S.; MORAES, L.D.C.; CORRÊA, R.D.R.; TAKAKU, L.; PINTO, A.D.M. **Carta planorbídica do Estado de São Paulo.** São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Campanha de Combate à Esquistossomose, CACEsq, sd, 1972.
- POINTIER, J.P.; JJD, P.; JARNEA, P. **Biological invasions: the case of planorbid snails.** Journal of Helminthology, 79:249-256, 2005.
- PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. **ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation.** Molecular ecology, 21(8):1864-1877, 2012.
- QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Version 2.18.22** Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project, 2018. Disponível em: <<http://www.qgis.org/>>.
- QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. **Experimental design and data analysis for biologists.** Cambridge University Press, Melbourne, 2002.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2015.
- RAMOS, A.S.; PIZA, J.T. **Sobre os trabalhos da campanha de combate à esquistossomose no Estado de São Paulo, Brasil.** Revista de Saúde Pública, 5(2):263-272, 1971.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D. **BOLD: The Barcode of Life Data System.** Molecular ecology notes, 7(3):355-364, 2007. Disponível em:<<http://www.barcodinglife.org>>
- RENNÓ, C.D.; NOBRE, A.D.; CUARTAS, L.A.; SOARES, J.V.; HODNETT, M.G.; TOMASELLA, J.; WATERLOO, M.J. **HAND, a new terrain descriptor using SRTM-DEM: Mapping terra-firme rainforest environments in Amazonia.** Remote Sensing of Environment 112: 3469-81, 2008.
- REY, L. **Primeiro encontro de planorbídeos naturalmente infestados por furcocercárias de *S. mansoni* no planalto paulista (Ourinhos).** Rev. Clín. S. Paulo, 28:57-64, 1952.
- ROLLEMBERG, C.V.V.; SANTOS, C.M.B.; SILVA, M.M.B.L.; SOUZA, A.M.B.; SILVA, Â.M.; ALMEIDA, J.A.P.; ALMEIDA, R.P.E.; JESUS, A.R. **Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helmintos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose.** Rev. Soc Bras Med Trop, 44(1):91-96, 2011.
- RUMI, A.; VOGLER, R.E.; BELTRAMINO, A.A. **The South-American distribution and southernmost record of *Biomphalaria peregrina*—a potential intermediate host of schistosomiasis.** PeerJ, 5:3401, 2017.

- ROSSI, M. **Mapa Pedológico Do Estado De São Paulo: Revisado E Ampliado**. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, 1:118. 2017. Disponível em: <<http://iflorestal.sp.gov.br/2017/09/26/mapa-pedologico-do-estado-de-sao-paulo-revisado-e-ampliado/>>.
- SAFRE, A.L.S.; MANZIONE, R.L. **Estimativa da precipitação na bacia do Rio Pardo no verão 2013/14 e seus efeitos nos municípios da UGRHI-17**. Anais XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, João Pessoa-PB, Brasil, 25 a 29 de abril de 2015, INPE
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science, 239(4839):487-491, 1988.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science, 230(4732):1350-1354, 1985.
- SANTOS, A.D.D.; LIMA, A.C.R.; SANTOS, M.B.; ALVES, J.A.B.; GÓES, M.A.D.O.; NUNES, M.A.P.; ARAÚJO, K.C.G.M.D. **Spatial analysis for the identification of risk areas for schistosomiasis mansoni in the State of Sergipe, Brazil, 2005-2014**. Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 49(5):608-615, 2016.
- 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): 95-101, 2012.
- SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. **Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference**. Molecular biology and evolution, 16(8), 1114-1114. 1999.
- SIMOONGA, C.; UTZINGER, J.; BROOKER, S.; VOUNATSOU, P.; APPLETON, C.C.; STENSGAARD, A.S.; OLSEN, A.; KRISTENSEN, T.K. **Remote sensing, geographical information system and spatial analysis for schistosomiasis epidemiology and ecology in Africa**. Parasitology 136:1683-1693, 2009.
- SINAN Net. **Casos confirmados por Autóctone Mun. Res. segundo Munic. Notificado, UF Notificação: São Paulo, Período de 2011-2014**[Tabulações de dados – a partir de 2007 - esquistossomose]. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde/SVS, 2018.
- SMA. **Rede de drenagem do Estado de São Paulo obtida a partir da basedo gisat (cartas topográficas na escala 1:50.000) por processo automático - coordenadoria de planejamento ambiental**. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. 2013a.
- SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; NETO, E.D.; CAPP, S.M.G.; CARVALHO, O.S. **Study of *Biomphalaria tenagophila*, *B. t. guibensis* and *B. occidentalis* by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Enzyme Digestion of the Ribosomal RNA Intergenic Spacer Regions**. J. Mollus. Stud. 65(2):143-149; 1999.
- STANDLEY, C.J.; GOODACRE, S.L.; WADE, C.M.; STOTHARD, J.R. **The population genetic structure of *Biomphalaria choanomphala* in Lake Victoria, East Africa: implications for schistosomiasis transmission**. Parasites & vectors, 7(1):524, 2014.
- STENSGAARD, A.S.; VOUNATSOU, P.; SENGUPTA, M.E.; UTZINGER, J. **Schistosomes, snails and climate change: Current trends and future expectations**. Acta tropica. 190:257-268, 2019.
- STENSGAARD, A.S.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P.; HÜRLIMANN, E.; SCHUR, N.; SAARNAK, C.F.L.; MUSHINGE, G.; SIMOONGA, C.; KABATEREINE, N.B.; TCHUEM TCHUENTÉ, L.A.; RAHBEK, C.; KRISTENSEN, T.K. **Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter?** Acta Trop, 2013.
- SUCEN, **Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do período de 1979-1980, do serviço Regional 11 - Marília**. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias. 1980.
- SUCEN, **Boletim do Sistema de Vigilância Epidemiológico do período de 2009-2012, do serviço Regional 11 - Marília**. Programa de Controle da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias, 2012.
- TEIXEIRA-NETO, R.G.; SILVA, E.S.; NASCIMENTO, R.A.; BELO, V.S.; OLIVEIRA, C.D.L.; PINHEIRO, L.C.; GONTIJO, C.M. F. **Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis**. Parasites & vectors, 7(1):485, 2014.
- TELES, H.M.S, **Ecological aspects of *Biomphalaria* Preston, 1910 in the State of Sao Paulo, Brazil. I. Syntopia**. Cienc. Cult. 40(4):374-379. 1988.

- TELES, H.M.S.; VAZ, J.F.; GLASSER, C.M.; CIARAVOLO, R.M.C. **Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo: 2ª Região Administrativa.** Ciênc. cult. (São Paulo), 40(11):1112-7, 1988
- TELES, H.M.S.; MARQUES, C.C.A. **Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae).** Revista de Saúde Pública, 23(1):76-8, 1989.
- TELES, H.M.S.; VAZ, J.F. **Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no estado de São Paulo, Brasil.** Rev. Saúde públ, 508-12, 1987.
- TELES, H.M.S. **Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao sul da região Neotropical, Brasil.** Rev. Saúde Pública, 30, 341-349, 1996.
- 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], 38(5):426-432, 2005.
- TELES, H.M.S. **Distribution of *Biomphalaria tenagophila* and *B. occidentali* in S. Paulo State, Brazil.** Revista de Saúde Pública, 23(3):244-253, 1989.
- TENNESSEN, J.A.; BONNER, K.M.; BOLLMANN, S.R.; JOHNSTUN, J.A.; YEH, J.Y.; MARINE, M.; BLOUIN, M.S. **Genome-wide scan and test of candidate genes in the snail *Biomphalaria glabrata* reveal new locus influencing resistance to *Schistosoma mansoni*.** PLoS neglected tropical diseases, 9(9):e0004077, 2015.
- TEODORO, T.M.; JANOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L. **Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda).** Mol. Phylogenetics and Evolution, 57(1):144-151, 2010.
- THIELE, E.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, G.; GAZZINELLI, A.; MINCHELLA, D.J. **Elucidating the temporal and spatial dynamics of *Biomphalaria glabrata* genetic diversity in three Brazilian villages.** Tropical Medicine & International Health, 18(10):1164-1173, 2013.
- 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], 96(3):435-436, 2001.
- TUAN, R.; SANTOS, P. **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. 30(1):139-144, 2007.
- TUAN, R.; SIMÕES, L.C.G. **Spermatogenesis and desiccation in *Biomphalaria tenagophila* (orbigny, 1835) (gastropoda, planorbidae).** Rev. Brasil. Genet. 12(4):881-885, 1989.
- TUAN, R. **Diversidade e distribuição de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.** Biota Neotrop. 9(1), 2009.
- 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.** In: Schistosomiasis. Tehran, Iran, Intech, 2012.
- TUAN, R.; SIMÕES, L.C.G.; KAWANO, T. **Estudo sobre poliploidia e meiose em *Biomphalaria glabrata*.** Ciênc. Cult. (Supl.) 36:843, 1984.
- VALERIANO, M.M.; ROSSETTI, D.F. **Topodata: Brazilian full coverage refinement of SRTM data.** Applied Geography, 32:300-309, 2011. Disponível em: <<http://www.dsr.inpe.br/topodata>>.
- VAZ, J.F. **Distribuição e dispersão de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda-Pulmonata).** Ciênc. cult. (São Paulo), 41(1):14-27, 1989.
- VAZ, J.F.; ELMOR, M.R.D.; GONCALVES, L.M.C. **Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo. 8ª região administrativa (grande área de São José do Rio Preto).** Rev. Inst. de Med. Trop. de São Paulo, 34(6):527-534, 1992.
- VAZ, J.F.; ELMÔR, M.R.D.; GONÇALVES, L.M.C.; ISHIHATA, G.K. **Resultados do levantamento planorbídico da área de presidente prudente—Estado de São Paulo.** Revista do Inst. de Med. Trop. de São Paulo, 25(3):120-126, 1983.
- VAZ, J.F.; MANTEGAZZA, E.; TELES, H.M.S.; MORAIS, L.V.C.; VAZ, J. **Levantamento planorbídico do estado de São Paulo (Brasil): 4ª região administrativa.** Rev. de saúde pública, 21(5):371-379, 1987.
- VAZ, J.F.; TELES, H.M.; LEITE, S.P.; CORRÊA, M.A.; FABBRO, A.L.D.; ROSA, W.S. **Levantamento planorbídico do estado de São Paulo: sexta região administrativa.** Rev. Saúde Pública, 20, 358-61, 1986.
- VAZ, J.F.; TELES, H.M.S.; TAKAKU, L. **Levantamento planorbídico do estado de São Paulo; 7ª região Administrativa.** Ciênc. cult. (São Paulo), 37(12):2057-2062, 1985.
- VERNON, J.G.; JONES, C.S.; NOBLE, L.R. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilisation in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora).** Journal of Molluscan Studies, 61(4), 455-465, 1995.

- VIANEY-LIAUD, M. **La reproduction chez un mollusque hermaphrodite simultané, la planorbe *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gasteropode, Pulmone)**. *Haliotis* 27: 67–114, 1997.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; NETO, E.D.; CARVALHO, O.D.; SIMPSON, A.J. ***Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis**. *Experimental Parasitology*, 79(2):187-194, 1994.
- 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* 121:611-620, 2000.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; COSCARELLI, D.; MONTRESOR, L.C. **Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives**. *Lundiana* 11(1/2):47-63, 2013.
- 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):351-353, 2004a.
- 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]. 97(suppl.1), 2002.
- 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*; 99:153-158. 2004b.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; SPATZ, L.; NUNES, D.N.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S.; 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.
- VINE, M. F.; DEGNAN, D.; HANCHETTE, C. **Geographic Information Systems: Their use in environmental epidemiologic research**. *Environ Health Perspect*, 105:598-605, 1997.
- WALLER L.A.; GOTWAY C.A. **Applied Spatial Statistics for Public Health Data**. New Jersey, John Wiley & Sons, 2004.
- WETHINGTON, A.R.; ZAVODNA, M.; SMITH, M.K.; OLIVEIRA, G.; LEWIS, F.; MINCHELLA, D.J. **Population genetic structure of *Biomphalaria glabrata* in a schistosomiasis-endemic region in Brazil**. *Journal of Molluscan Studies*,73(1):45-52, 2007.
- WHO. **Schistosomiasis: progress report 2001-2011 and strategic plan 2012-2020**. World Health Organization. 2013.
- WHO. **Schistosomiasis: status of schistosomiasis endemic countries: 2017**. World Health Organization, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html>. Acessado em: 2018.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 580, 1978.
- WOODRUFF, D.S.; MULVEY, M.; YIPP, M.W. **Population genetics of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong: a neotropical schistosome-transmitting snail recently introduced into China**. *Journal of heredity*. 76(5):355-360, 1985.
- XIMENES, A.C. **Mapas auto-organizáveis para a identificação de ecorregiões do interflúvio Madeira-Purus: uma abordagem da biogeografia ecológica. (INPE-15332-TDI/1372)**. Dissertação de Mestrado em Sensoriamento Remoto, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos. 155, 2008. Disponível em: <<http://urlib.net/sid.inpe.br/mte-m18@80/2008/08.18.14.02>>.
- YANG, Y.; CHENG, W.; WU, X.; HUANG, S.; DENG, Z.; ZENG, X.; ZHOU, Y. **Prediction of the potential global distribution for *Biomphalaria straminea*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni***. *PLoS neglected tropical diseases*. 12(5):e0006548, 2018.
- ZABURLÍN, N. M.; VOGLER, R.E.; MOLINA, M.J.; LLANO, V.M. **Potential distribution of the invasive freshwater dinoflagellate *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans (Dinophyta) in South America**. *Journal of Phycology*, 52(2), 2016.
- ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A. **A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements**. *Bioinformatics*, 29(22): 2869–2876. 2013.
- ZHANG, S.M.; BU, L.; LAIDEMITT, M.R.; LU, L.; MUTUKU, M.W.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S. **Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria***,

- obligatory hosts of the human-infecting blood fluke, *Schistosoma mansoni*.** Scientific reports, 8(1), 7341. 2018.
- ZIMMERMAN, D.L.; FANG, X.; MAZUNDAR, S.; RUSHTON, G. **Modeling the probability distribution of positional errors incurred by residential address geocoding.** Int J Health Geogr. 6(1), 2006.
- ZUUR, A.T.; LUNDBYE-JENSEN, J.; LEUKEL, C.; TAUBE, W.; GREY, M.J.; GOLLHOFER, A.; NIELSEN, J.B. **Contribution of afferent feedback and descending drive to human hopping.** J Physiol, 588(5):799–807. 2010.
- ZWIEFELHOFER D.B. **Batch Geocoding** [Internet]. Find Latitude and Longitude, 2008 [updated 2017]. Disponível em: <http://www.findlatitudeandlongitude.com/batch-geocode/>.

9 ANEXO

9.1 ANEXO A

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Padrão de distribuição da diversidade genética molecular e espacial de Biomphalaria e sua relação com a ocorrência da esquistossomose, região do médio Paranapanema, Estado de São Paulo"

Pesquisador: RAQUEL GARDINI SANCHES PALASIO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53559816.0.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.501.688

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Abril de 2016

Assinado por:
Maria Regina Alves Cardoso
(Coordenador)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7779 **E-mail:** coep@fsp.usp.br

ANEXO A I - Carta de ética

[Home](#)
[Author](#)
[Review](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Manuscript ID RSBMT-2018-0447

Title "Schistosomiasis in the in Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil: Does it matter today for Public Health?"

Authors Palasio, Raquel
Bortoleto, Aline
Rosa-Xavier, Iara
Andrighetti, Maria
Tuan, Roseli
Chiaravalloti Neto, Francisco

Date Submitted 17-Oct-2018

[Author Dashboard](#)



Raquel Gardini Sanches Palasio <raquelpalasio@usp.br>

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - Decision on Manuscript ID RSBMT-2018-0447,R1

Dalmo Correia <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Reply-To: dalmo.filho@ufm.edu.br
To: raquelpalasio@usp.br

Wed, May 8, 2019 at 11:10 AM

08-May-2019

Dear Dr, Palasio:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Schistosomiasis in the Middle Paranapanema river region, state of São Paulo, Brazil: Does it matter today for Public Health?" in its current form for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

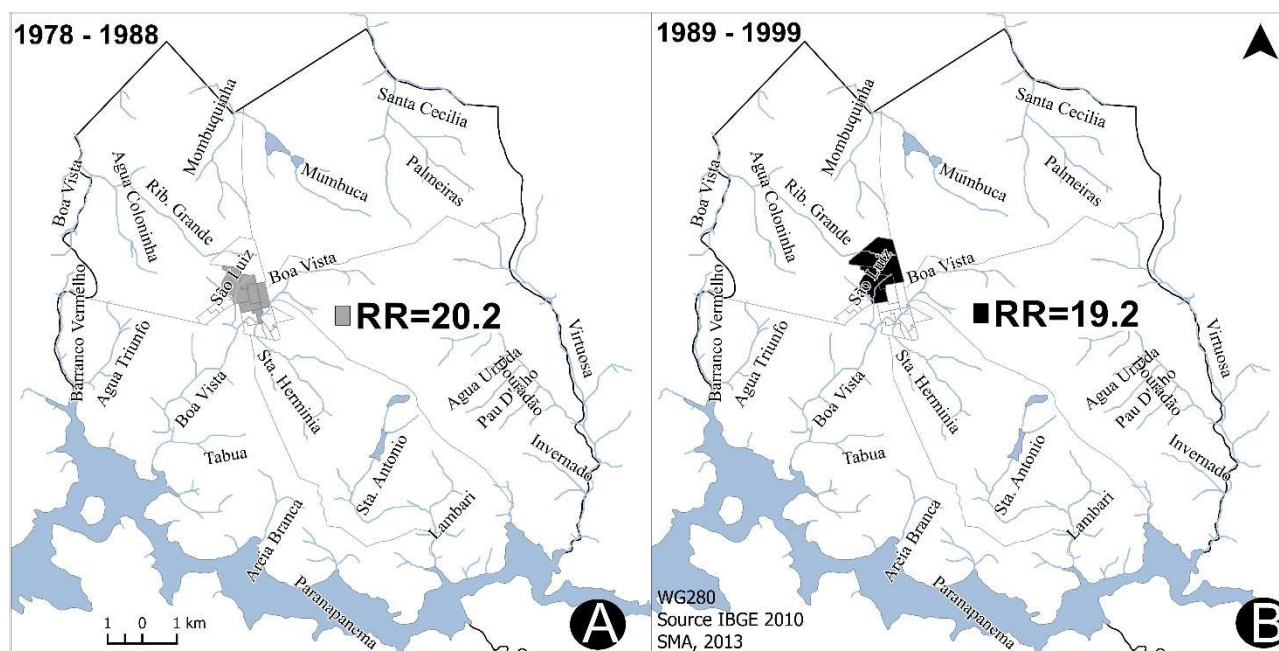
In accordance with the journal's rules (<http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/viinstruc.htm>), I kindly ask that you and your co-authors sign the attached Copyright Assignment Form and return it by e-mail in PDF format as soon as possible to continue with the publication process.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

(Person not available)

Sincerely,
Prof. Dalmo Correia
Editor-in-Chief, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

ANEXO A II - Comprovante submissão e aceite para publicação do Artigo 1



ANEXO A III - Mapas do município de Ipauçu, São Paulo, Brasil com aglomerados espaciais de casos importados (■), no período de 1978-1988 (A) e aglomerados de casos autóctones (■) no período de 1989-1999 (B); as principais coleções hídricas são apresentadas.

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Biota Neotropica

Manuscript ID

BN-2019-0746

Title

Biodiversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated limnic mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools.

Authors

Palasio, Raquel

Xavier, lara

Chiaravalloti-Neto, Francisco

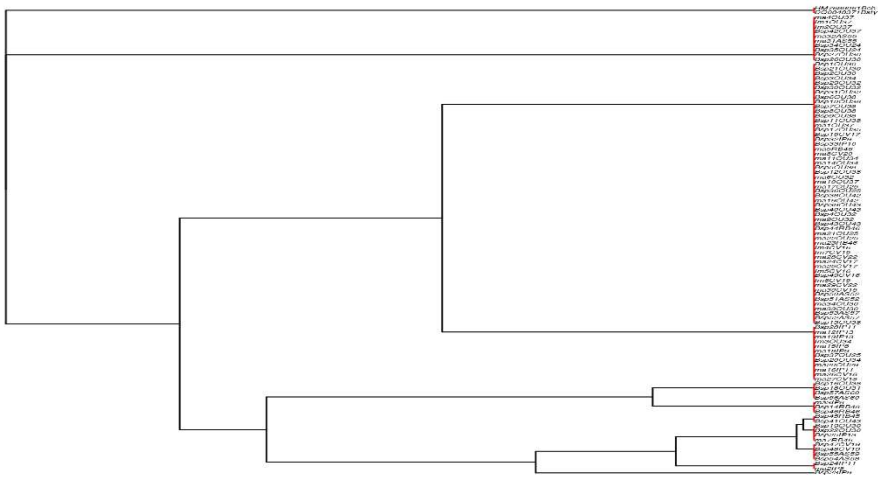
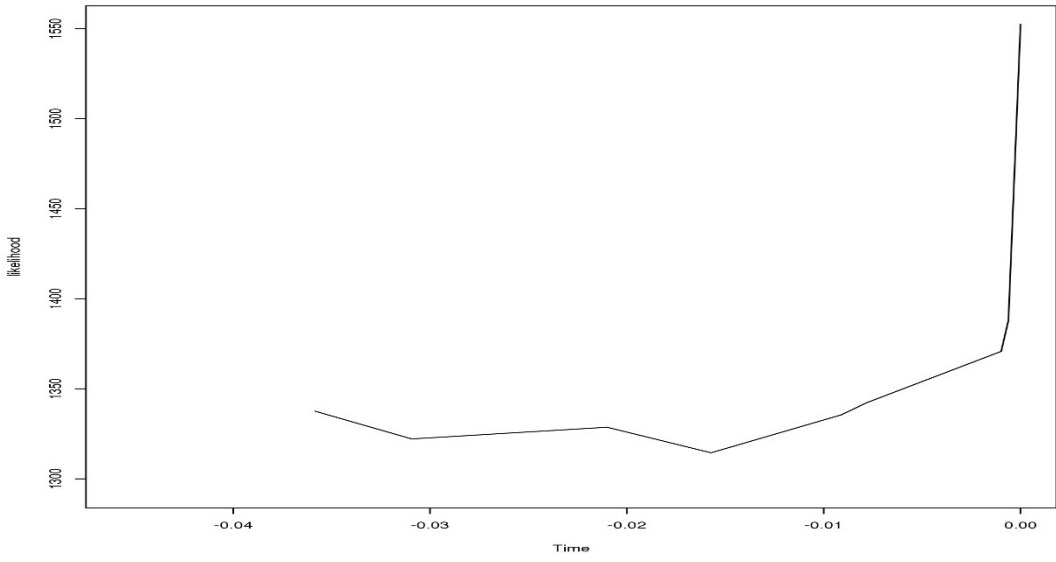
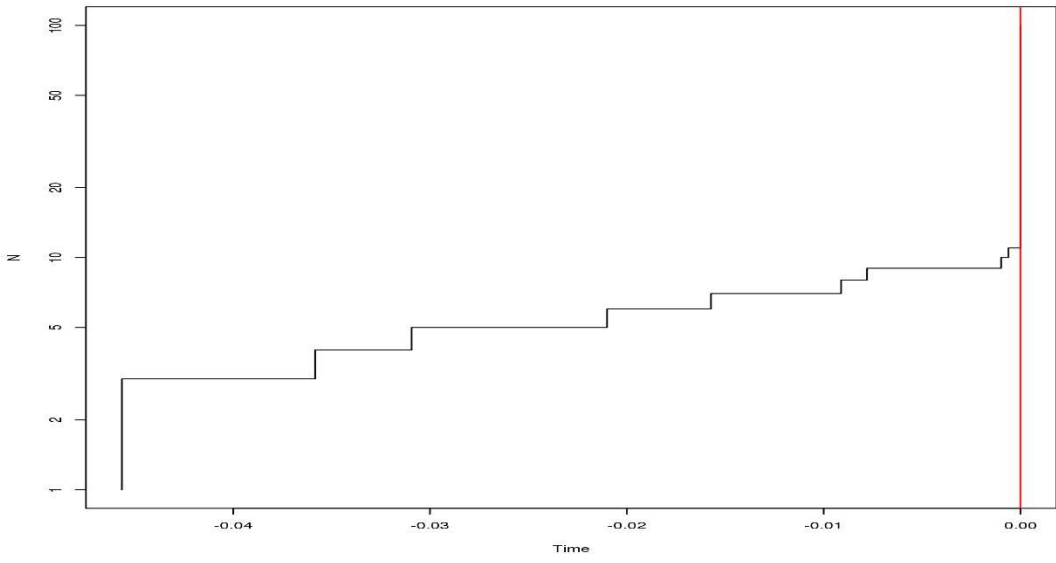
Tuan, Roseli

Date Submitted

18-Feb-2019

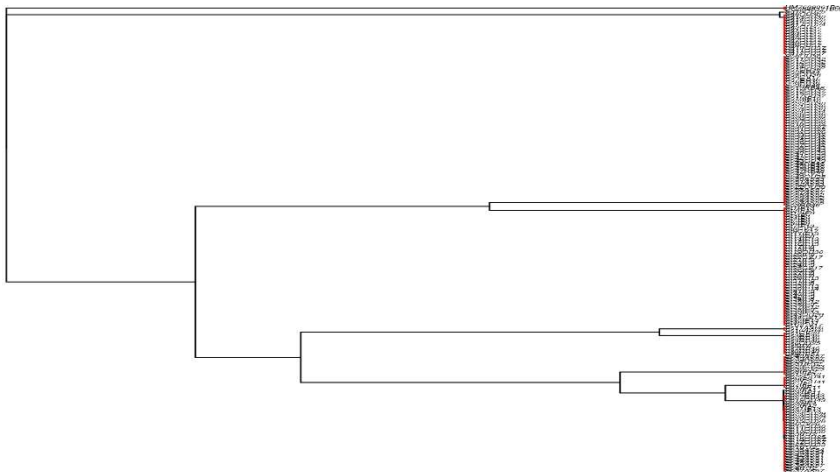
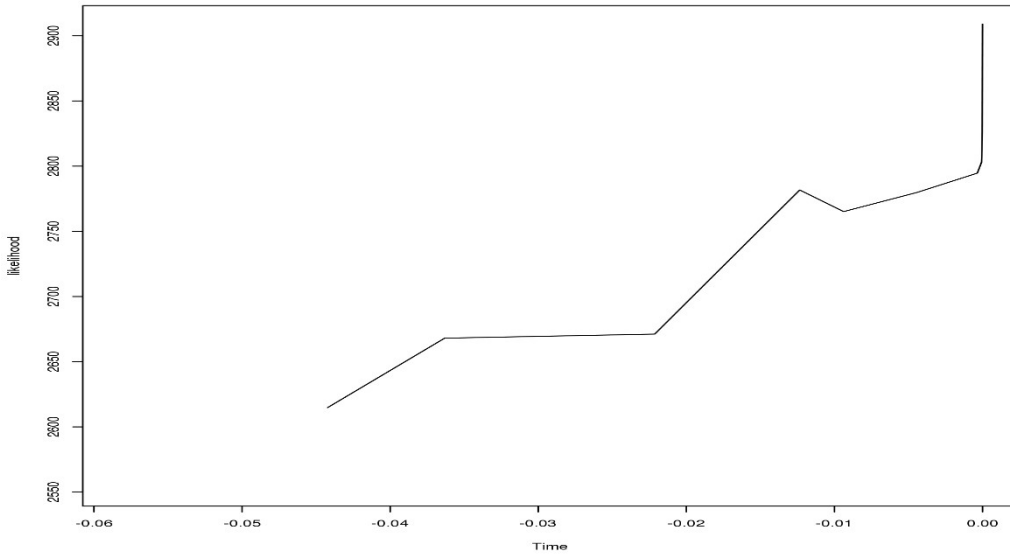
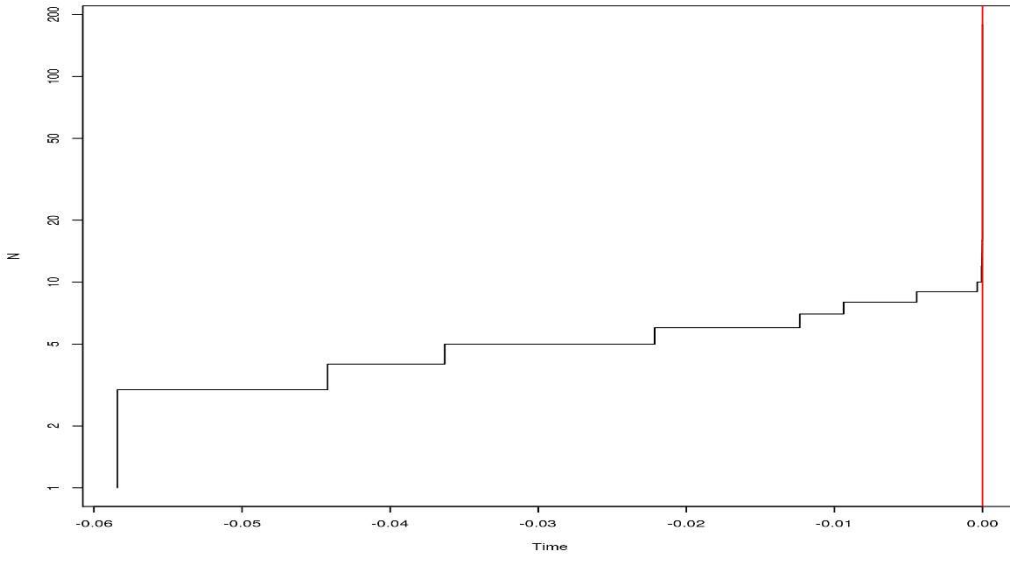
[Author Dashboard](#)

GMYC N=100

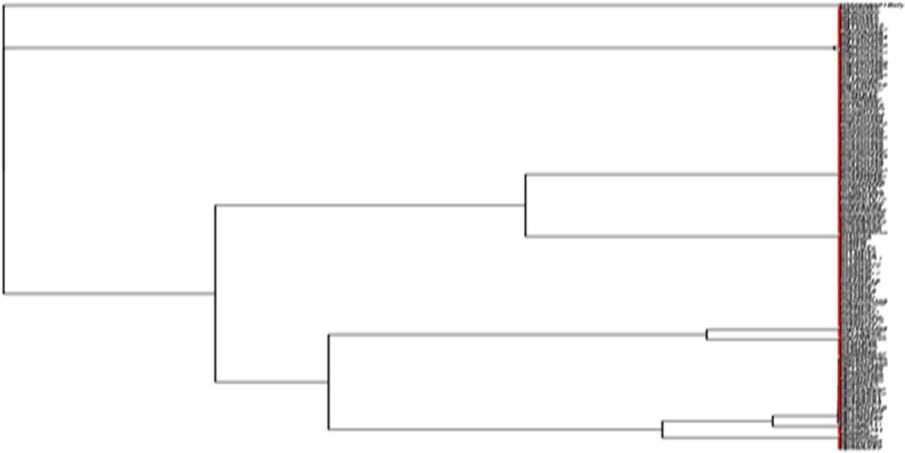
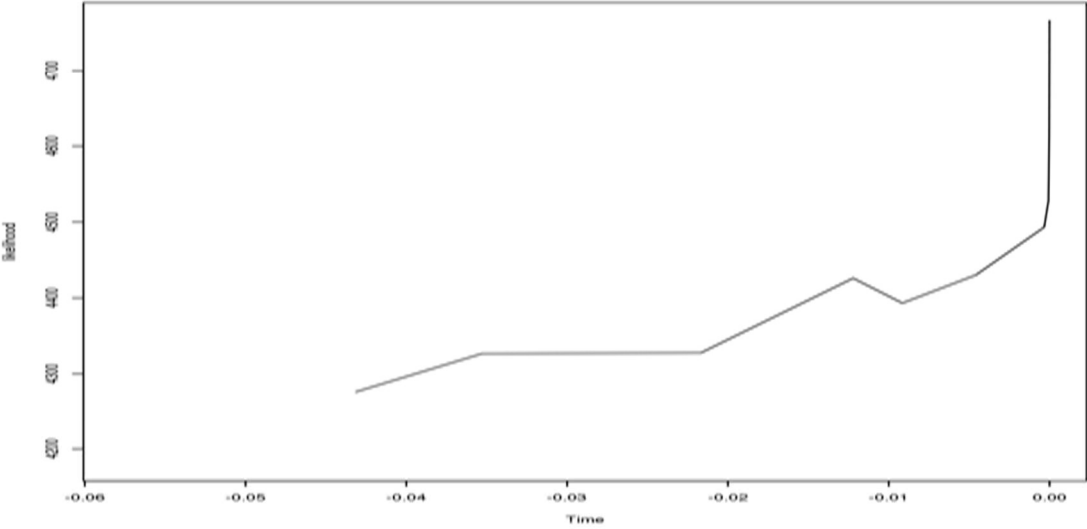
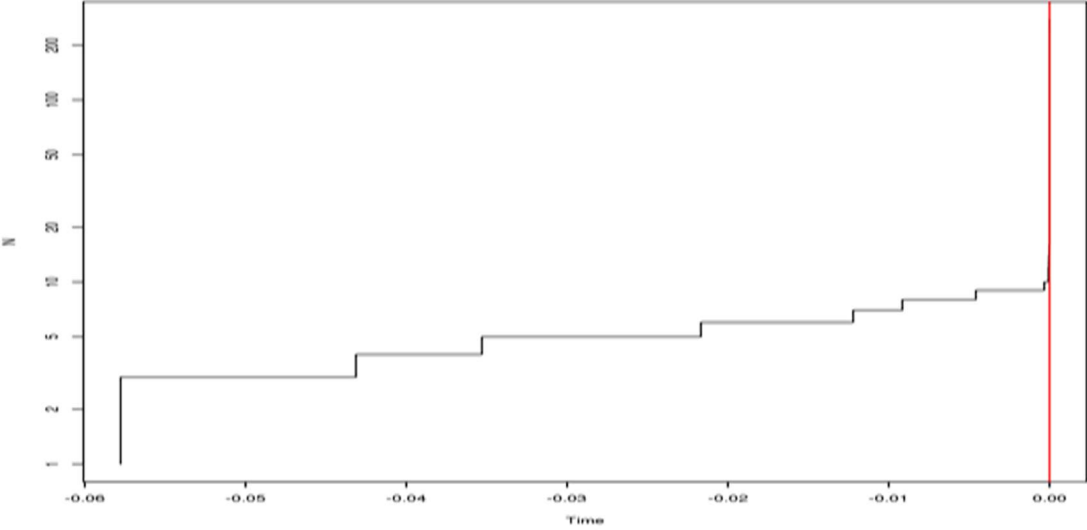


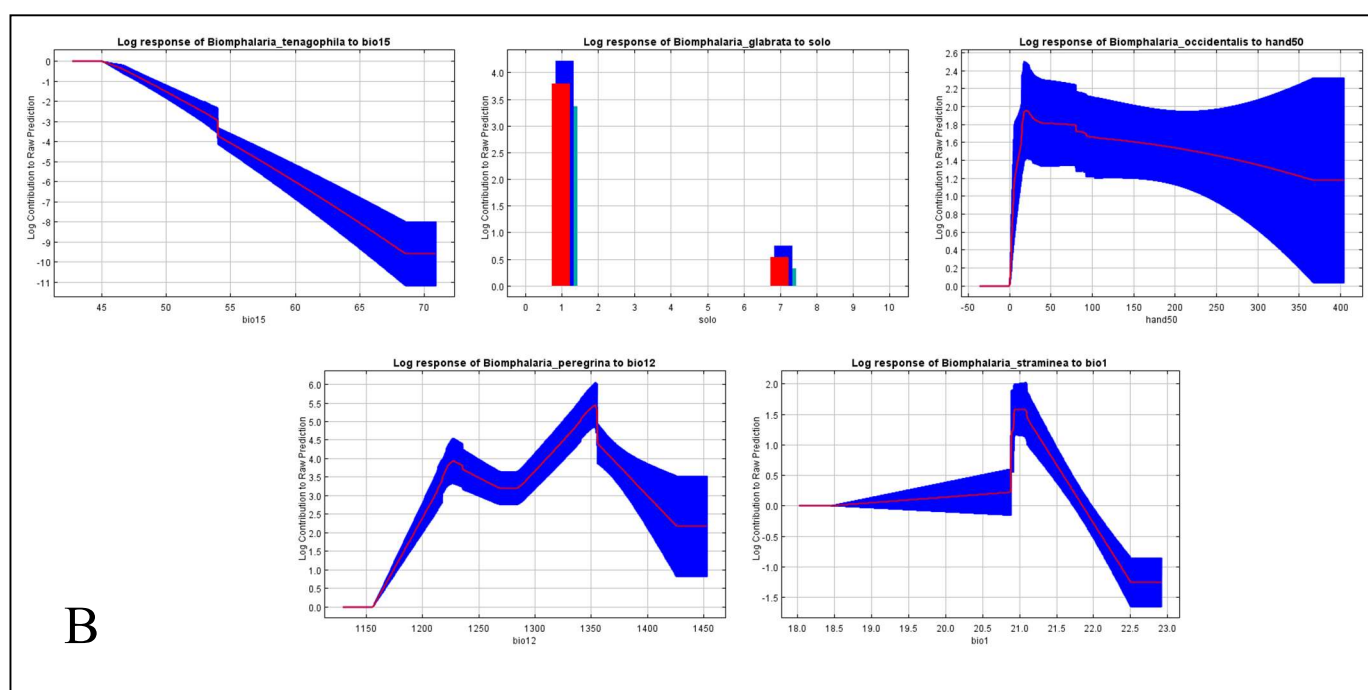
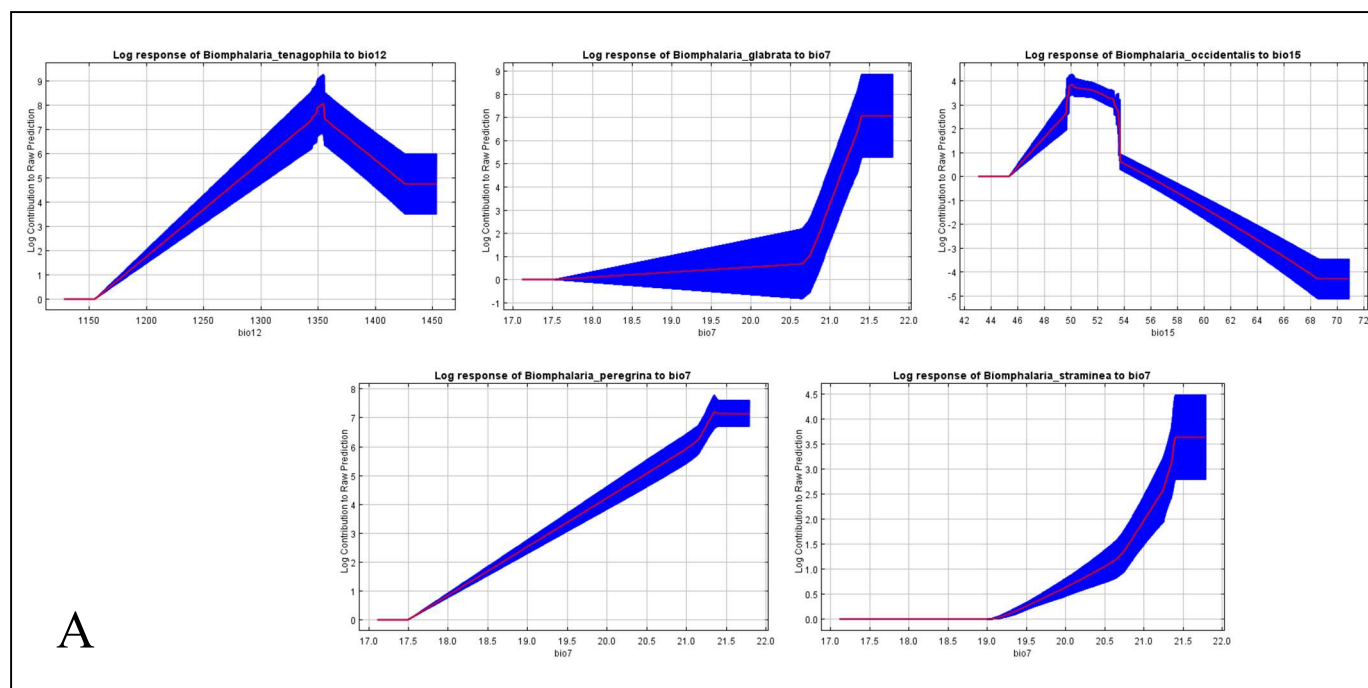
ANEXO A V - Teste do DNA Barcode GMYC

Continuação da ANEXO A IV
GMYC N =179



Continuação da ANEXO A IV
GMYC N=277

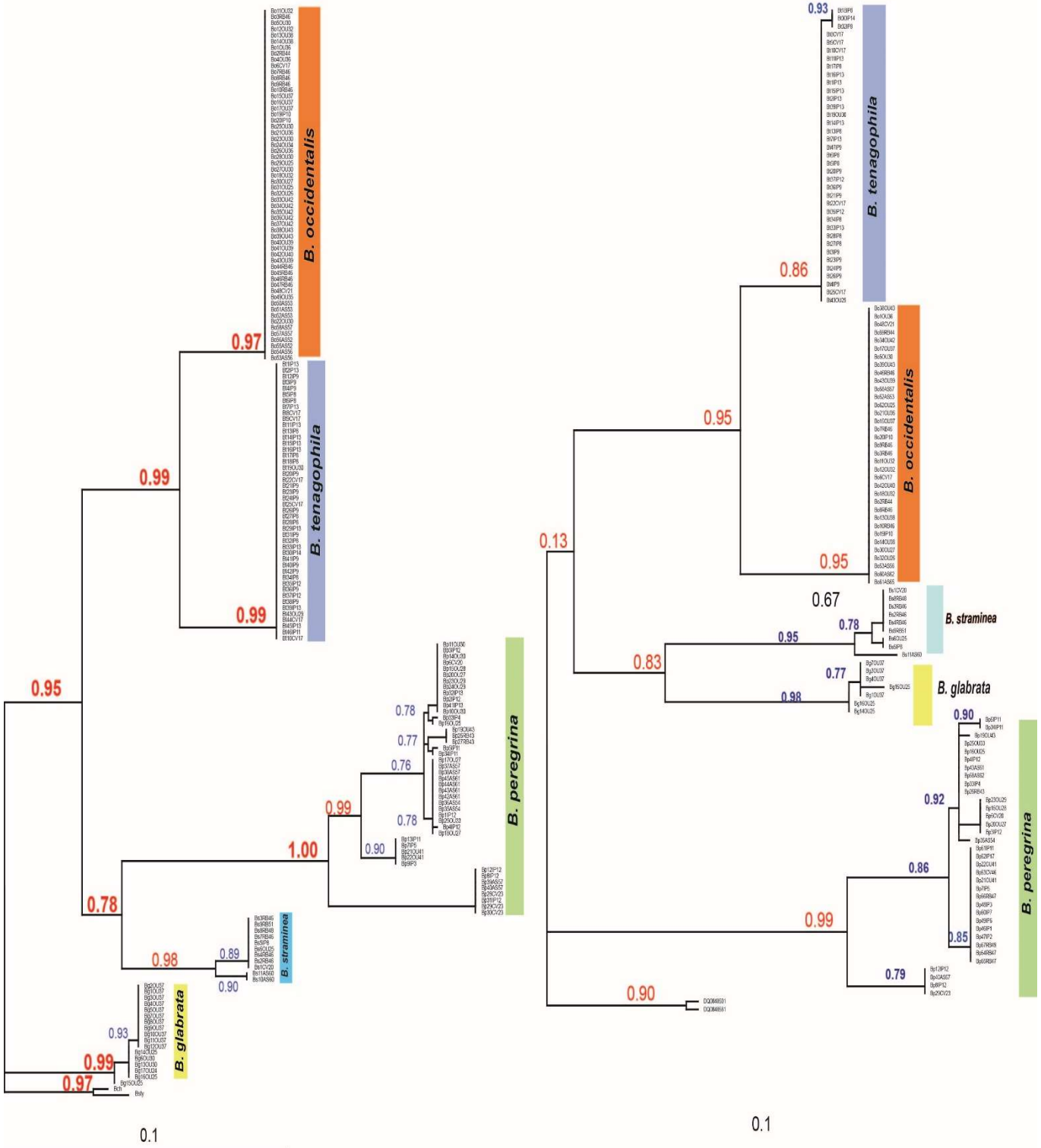




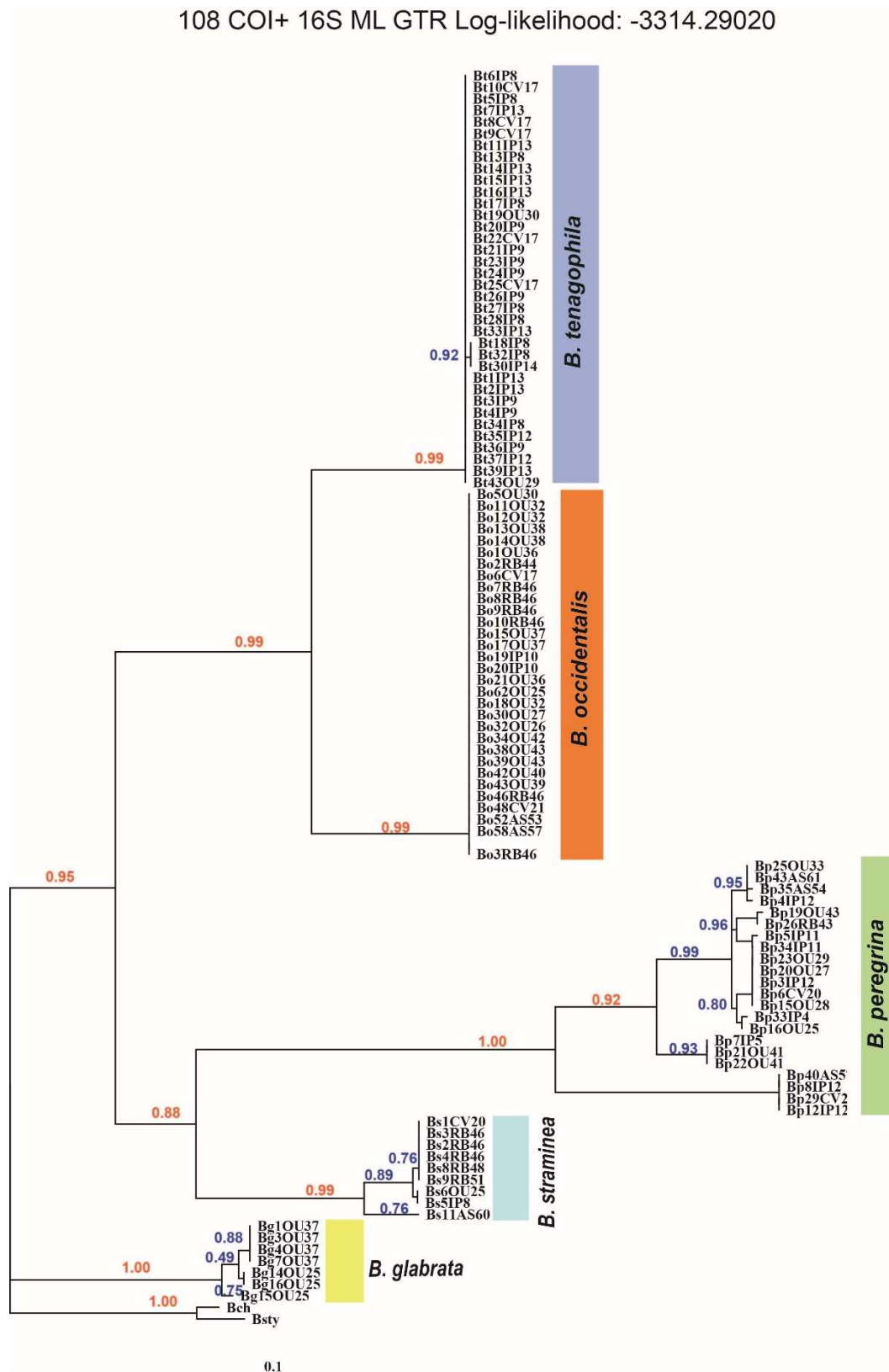
ANEXO A VI - Curvas que representam um modelo diferente para os preditores ambientais com a maior contribuição (**A**), segunda maior contribuição (**B**) para cada espécie, com saída logística, uma medida da probabilidade de presença. Esses gráficos refletem a dependência da adequação prevista tanto na variável selecionada quanto nas dependências induzidas por correlações entre a variável selecionada e outras variáveis. Precipitação anual (Bio12), Amplitude térmica anual (Bio7), sazonalidade da precipitação (Bio15), temperatura média anual (Bio1), distância vertical à drenagem mais próxima (Hand50) e pedológico (solo - 1 = área urbana, 7 = Latossolos Vermelhos).

COI_179_GTR_Log-likelihood:-2072.67737

16S_125_GTR_Log-likelihood:-1165.35526



ANEXO A VII - Árvores filogenéticas construídas por máxima verossimilhança para 177 e 123 seqüências do gene de COI e rRNA16S de caramujos do gênero *Biomphalaria*, identificadas morfologicamente, coletadas em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas seqüências de *outgroup*, sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT.



ANEXO A VIII - Arvore filogenética construída por máxima verossimilhança para as 106 seqüências concatenadas do gene de COI e rRNA16S de caramujos do gênero *Biomphalaria* identificadas morfolologicamente, coletadas em coleções hídricas nos cinco municípios de estudo, São Paulo, Brasil no período de 2015-2018, mais duas seqüências do *outgroup* sob modelo GTR em PhyML, com valores de suporte de ramos calculados por Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT.

9.2 ANEXO B

ANEXO B I - Área plantada ou destinada à colheita das lavouras temporárias, permanentes e áreas de agropecuária nos 55 municípios da Região do Médio Paranapanema, ano 2017.

MUNICÍPIOS	ÁREA TOTAL	CANA-DE-AÇÚCAR	SOJA	MILHO	LARANJA	CAFÉ	OUTRAS LAVOURAS	AGROPECUARIA
AGUDOS*	623.01	966.2	140.0	1.5	3.0	8.3	-	4.2
BOTUCATU*	662.86	1482.6	200.0	20.0	44.6	109.1	5.6	31.0
GARÇA*	12.31	555.6	-	5.0	35.0	0.8	120.0	22.9
IPAUSSU*	66.34	209.7	168.0	12.6	11.3	-	0.3	0.3
LUTÉCIA*	362.09	474.9	77.0	40.0	9.4	-	0.2	39.6
PIRATININGA*	169.84	402.4	13.0	1.0	0.5	19.5	1.5	2.9
BERNARDINO DE CAMPOS*	104.55	244.2	50.0	20.0	30.0	-	1.5	9.5
BOREBI*	268.81	348.0	42.3	2.1	0.8	10.0	-	1.2
IEPÊ*	159.76	595.5	130.0	95.0	85.3	-	-	4.7
LENÇÓIS PAULISTA*	275.14	809.5	348.4	13.3	2.0	10.7	6.0	8.6
MANDURI*	170.99	229.1	33.0	19.6	42.5	4.7	15.4	42.7
MARÍLIA*	58.23	1170.3	65.0	-	15.0	6.0	4.5	31.4
SÃO MANUEL*	77.02	650.8	325.0	-	2.5	9.2	16.0	0.1
ÁGUAS DE SANTA BÁRBARA	408	408.0	55.0	36.0	19.5	41.5	0.2	10.3
ALVINLÂNDIA	84.8	84.8	-	3.0	2.2	3.0	9.0	3.0
ASSIS	460.3	460.3	139.0	70.0	66.0	-	0.0	22.1
AVARÉ*	1213.1	1213.1	100.0	-	64.5	67.0	5.3	15.7
CABRÁLIA PAULISTA	239.9	239.9	15.0	-	0.2	10.3	0.5	3.0
CAMPOS NOVOS PAULISTA	484	484.0	80.0	135.0	96.0	6.0	0.1	19.9
CÂNDIDO MOTA	596.2	596.2	210.0	256.0	240.5	-	0.5	9.7
CANITAR	57.2	57.2	38.6	12.5	5.5	-	0.2	0.0
CERQUEIRA CÉSAR*	508.5	508.5	123.0	30.0	47.5	22.0	2.5	20.5
CHAVANTES*	188.1	188.1	120.0	12.0	9.5	-	0.2	0.0
CRUZÁLIA	149.1	149.1	32.2	80.0	87.0	-	-	4.8
DUARTINA*	264.6	264.6	4.4	-	1.7	10.8	1.6	1.6
ECHAPORÃ*	515.4	515.4	50.0	32.0	14.5	0.8	0.6	39.8
ESPÍRITO SANTO DO TURVO	193.7	193.7	25.0	25.0	9.0	25.0	-	4.4
FERNÃO	100.8	100.8	-	2.0	3.0	3.0	5.0	2.1
FLORÍNEA	225.6	225.6	88.8	65.0	57.0	-	-	4.5
GÁLIA*	356	356.0	-	6.0	6.0	4.5	39.9	10.0
IARAS	401.3	401.3	60.0	4.6	4.9	97.0	0.0	2.7
IBIRAREMA	228.3	228.3	45.7	111.3	108.0	-	-	13.5
ITATINGA*	979.8	979.8	30.0	12.0	18.5	20.7	3.0	10.2
JOÃO RAMALHO*	415.2	415.2	238.4	12.5	0.4	-	-	15.8
LUCIANÓPOLIS	189.8	189.8	4.5	4.0	1.8	36.0	0.7	4.7
LUPÉRCIO*	154.5	154.5	-	6.5	2.0	5.7	10.0	4.6
MARACÁI	533.9	533.9	160.0	260.0	263.0	-	-	8.0
OCAUÇU*	300.4	300.4	20.6	10.3	4.0	7.3	8.0	37.9
ÓLEO	198.1	198.1	64.5	21.9	45.0	-	0.8	0.1
OURINHOS	296.3	296.3	167.0	36.0	35.5	-	0.3	0.4
PALMITAL	547.8	547.8	210.0	275.4	214.0	-	-	17.9
PARAGUAÇU PAULISTA	999.9	999.9	478.3	40.0	25.0	-	0.0	29.6
PARDINHO*	209.9	209.9	1.5	15.0	9.5	17.7	8.5	21.3
PAULISTÂNIA	256.7	256.7	6.8	-	3.0	7.6	0.4	1.3
PEDRINHAS PAULISTA	152.5	152.5	27.0	70.6	72.0	-	-	4.1
PLATINA	326.7	326.7	75.0	100.0	83.6	-	-	11.8
PRATÂNIA	175.1	175.1	81.0	2.1	6.0	3.1	2.1	0.0
QUATÁ*	651.7	651.7	249.9	15.0	1.5	0.2	0.8	14.7
RANCHARIA*	1587.5	1587.5	612.1	185.0	133.0	-	0.3	107.2
RIBEIRÃO DO SUL	203.7	203.7	40.0	110.0	82.2	-	3.0	10.8
SALTO GRANDE	188.4	188.4	13.0	144.0	130.0	-	-	7.0
SANTA CRUZ DO RIO PARDO	1113.5	1113.5	250.0	230.0	170.0	90.0	6.7	12.0
SÃO PEDRO DO TURVO	731.8	731.8	75.0	95.0	80.0	65.0	4.4	19.8
TARUMÃ	303.2	303.2	212.0	38.0	33.0	-	-	2.4
UBIRAJARA	282.4	282.4	1.5	5.6	3.5	34.0	4.0	13.1
TOTAL	20484.65	25612.5	5796.2	2799.3	2540.7	756.4	289.4	741.0

Fonte: Área total - IBGE, 2010, Agricultura e lavouras – IBGE, 2017ab, * municípios com parte da área em outra UGHI.

ANEXO B II – Pontos de coleta sempre negativos para malacofauna no total de 396 pontos nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. M= Município, CH= Coleção Hídrica, R=Rural, P= Periurbano, U=Urbano, Ch=Chavantes

M	Nome da CH	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	M	Nome da CH	Nº do Ponto	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	
Ipaussu	Douradão	1.01	-23.09837	-49.53027	Córrego	R	1	Ourinhos	Sobra	33.02	-23.04690	-49.85267	Mina	R	1	
		1.02	-23.08422	-49.54232	Córrego	R	1			33.05	-23.04137	-49.85357	Artificial	R	1	
	Vituosa	2.01	-23.08727	-49.53348	Mina	R	1			33.06	-23.04137	-49.85357	Artificial	R	1	
		2.05	-23.04408	-49.56835	Artificial	R	1			33.07	-23.04123	-49.85355	Mina	R	1	
	Sto Antonio	7.02	-23.08900	-49.58268	Artificial	R	1			33.08	-23.04162	-49.86020	Banhado	R	1	
	Santa	8.03	-23.07130	-49.61770	Córrego	R	1			33.1	-23.04167	-49.86672	Lago	R	1	
	Hermínia	8.04	-23.06987	-49.61935	Córrego	R	1			33.17	-23.02407	-49.86360	Artificial	R	1	
		8.06	-23.06552	-49.62510	Artificial	R	1			Japoneses	35.03	-23.05313	-49.87460	Mina	R	1
	Faz. Boa Vista	9.02	-23.06233	-49.63319	Lago	P	1				35.04	-23.05313	-49.87460	Córrego	R	1
	São Luiz, Sapo	Faz. Boa Vista	9.06	-23.05472	-49.62139	Córrego	P			1	36.01	-23.04368	-49.88457	Córrego	R	1
			9.07	-23.04856	-49.61567	Banhado	P		1	Canaa	36.03	-23.03970	-49.88107	Mina	R	1
			10.03	-23.06008	-49.62833	Lago	P		1		36.04	-23.03970	-49.88107	Banhado	R	1
		São Luiz, Sapo	10.04	-23.04947	-49.63025	Lago	P		1	Barreirinha	38.01	-22.98973	-49.80158	Mina	R	1
			10.05	-23.04833	-49.62717	Rio	P		1	39.05	-23.00689	-49.86358	Banhado	P	1	
			10.08	-23.04581	-49.62617	Artificial	P		1	39.07	-23.00394	-49.86475	Lago	P	1	
			10.09	-23.04575	-49.62525	Banhado	P		1	Jacu	39.08	-23.00314	-49.86242	Lago	P	1
	Mombuca	11.01	-23.01422	-49.61652	Lago	R	1		39.1		-23.00217	-49.85911	Banhado	P	1	
Mombuquinha	12.01	-23.00345	-49.63187	Artificial	R	1	39.11	-23.00256	-49.85253	Lago	P	1				
	12.05	si	Si	Artificial	R	1	Jacuzinho	40.01	-23.00328	-49.87350	Córrego	U	1			
Ag. do Triunfo	13.01	-23.07822	-49.66940	Mina	R	1		40.02	-22.99869	-49.87292	Córrego	U	1			
	13.02	-23.07053	-49.66727	Banhado	R	1		40.04	-22.99425	-49.87117	Banhado	U	1			
	13.03	-23.07223	-49.66722	Mina	R	1	Furnas	41.01	-22.99133	-49.83307	Lago	R	1			
	13.04	-23.0639	-49.66502	Córrego	R	1		41.04	-22.97922	-49.84539	Artificial	U	1			
Barr. Vermelho	14.02	-23.06058	-49.68064	Mina	R	1	41.06	-22.95894	-49.84828	Mina	U	1				
	14.04	-23.05733	-49.68208	Córrego	R	1	Monjolinho	44.02	-22.98787	-49.88208	Córrego	U	1			
Ch	14.06	-23.05782	-49.68167	Córrego	R	1		44.03	-22.98787	-49.88208	Córrego	U	1			
Ipaussu	Rib. Grande	15.05	-23.03125	-49.65120	Banhado	R	1	44.04	-22.98250	-49.87444	Mina	U	1			
		15.07	-23.02680	-49.65657	Banhado	R	1	Christoni	46.01	-22.96888	-49.87410	Artificial	U	1		
		15.08	-23.02598	-49.65708	Córrego	R	1		46.02	-22.96877	-49.87423	Artificial	U	1		
	15.09	-23.02632	-49.65745	Banhado	R	1	46.03		-22.96855	-49.87452	Artificial	U	1			
	Boa Vista (Divisa)	16.01	-23.03340	-49.67588	Banhado	R	1		46.04	-22.96842	-49.87463	Artificial	U	1		
16.02		-23.02997	-49.67592	Banhado	R	1	46.07		-22.96637	-49.87347	Artificial	U	1			
Coronel	16.04	-23.02675	-49.67457	Córrego	R	1	46.08	-22.96657	-49.87587	Artificial	U	1				
Chavantes	Rib. Bonito	17.01	-23.11200	-49.70457	Mina	R	1	46.09	-22.96568	-49.87492	Lago	U	1			
		18.02	-23.09472	-49.72552	Banhado	R	1	Ag. da Veada	47.01	-22.95533	-49.88792	Córrego	U	1		
		18.03	-23.09165	-49.70813	Córrego	R	1		47.02	-22.95410	-49.88677	Córrego	U	1		
		18.04	-23.07450	-49.71495	Córrego	R	1		47.03	-22.95337	-49.88547	Artificial	U	1		
		18.05	-23.07075	-49.71045	Córrego	R	1		47.04	-22.95290	-49.88608	Artificial	U	1		
	18.05	-23.07075	-49.71045	Córrego	R	1	47.05		-22.95273	-49.88390	Artificial	U	1			
	Toperó	19.02	-23.07295	-49.69122	Córrego	R	1	47.06	-22.95269	-49.88338	Artificial	U	1			
	Harmonia	23.01	-23.08637	-49.73760	Mina	R	1	47.07	-22.95272	-49.88284	Córrego	U	1			
		23.02	-23.08440	-49.73648	Córrego	R	1	47.07	-22.95272	-49.88284	Córrego	U	1			
	Colossinho	24.01	-23.06082	-49.74285	Mina	P	2	47.08	-22.95328	-49.88261	Córrego	U	1			
24.02		-23.06200	-49.73768	Mina	P	2	47.09	-22.95512	-49.88302	Córrego	U	1				
24.04		-23.06022	-49.73542	Mina	U	2	Barreirão	50.01	-22.94613	-49.92678	Lago	R	1			
24.05		-23.05767	-49.73183	Mina	P	2	Fundo	56.02	-22.88350	-49.8540	Mina	R	1			
24.06	-23.04782	-49.71807	Córrego	P	1	56.03		-22.86832	-49.85413	Mina	R	1				
Marcondinha	26.01	-23.06660	-49.78727	Córrego	R	1		56.07	-22.87210	-49.86390	Córrego	R	1			
	26.02	-23.05195	-49.76780	Mina	R	1		56.08	-22.87092	-49.86535	Córrego	R	1			
Ag. Morna	27.02	-23.00585	-49.72218	Córrego	R	1		56.10	-22.86472	-49.86993	Córrego	R	1			
Ag. do Paiol	29.01	-23.07038	-49.80957	Artificial	R	1		56.11	-22.86412	-49.86935	Córrego	R	1			
Ourinhos	Lageadinho	32.01	-23.05618	-49.83103	Artificial	R		1	56.13	-22.86367	-49.86843	Córrego	R	1		
		32.02	-23.04363	-49.83630	Artificial	R		1	56.14	-22.86248	-49.87110	Artificial	R	1		
		32.03	-23.04237	-49.83650	Córrego	R		1	56.16	-22.86790	-49.86890	Artificial	R	1		
								56.18	-22.86727	-49.85110	Artificial	R	1			
							56.2	-22.85098	-49.85053	Artificial	R	1				

Continuação da ANEXO B II

M	Nome da CH	Nº da CH	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	M	Nome da CH	Nº da CH	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta
Ourinhos	Fundo	56.02	-22.88350	-49.85400	Mina	R	1	Ribeirão do Pinto	62.17	-22.76872	-49.91410	Córrego	R	1	
		56.03	-22.86832	-49.85413	Mina	R	1		62.18	-22.76825	-49.91393	Banhado	R	1	
		56.07	-22.87210	-49.86390	Córrego	R	1		62.19	-22.76898	-49.91227	Córrego	R	1	
		56.08	-22.87092	-49.86535	Córrego	R	1		62.2	-22.76845	-49.91173	Córrego	R	1	
		56.10	-22.86472	-49.86993	Córrego	R	1		62.21	-22.76702	-49.90893	Córrego	R	1	
		56.11	-22.86412	-49.86935	Córrego	R	1		62.22	-22.76667	-49.9083	Córrego	R	1	
		56.13	-22.86367	-49.86843	Córrego	R	1		62.23	-22.76737	-49.90658	Mina	R	1	
		56.14	-22.86248	-49.87110	Artificial	R	1		62.24	-22.76653	-49.90605	Banhado	R	1	
		56.16	-22.86790	-49.86890	Artificial	R	1		62.25	-22.76620	-49.90517	Córrego	R	1	
		56.18	-22.86727	-49.85110	Artificial	R	1		62.26	-22.76727	-49.89988	Córrego	R	1	
		56.2	-22.85098	-49.85053	Artificial	R	1		62.27	-22.76570	-49.89480	Banhado	R	1	
		Ribeirão Grande	57.03	-22.87737	-49.83937	Mina	R		1	63.01	-22.78593	-49.97662	Mina	R	1
			57.07	-22.87247	-49.83473	Banhado	R		1	63.02	-22.78510	-49.97428	Córrego	R	1
			57.09	-22.86883	-49.83378	Mina	R		1	63.03	-22.78485	-49.97613	Córrego	R	1
57.11	-22.86682		-49.82980	Mina	R	1	63.04	-22.78313	-49.97212	Córrego	R	1			
57.12	-22.86587		-49.82763	Banhado	R	1	63.05	-22.78263	-49.96997	Banhado	R	1			
57.17	-22.87567		-49.83265	Banhado	R	1	63.06	-22.76513	-49.96132	Córrego	R	1			
57.18	-22.78990		-49.87162	Córrego	R	1	63.07	-22.75948	-49.9418	Córrego	R	1			
57.19	-22.78923		-49.87213	Córrego	R	1	63.09	-22.76322	-49.95832	Córrego	R	1			
57.2	-22.78838		-49.87152	Córrego	R	1	Capim	63.1	-22.73485	-49.95080	Mina	R	1		
57.21	-22.78793		-49.87120	Córrego	R	1		63.11	-22.73047	-49.94725	Banhado	R	1		
57.22	-22.7869		-49.87007	Córrego	R	1		63.12	-22.72885	-49.94533	Banhado	R	1		
57.23	-22.78603		-49.87078	Córrego	R	1		63.17	-22.72025	-49.94205	Córrego	R	1		
57.24	-22.78435		-49.87063	Artificial	R	1		63.18	-22.71738	-49.94175	Córrego	R	1		
57.25	-22.78397		-49.87058	Artificial	R	1		63.19	-22.71162	-49.94118	Córrego	R	1		
57.26	-22.78230	-49.86983	Lago	R	1	63.21		-22.70140	-49.93913	Banhado	R	1			
57.27	-22.77758	-49.86798	Córrego	R	1	63.22		-22.69860	-49.93645	Artificial	R	1			
57.29	-22.79793	-49.87327	Artificial	R	1	63.23		-22.70178	-49.92868	Artificial	R	1			
Ribeirão Grande	57.3	-22.79540	-49.87325	Artificial	R	1		Ribeirão do Sul	Água Azul	64.01	-22.76667	-49.96135	Córrego	R	1
	57.31	-22.79418	-49.87320	Artificial	R	1			65.01	-22.75028	-49.90712	Rio	R	1	
	57.32	-22.79280	-49.87290	Córrego	R	1			65.02	-22.75007	-49.9123	Artificial	R	1	
	57.33	-22.79158	-49.87285	Córrego	R	1			65.03	-22.75032	-49.92132	Córrego	R	1	
	57.34	-22.78942	-49.87228	Córrego	R	1			Matão	65.04	-22.75032	-49.92132	Artificial	R	1
	57.35	-22.78892	-49.87245	Córrego	R	1	65.05			-22.75000	-49.92132	Artificial	R	1	
	57.36	-22.78828	-49.87178	Córrego	R	1	65.06			-22.75000	-49.9273	Artificial	R	1	
	57.37	-22.78713	-49.87105	Mina	R	1	65.07			-22.74948	-49.93025	Córrego	R	1	
	57.38	-22.78597	-49.87218	Córrego	R	1	65.09			-22.74917	-49.9352	Córrego	R	1	
	57.39	-22.78078	-49.86980	Artificial	R	1	66.02			-22.73380	-49.91983	Mina	R	1	
	57.42	-22.77637	-49.87212	Córrego	R	1	Água da Boa Vista		66.03	-22.73355	-49.92592	Mina	R	1	
	57.43	-22.76668	-49.86843	Artificial	R	1			66.04	-22.73560	-49.92853	Banhado	R	1	
	57.44	-22.75610	-49.86788	Artificial	R	1			66.05	-22.73552	-49.93328	Artificial	R	1	
	58.02	-22.79762	-49.90998	Mina	R	1			66.06	-22.73477	-49.94632	Mina	R	2	
Burgues	58.03	-22.79388	-49.90225	Banhado	R	1	67.02	-22.70418	-49.90065	Mina	R	1			
	60.01	-22.79573	-49.86180	Artificial	R	1	67.03	-22.70415	-49.90065	Mina	R	1			
Sapeçado	60.02	-22.79030	-49.85843	Córrego	R	1	Guariroba	67.04	-22.69942	-49.90893	Mina	R	1		
	60.04	-22.78907	-49.85732	Artificial	R	1		67.05	-22.69892	-49.90893	Mina	R	1		
	60.05	-22.78628	-49.85612	Córrego	R	1		67.06	-22.70145	-49.9134	Banhado	R	1		
61.01	-22.74735	-49.87208	Mina	R	1	67.07		-22.70175	-49.92867	Mina	R	1			
Lago	61.02	-22.74845	-49.87825	Mina	R	1		Figueirinha	69.01	-22.69995	-49.94195	Mina	R	1	
	61.03	-22.72588	-49.87947	Córrego	R	1	70.01	-22.74615	-49.98877	Lago	R	1			
	61.04	-22.71667	-49.87425	Artificial	R	1	70.02	-22.73158	-49.97843	Artificial	R	1			
	61.05	-22.71725	-49.87518	Artificial	R	1	70.03	-22.72922	-49.97665	Córrego	R	1			
	61.06	-22.71657	-49.87508	Artificial	R	1	Fundo	70.04	-22.71062	-49.96605	Banhado	R	1		
Meio	61.07	-22.75365	-49.85553	Artificial	R	1		70.05	-22.70597	-49.96383	Córrego	R	1		
	62.07	-22.78490	-49.94513	Córrego	R	1		70.06	-22.69280	-49.96153	Artificial	R	1		
Ribeirão do Pinto	62.08	-22.78633	-49.94220	Córrego	R	1		70.07	-22.69325	-49.96043	Artificial	R	1		
	62.13	-22.77125	-49.91862	Banhado	R	1	Palmitalzinho	71.01	-22.71292	-49.97392	Córrego	R	1		
	62.14	-22.77125	-49.91855	Banhado	R	1		71.02	-22.68712	-49.97285	Mina	R	1		
	62.15	-22.77117	-49.91823	Banhado	R	1									
	62.16	-22.77087	-49.91628	Córrego	R	1									

M	Nome da CH	Nº da CH	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	M	Nome da CH	Nº da	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta
		72.01	-22.65958	-50.32117	Banhado	R	1			81.06	-22.67193	-50.40523	Córrego	U	1
		72.03	-22.65322	-50.32142	Córrego	R	1	Água do Jacu	81.08	-22.67002	-50.40838	Mina	U	1	
		72.05	-22.63046	-50.31666	Mina	R	1		81.09	si	si	Mina	U	1	
		72.06	-22.61629	-50.32668	Córrego	R	1		81.10	-22.66565	-50.41025	Mina	U	1	
	Água da Pirapitinga	72.07	-22.60525	-50.34042	Córrego	R	1		82.01	-22.6798	-50.43358	Mina	U	1	
		72.08	-22.59611	-50.33854	Banhado	R	1		82.05	-22.68855	-50.43743	Mina	R	1	
		72.09	-22.59328	-50.34613	Mina	R	1	Freire	82.07	-22.68708	-50.44887	Mina	R	1	
		72.1	-22.58883	-50.35122	Mina	R	1		82.09	-22.6841	-50.45135	Córrego	R	1	
		72.11	-22.58123	-50.36321	Córrego	R	1		82.10	-22.68363	-50.45227	Córrego	R	1	
		72.12	-22.58123	-50.36321	Lago	R	1		82.11	-22.68328	-50.45322	Banhado	R	1	
		74.01	-22.62815	-50.34961	Artificial	R	1		82.13	-22.68092	-50.45603	Córrego	R	1	
		74.02	-22.63142	-50.34462	Mina	R	1		83.01	-22.65839	-50.42698	Rio	U	1	
	Água do Barreiro	74.03	-22.63265	-50.34392	Mina	R	1		83.04	-22.65953	-50.43689	Rio	U	1	
		74.04	-22.63617	-50.33900	Mina	R	1	Fortuninha	83.07	-22.6617	-50.43978	Rio	U	1	
		74.07	-22.63760	-50.32888	Córrego	R	1		83.08	-22.66285	-50.44209	Rio	U	1	
		74.09	-22.63860	-50.32352	Córrego	R	1		83.09	-22.66332	-50.44318	Rio	U	1	
	Ag. Lagoa	75.01	-22.61449	-50.38137	Artificial	R	1		84.03	-22.63247	-50.41998	Artificial	U	1	
		76.02	-22.64651	-50.36821	Córrego	R	1	Água da Porca	84.05	-22.63165	-50.42048	Rio	U	1	
		76.03	-22.64364	-50.36544	Córrego	R	1		84.06	-22.62875	-50.42205	Rio	U	1	
		76.04	-22.64295	-50.36537	Córrego	R	1		84.07	-22.62873	-50.42145	Córrego	U	1	
		76.05	-22.6416	-50.3654	Artificial	R	1		85.02	-22.63302	-50.43488	Rio	U	1	
	Água do Pavão	76.07	-22.65100	-50.36458	Córrego	R	1		85.03	-22.63246	-50.43993	Artificial	U	1	
		76.09	-22.65807	-50.36435	Córrego	R	1		85.04	-22.63228	-50.44046	Artificial	U	1	
		76.1	-22.66140	-50.36412	Córrego	U	1	Água do Óleo	85.05	-22.6318	-50.44116	Artificial	U	1	
		76.11	-22.66310	-50.36508	Córrego	U	1		85.06	-22.6273	-50.44497	Rio	R	1	
		76.12	-22.66442	-50.36515	Artificial	R	1		85.07	-22.62255	-50.44780	Artificial	R	1	
		76.13	-22.66958	-50.36490	Córrego	R	1		85.08	-22.62177	-50.4479	Rio	U	1	
		76.15	-22.67158	-50.36408	Córrego	R	1		85.09	-22.61597	-50.45035	Rio	R	1	
Assis		77.01	-22.68647	-50.36948	Córrego	R	1		85.1	-22.61574	-50.45113	Artificial	U	1	
		77.02	-22.68497	-50.37242	Córrego	R	1	Assis	85.12	-22.61168	-50.45135	Banhado	U	1	
		77.03	Si	si	Artificial	R	1		86.01	-22.6782	-50.46282	Artificial	R	1	
		77.04	Si	si	Córrego	R	1		86.02	-22.67658	-50.46675	Córrego	R	1	
		77.05	-22.67985	-50.38037	Córrego	R	1		86.03	-22.67137	-50.47718	Artificial	R	1	
		77.07	-22.67695	-50.38355	Artificial	R	1		86.04	-22.67038	-50.4797	Córrego	R	1	
		77.09	Si	si	Artificial	R	1		86.05	-22.67005	-50.49048	Córrego	R	1	
	Água do Matão	77.1	-22.67527	-50.38647	Córrego	R	1	Fortuna	86.06	-22.66522	-50.49048	Córrego	R	1	
		77.11	-22.67468	-50.38525	Mina	R	1		86.07	-22.66343	-50.49440	Artificial	R	1	
		77.15	-22.66588	-50.38657	Artificial	R	1		86.08	-22.6597	-50.49875	Córrego	R	1	
		77.16	Si	si	Artificial	R	1		86.12	-22.65693	-50.51405	Artificial	R	1	
		77.17	-22.66362	-50.38855	Mina	U	1		86.13	-22.65693	-50.51415	Artificial	R	1	
		77.18	-22.66185	-50.39012	Córrego	U	1		86.16	-22.64853	-50.53733	Artificial	R	1	
		77.19	-22.66078	-50.39075	Córrego	U	1		88.01	-22.66856	-50.47909	Córrego	R	1	
		77.2	-22.66025	-50.39197	Córrego	U	1		88.02	-22.66319	-50.47617	Artificial	R	1	
		77.21	-22.65993	-50.39152	Banhado	U	1		88.03	-22.66373	-50.47625	Córrego	R	1	
		77.22	-22.65865	-50.39257	Mina	U	1		88.05	-22.64873	-50.46281	Córrego	R	1	
		78.02	Si	si	Artificial	R	1	Paulista	88.07	-22.64592	-50.45663	Artificial	R	1	
	Água do Pavãozinho	78.03	-22.64383	-50.3828	Córrego	R	1		88.08	-22.64606	-50.45709	Artificial	R	1	
		78.04	Si	si	Artificial	R	1		88.09	-22.64556	-50.45442	Artificial	R	1	
		78.05	-22.64658	-50.38955	Banhado	U	1		88.1	-22.64591	-50.45353	Artificial	R	1	
		78.06	-22.64902	-50.39397	Mina	U	1		88.11	-22.64362	-50.46464	Artificial	R	1	
		79.03	-22.70203	-50.40927	Córrego	R	1		89.01	-22.65475	-50.49730	Córrego	R	1	
	Figueira	79.04	-22.70122	-50.4062	Córrego	R	1		89.02	-22.64907	-50.49392	Mina	R	1	
		80.05	-22.69163	-50.41475	Artificial	R	1	Baixadão	89.04	-22.64825	-50.48850	Artificial	R	1	
	Cabiuna	80.1	-22.68227	-50.42048	Córrego	R	1		89.09	-22.63903	-50.48192	Mina	R	1	
		80.11	-22.68243	-50.42057	Córrego	U	1		90.01	-22.69002	-50.51202	Córrego	R	1	
		81.01	-22.68073	-50.40472	Córrego	R	1		90.02	-22.67787	-50.51483	Córrego	R	1	
	Água do Jacu	81.02	-22.67887	-50.40315	Córrego	R	1	Cabral	90.03	-22.66900	-50.51675	Mina	R	1	
		81.03	-22.67738	-50.40435	Córrego	R	1		90.04	-22.66732	-50.51672	Artificial	R	1	
		81.04	-22.67605	-50.40462	Córrego	R	1		90.05	-22.66458	-50.51712	Mina	R	1	
		81.05	-22.67605	-50.40462	Córrego	R	1	Lagarto	91.02	-22.64080	-50.50485	Mina	R	1	

Continuação da ANEXO B II

Continuação da ANEXO B II

M	Nome da CH	Nº da CH	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	M	Nome da CH	Nº da CH	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº coleta	
Assis	Ag. Tempestade	94.01	-22.63695	-50.55777	Artificial	R	1	Assis		102.01	-22.57623	-50.41818	Artificial	R	1	
		95.01	-22.61428	-50.40587	Lago	R	1			102.02	-22.57349	-50.41816	Artificial	R	1	
		95.04	-22.60993	-50.46507	Artificial	R	1			102.03	-22.57140	-50.42808	Córrego	R	1	
		95.05	-22.60995	-50.46587	Artificial	R	1			102.04	-22.57139	-50.42805	Córrego	R	1	
		95.06	-22.60868	-50.47327	Banhado	R	1			102.05	-22.56022	-50.44761	Córrego	R	1	
		95.07	-22.60557	-50.47718	Banhado	R	1			102.08	-22.55139	-50.45751	Córrego	R	1	
		95.08	-22.60747	-50.47767	Artificial	R	1			102.09	-22.55829	-50.45099	Mina	R	1	
	Água do Cervo	95.09	-22.60673	-50.49337	Rio	R	1			102.10	-22.55227	-50.45530	Mina	R	1	
		95.10	-22.61532	-50.52637	Rio	R	1			102.11	-22.53989	-50.45797	Mina	R	1	
		95.11	-22.6112	-50.5252	Rio	R	1			102.12	-22.53879	-50.45819	Mina	R	1	
		95.13	-22.61783	-50.53298	Rio	R	1			Ag. Tanquinho	103.01	-22.54736	-50.31112	Artificial	R	1
		95.15	-22.62092	-50.54160	Rio	R	1			Água Cruz	105.01	-22.54907	-50.36545	Mina	R	1
		95.16	-22.62113	-50.54500	Rio	R	1			Água baixada	106.01	-22.53102	-50.37680	Córrego	R	1
		95.17	-22.62437	-50.54857	Rio	R	1			Rib. S. Bartolomeu	107.01	-22.48196	-50.34773	Córrego	R	1
		95.18	-22.63695	-50.5578	Artificial	R	1			Tijuco	108.01	-22.51663	-50.37885	Artificial	R	1
	Água da Mata	96.01	-22.62653	-50.46283	Artificial	R	1			Alambrado	109.01	-22.49336	-50.38210	Artificial	R	1
		96.02	-22.6129	-50.46622	Lago	R	1			Lemprado	110.01	-22.49828	-50.39692	Artificial	R	1
		97.01	-22.60515	-50.47800	Artificial	R	1				111.01	-22.54711	-50.43124	Córrego	R	1
		97.02	-22.58443	-50.4729	Banhado	R	1				111.02	-22.54575	-50.43002	Córrego	R	1
	Água da Pinga	97.03	-22.59085	-50.46497	Lago	R	1				111.03	-22.54479	-50.43058	Mina	R	1
	97.04	-22.58923	-50.46633	Lago	R	1		Água Bonita	111.04	-22.54437	-50.43074	Mina	R	1		
	97.05	-22.58902	-50.46600	Artificial	R	1			111.05	-22.54535	-50.43103	Córrego	R	1		
	98.01	-22.57168	-50.47683	Rio	R	1			111.06	-22.53799	-50.43827	Mina	R	1		
Ag. Divisa	98.02	-22.56443	-50.47112	Rio	R	1			112.02	-22.53503	-50.43029	Artificial	R	1		
	99.01	-22.61743	-50.31504	Córrego	R	1		Água do Capão Bonito	112.03	-22.53084	-50.42738	Artificial	R	1		
Água do Café	99.03	-22.56515	-50.32957	Artificial	R	1			112.05	-22.53623	-50.43262	Mina	R	1		
	100.01	-22.59283	-50.35884	Córrego	R	1			112.06	-22.53749	-50.43267	Córrego	R	1		
Água do Campestre	100.03	-22.59125	-50.35858	Córrego	R	1		Ag. Mombuca	113.01	-22.49084	-50.43865	Artificial	R	1		
	101.01	-22.56751	-50.35125	Córrego	R	1		Ag. Mombuquinha	114.02	-22.48016	-50.40976	Artificial	R	1		
Água Cedro	101.02	-22.57751	-50.35725	Córrego	R	1			114.04	-22.45810	-50.41681	Córrego	R	1		
	101.03	-22.58327	-50.35750	Mina	R	1		Total							401	

ANEXO B III - Coletas de *Biomphalaria* e Malaco Fauna associada em 258 pontos de 92 coleções hídricas nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil. M= Município, CH= Coleção Hídrica, R=Rural, P= Periurbano, U=Urbano, Ch=Chavantes, Ip= Ipaussu. Bgl=*B. glabrata*, Bst=*B. straminea*, Btt=*B. tenagophila*, Boc=*B. occidentalis*, Bpe=*B. peregrina*, B. spp=*Biomphalaria spp.*, Dr=Drepanotrema, Phy=Physa, Mel= Melanoides, Ly= Lynnaea e Po=Pomacea.

M	Nome da CH	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº de espécimes encontradas											Nº coleta		
							Bgl	Boc	Bpe	Bst	Btt	Sintopico	B. spp	mel	Ly	Phy	Po	Dr	+	-
Ipaussu	Douradão	1.03	-23.08245	-49.54330	Banhado	R			8										1	
		2.02	-23.07113	-49.53723	Lago	R														1
	Vituosa	2.03	-23.05187	-49.54838	Córrego	R			1				6							2
		2.04	-23.06007	-49.54942	Lago	R			16				4			4	4			3
	Pau D'Alho	3.01	-23.07910	-49.54782	Lago	R			13			7pe/st								2
	Água Úmida	4.01	-23.08553	-49.56090	Banhado	R			7				20							3
	Palmeiras	5.01	-23.02595	-49.56502	Córrego	R			65			9oc/pe								3
	Lambari	6.01	-23.10490	-49.57180	Artificial	R			36											1
	Sto Antonio	7.01	-23.09933	-49.59202	Artificial	R											15			1
	Santa Hermínia	8.01	-23.08857	-49.61043	Banhado	R													2	1
		8.02	-23.08440	-49.60653	Mina	R			35											1
		8.05	-23.06843	-49.62215	Banhado	R							8							2
	Faz. Boa Vista	9.01	-23.09433	-49.65042	Banhado	P				25			32 st/tt							2
		9.03	-23.05956	-49.62678	Mina	P					253									3
		9.04	-23.05889	-49.62372	Banhado	P					78									3
		9.05	-23.05803	-49.62203	Banhado	P							22pe/tt	13						3
10.01		-23.06475	-49.63025	Lago	P						123	26oc/tt							4	
São Luiz, Córrego Sapo	10.02	-23.06008	-49.62833	Banhado	P		14			100									4	
	10.06	-23.04753	-49.63025	Lago	P					23									4	
	10.07	-23.04656	-49.62753	Banhado	P					104	9pe/tt								4	
	10.1	-23.04575	-49.62525	Lago	P			37				49							4	
Mombuca	11.02	-23.00150	-49.63043	Artificial	R		28					15	1		1	1			3	
	11.03	-23.00288	-49.63058	Lago	R		59			31						5			4	
	11.04	-23.00138	-49.63260	Banhado	R								12		2	2			1	
Mombuquinha	12.02	-23.00573	-49.63240	Artificial	R			52		97		35			5				4	
	12.03	-23.00803	-49.63370	Artificial	R			30				23	3		2				4	
	12.04	-23.01022	-49.63580	Lago	R			152				49pe/tt							4	
Ag. do Triunfo	13.05	-23.06370	-49.66293	Mina	R							48				25			2	
Barranco Vermelho	14.01	-23.07252	-49.68105	Lago	R			186							3	4			4	
	14.03	-23.05733	-49.68208	Lago	R			1		2									2	
	14.05	-23.05228	-49.67747	Banhado	R			86		10									3	
	14.07	-23.05705	-49.68182	Artificial	R											4			1	
	14.08	-23.05587	-49.68192	Córrego	R										1	2			1	
	14.09	-23.05388	-49.68222	Mina	R										2	4			1	
	14.1	-23.05215	-49.68230	Mina	R									1	6	15			1	
Ribeirão Grande	15.01	-23.03725	-49.64615	Artificial	R							47		3	9				1	
	15.02	-23.03235	-49.64887	Mina	R			6		22	51pe/tt	4			3				5	
	15.03	-23.03127	-49.64960	Mina	R					66									3	
	15.04	-23.03140	-49.65057	Banhado	R					9									2	
	15.06	-23.02962	-49.65343	Banhado	R			32		18		5		1	1				4	
Ch	15.1	-22.99668	-49.67848	Banhado	R										3	1			1	
Ip	Boa Vista Dv	16.03	-23.02140	-49.67283	Banhado	R					14pe/tt	7							2	
Ribeirão Bonito	18.01	-23.10198	-49.69760	Córrego	R		21												1	
	18.06	-23.05940	-49.70973	Artificial	R											3			1	
	18.07	-23.05818	-49.71090	Artificial	R										4				1	
	18.08	-23.05457	-49.70788	Artificial	R		23									5			1	
	19.01	-23.07783	-49.69062	Artificial	R							4			2		9		1	
	19.03	-23.05145	-49.69408	Artificial	R		9								1				1	
	19.04	-23.04898	-49.69425	Artificial	R		14									8			1	
	20.01	-23.03138	-49.70277	Mina	R			7				8	9						4	
Santo Antonio	20.02	-23.03157	-49.69855	Banhado	R												10		4	
	20.03	-23.02603	-49.68930	Lago	R		19				75			1					5	
	20.04	-23.02148	-49.68323	Lago	R					83				1					5	
	21.01	-23.01403	-49.68467	Córrego	R					13		49				1			3	
Morais	22.01	-22.98283	-49.68948	Artificial	R											4			1	
	22.02	-22.97412	-49.68673	Banhado	R						17		10		6	17			2	
Harmonia	23.03	-23.08123	-49.73893	Mina	R			26											1	
Colossinho	24.03	-23.06090	-49.73612	Mina	U				4			10							2	
	24.07	-23.04370	-49.71180	Lago	U			2			16oc/pe	36							3	
Tupanciretã	25.01	-23.06868	-49.76370	Lago	R		2												1	
Ag. Morna	27.01	-23.01885	-49.71413	Artificial	R		12									2			1	
Ag. coqueiros	28.01	-23.01495	-49.74052	Artificial	R			14							3				1	
Bento	30.01	-23.03345	-49.77113	Artificial	R												24		1	
Pq. Trianon	31.01	-22.94240	-49.72448	Artificial	R		8		75			21	4	3	3			3	2	

Continuação da ANEXO B III

M	Nome da CH	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº de espécimes encontradas														Nº coleta		
							Bgl	Boc	Bpe	Bstr	Btt	Sintopico	B. spp	mel	Ly	Phy	Po	Dr	+	-			
Ourinhos	Lageadinho	32.04	-23.02283	-49.82673	Artificial	R	31													2			
		32.05	-23.01097	-49.82450	Lago	R	12														1	1	
	Sobra	33.01	-23.06447	-49.85300	Mina	R		29													2	2	
		33.03	-23.04326	-49.85388	Artificial	R						17										3	
		33.04	-23.04163	-49.85395	Artificial	R																1	
		33.09	-23.04165	-49.86023	Banhado	R	35															1	
		33.11	-23.03975	-49.86190	Mina	R		16														1	
		33.12	-23.03833	-49.86140	Artificial	R						53oc/st	17									2	
		33.13	-23.03240	-49.85862	Banhado	R					57											1	
		33.14	-23.02747	-49.86487	Mina	R	46															1	
		33.15	-23.02506	-49.86385	Artificial	R				38												1	
	33.16	-23.02413	-49.86360	Banhado	R			8													1		
	Café	34.01	-23.06750	-49.86662	Lago	R		49													2	1	
		35.01	-23.05802	-49.87693	Lago	R			15													1	
	Japoneses	35.02	-23.05612	-49.87733	Mina	R						10										1	
		35.05	-23.05200	-49.86952	Banhado	R						7										1	
	Canaa	36.02	-23.04253	-49.88327	Banhado	R						43										1	
	Paraiso	37.01	-23.03426	-49.91464	Mina	R															17	1	
	Barreirinha	38.02	-22.98875	-49.80117	Artificial	R						142										3	
		38.03	-22.98758	-49.80060	Mina	R			19	12												2	
		38.04	-22.98580	-49.80052	Artificial	R						27										1	
	Jacu	39.01	-23.01631	-49.90500	Lago	P		24				31oc/tt	7									4	
		39.02	-23.02117	-49.87728	Artificial	P		47				98oc/tt	53									5	
		39.03	-23.02418	-49.87082	Artificial	P		31														1	
		39.04	-23.00894	-49.87275	Banhado	P	59						41	8		2	26					6	
		39.06	-23.00689	-49.86353	Córrego	P							38	2		4	14					5	
	39.09	-23.00319	-49.86150	Banhado	P							11	18								5		
	Jacuzinho	40.03	-22.99511	-49.87433	Lago	U					20		61	5		9	1				5		
	Furnas	41.02	-22.98078	-49.84207	Lago	U		248					109			6	5					7	
		41.03	-22.97922	-49.84539	Artificial	U		89					11									6	
		41.05	-22.97062	-49.85200	Lago	U		64					139	4			3					6	
	São Joaquim	42.01	-22.97313	-49.82027	Córrego	R				4			15									2	
	Furminhas	43.01	-22.98556	-49.84997	Lago	U		50				125		3		17	15					5	
		43.02	-22.97706	-49.85167	Banhado	U		96					13	8		16						7	
		43.03	-22.97677	-49.85175	Mina	U						32				2	3	242				6	
	Monjolinho	44.01	-22.99833	-49.90028	Lago	U		4					27			1	27					4	
	Chumbiadinha	45.01	-22.97548	-49.89085	Lago	U		80					76			2	8					6	
		46.05	-22.96760	-49.87468	Artificial	U	170						42	3			3					8	
		46.06	-22.96712	-49.87517	Artificial	U	25						21										3
		Christoni	46.1	-22.96447	-49.87563	Artificial	U		79					67	16	16							6
			46.11	-22.95283	-49.87633	Mina	U	45						68oc/gl	34		8	4	2				6
	46.12	-22.95005	-49.87585	Banhado	U	25	14					10oc/gl	28			16	4					6	
	Ag. Veada	47.1	-22.95322	-49.87831	Mina	U		59			51		104									7	
Providencia	48.01	-22.98170	-49.92558	Córrego	U										4	4					1		
	48.02	-22.97822	-49.92220	Mina	U										2						1		
Fazenda	49.01	-22.97110	-49.93373	Mina	R															7	1		
Paraiso	49.02	-22.96188	-49.94290	Artificial	R		1									16					1		
Faz. Figueirinha	51.01	-22.96383	-49.79657	Artificial	R								10	9							1		
Faz. Nova	52.01	-22.96285	-49.78737	Banhado	R				1						10	10					1		
Usina São Luiz	53.01	-22.94210	-49.82917	Banhado	R											9	8				1		
	53.02	-22.94005	-49.80995	Artificial	R		5								21	21					1		
	53.03	-22.93238	-49.79035	Artificial	R											23					1		
	53.04	-22.94352	-49.76820	Artificial	R								21		21	21	22					1	
	53.05	-22.92922	-49.76422	Artificial	R		15									3						1	
Faz. Jaquarere	54.01	-22.94298	-49.74863	Artificial	R		6							2							1		
Asa Branca	55.01	-22.91956	-49.84551	Mina	R				28												1		
	55.02	-22.91692	-49.83867	Lago	R							16									1	2	
Fundo	56.01	-22.88433	-49.85563	Lago	R		1														1		
	56.04	-22.87960	-49.85727	Mina	R						7oc/pe										1		
	56.05	-22.87678	-49.85828	Artificial	R		1									5					1		
	56.06	-22.87195	-49.86322	Córrego	R											20	20				1		
	56.09	-22.86908	-49.86535	Mina	R		18													1	1		
	56.12	-22.86272	-49.87008	Artificial	R		4													1	1		
	56.15	-22.86113	-49.87342	Artificial	R		12						5		5	5					1		
	56.17	-22.86933	-49.86310	Artificial	R														19			1	
56.19	-22.86523	-49.86615	Córrego	R		4									1						1		

Continuação da ANEXO B III

M	Nome da CH	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Tipo de CH	Tipo	Nº de espécimes encontradas													Nº Coleta	
							agl	Boc	Bpe	Bstr	Btt	Sintopico	B.spp	mel	Ly	Phy	Po	Dr	+	-	
Ourinhos	Ribeirão Grande	57.01	-22.88637	-49.84565	Banhado	R		5									18	18	1		
		57.02	-22.87792	-49.84042	Córrego	R							3						1	2	
		57.04	-22.87620	-49.83775	Mina	R		52											1		
		57.05	-22.87530	-49.83652	Banhado	R			3										1		
		57.06	-22.87427	-49.83533	Artificial	R													13	1	
		57.08	-22.87072	-49.83408	Banhado	R				5						1				1	
		57.1	-22.86792	-49.83327	Lago	R		21								2				1	
		57.13	-22.86307	-49.82570	Mina	R				19							3			3	1
		57.14	-22.86550	-49.82472	Banhado	R			1											6	1
		57.15	-22.87958	-49.83443	Banhado	R			11									7		7	1
		57.16	-22.87805	-49.83430	Banhado	R			10							2					1
		57.28	-22.77975	-49.86918	Banhado	R														11	1
		57.40	-22.77882	-49.87233	Córrego	R								7							2
		57.41	-22.77630	-49.87222	Córrego	R															1
Burgues	58.01	-22.81385	-49.92318	Mina	R		8												2		
	58.04	-22.79380	-49.90220	Mina	R							3							1		
	58.05	-22.79333	-49.90107	Artificial	R													15	1		
	58.06	-22.79342	-49.89977	Banhado	R													19	1		
	58.07	-22.78963	-49.89673	Artificial	R										13				1		
Água do Cascavel	59.01	-22.80287	-49.90135	Artificial	R			12								15		15	1		
	59.02	-22.80222	-49.90513	Mina	R											3			1		
Sapecado	60.03	-22.79028	-49.85845	Artificial	R													16	1		
Ribeirão do Pinto	62.01	-22.80837	-49.96612	Artificial	R		12										3		2		
	62.02	-22.80308	-49.96217	Artificial	R				83			21					5		3		
	62.03	-22.79643	-49.96012	Artificial	R		41					10			2	2	52		3		
	62.04	-22.78163	-49.92770	Artificial	R		40					59	2				3		3		
	62.05	-22.79030	-49.95303	Córrego	R							5							4		
	62.06	-22.78762	-49.94915	Córrego	R				10		50oc/pe	39	5				5		4		
	62.09	-22.78395	-49.94160	Artificial	R		4			16			5				6		4		
	62.1	-22.78285	-49.93480	Banhado	R		6					2	3		4				3		
	62.11	-22.78058	-49.93312	Artificial	R		53					45					10		4		
	62.12	-22.78115	-49.92653	Artificial	R		148					39	23						3		
62.28	-22.75908	-49.89443	Mina	R		36												1			
Capim	63.08	-22.73485	-49.95080	Banhado	R				7										1		
	63.13	-22.72410	-49.94353	Córrego	R													5	1		
	63.14	-22.72452	-49.94405	Banhado	R													20	1		
	63.15	-22.72365	-49.94267	Banhado	R				25										1		
	63.16	-22.72255	-49.94222	Mina	R				3										1		
	63.2	-22.70782	-49.94010	Artificial	R				7										1		
Matão	65.08	-22.74947	-49.93198	Artificial	R				11										1		
	65.1	-22.74875	-49.93573	Banhado	R				33										1		
	65.11	-22.74840	-49.93937	Córrego	R													5	1		
	65.12	-22.74783	-49.94632	Artificial	R					35									2		
	Ag. Boa Vista	66.01	-22.73047	-49.90785	Artificial	R				4										1	
Guariroba	67.01	-22.70837	-49.89497	Mina	R				32										1		
Lagoa	68.01	-22.73503	-49.96067	Lago	R					7									1		
Água da Pirapitinga	72.02	-22.65820	-50.32113	Artificial	R		4											32	1		
	72.04	-22.63141	-50.31718	Córrego	R		14												1		
Água Funda	73.01	-22.67388	-50.33005	Artificial	R						21pe/st								1		
	73.02	-22.67338	-50.32737	Artificial	R														1		
	73.03	-22.67148	-50.33508	Artificial	R			31		47									1		
Água do Barreiro	74.05	-22.63657	-50.33738	Córrego	R				15										1		
	74.06	-22.63708	-50.33052	Banhado	R													19	1		
	74.08	-22.63847	-50.32507	Banhado	R							8							1		
Ag. Lagoa	75.02	-22.60525	-50.34042	Artificial	R		9												1		
Assis	Água do Pavão	76.01	-22.68645	-50.36775	Artificial	R		7				21							2		
		76.06	-22.63975	-50.36588	Córrego	R										2	11	1			
		76.08	-22.65547	-50.36417	Córrego	R								10				1			
		76.14	-22.67093	-50.36470	Córrego	R												17	1		
Água do Matão	77.06	-22.67785	-50.38303	Artificial	R										4				1		
	77.08	-22.67650	-50.38432	Córrego	R										5				1		
	77.12	-22.67452	-50.38760	Córrego	R							16						4	1		
	77.13	-22.67315	-50.38900	Banhado	R												17		1		
	77.14	-22.66930	-50.39468	Mina	U														75	1	
Ag.	78.01	-22.64447	-50.38032	Córrego	R											15			1		
Figueira	79.01	-22.70473	-50.41982	Mina	R											14		16	1		
	79.02	-22.70338	-50.41502	Artificial	R								4					10	1		

ANEXO B IV - Quantidade de pontos e amostras das coletas de *Biomphalaria* em 114 córrego coletado nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil.

Nº	Coleção Hídrica	Extensão (Km)	Nº Amostra	Nº pontos	Mínimo de amostra /ponto	Máximo de amostra /ponto	Pontos Negativo de <i>Biomphalaria</i>
1	Douradão	2.645	3	3	1	1	2
2	Virtuosa	0.088	8	5	1	3	3
3	Pau D'Alho	0.022	2	1	2	2	0
4	Ag. Úmida	0.139	3	1	3	3	0
5	Palmeiras	2.12	3	1	3	3	0
6	Lambari	0.704	1	1	1	1	0
7	Santo Antônio	0.797	2	2	1	1	2
8	Santa Hermínia	1.388	7	6	1	2	4
9	Faz. Boa Vista	14.53	14	7	1	3	3
10	São Luiz	0.269	25	10	1	4	5
11	Mombuca	7.137	9	4	1	4	2
12	Mombuquinha	0.781	14	5	1	4	2
13	Ag. do Triunfo	1.535	6	5	1	2	4
14	Barranco Vermelho	1.374	17	10	1	4	7
15	Rib. Grande	22.132	21	10	1	5	5
16	Boa Vista (divisa)	1.092	7	4	1	3	3
17	Coronel Miguel	0.127	1	1	1	1	1
18	Rib. Bonito	4.69	8	8	1	1	6
19	Toperó	1.457	4	4	1	1	1
20	Santo Antônio	0.797	19	4	4	5	1
21	Piranhas	0.5	3	1	3	3	0
22	Morais	2.32	3	2	1	1	1
23	Harmonia	1.426	3	3	1	1	2
24	Colossinho	1.116	16	7	1	4	5
25	Tupanciretã	0.476	1	1	1	1	0
26	Marcondinha	2.432	2	2	1	1	2
27	Ag. Morna	1.41	2	2	1	1	1
28	Ag. dos coqueiros	2.464	1	1	1	1	0
29	Ag. do Paiol	0.003	1	1	1	1	1
30	Bento	0.026	1	1	1	1	1
31	Parque Trianon	1.89	2	1	2	2	0
32	Lageadinho	1.536	7	5	1	2	3
33	Sobra	0.376	21	17	1	3	7
34	Café	0.177	1	1	1	1	0
35	Japoneses	0.149	5	5	1	1	2
36	Canaã	0.321	4	4	1	1	3
37	Paraiso	0.22	1	1	1	1	1
38	Barreirinha	3.088	7	4	1	3	1
39	Jacú	2.72	31	11	1	6	5
40	Jacuzinho	0.464	8	4	1	5	3
41	Furnas	2.535	22	6	1	7	3
42	São Joaquim	0.095	2	1	2	2	0
43	Furninhas	0.731	18	3	5	7	0
44	Monjolinho	1.086	7	4	1	4	3
45	Chumbiadinha	1.081	6	1	6	6	0
46	Christoni	0.844	36	12	1	8	7
47	Água Veada	0.314	16	10	1	7	9
48	Providência	0.08	2	2	1	1	2
49	Faz. Paraiso	0.323	2	2	1	1	1
50	Barreirão	0.18	1	1	1	1	1
51	Faz. Figueirinha	0.103	1	1	1	1	1
52	Faz. Nova Era	0.65	1	1	1	1	0
53	Usina São Luiz	1.634	5	5	1	1	3
54	Faz. Jaquarere	1.683	1	1	1	1	0
55	Asa Branca	0.517	4	2	1	3	0
56	Fundo	7.174	20	20	1	1	13
57	Rib. Grande	22.132	47	44	1	3	32

Continuação da ANEXO B IV

Nº	Coleção Hídrica	Extensão (Km)	Nº Amostra	Nº pontos	Mínimo de amostra /ponto	Máximo de amostra /ponto	Pontos Negativo de <i>Biomphalaria</i>
58	Burgues	6.039	10	7	1	2	5
59	Ag. do Cascavel	4.217	2	2	1	1	1
60	Sapecado	1.839	5	5	1	1	5
61	Lago/Meio	4.024 /	7	7	1	1	7
62	Rib. do Pinto	4.406	53	28	1	4	17
63	Capim	37.819	23	23	1	1	19
64	Ag. Azul	0.54	1	1	1	1	1
65	Matão	1.918	13	12	1	2	9
66	Ag. da Boa Vista	1.64	8	6	1	2	5
67	Guariroba	4.111	7	7	1	1	6
68	Lagoa	1.399	1	1	1	1	0
69	Figueirinha	0.1	1	1	1	1	1
70	Fundo	1.282	7	7	1	1	7
71	Palmitalzinho	2.502	2	2	1	1	2
72	Ag. Pirapitinga	8.643	12	12	1	1	10
73	Ag. Funda	0.09	3	3	1	1	0
74	Ag. do Barreiro	0.08	9	9	1	1	7
75	Ag. da Lagoa	1.399	2	2	1	1	1
76	Ag. do Pavão	6.326	16	15	1	2	14
77	Ag. do Matão	1.473	22	22	1	1	22
78	Ag. do Pavãozinho	0.83	6	6	1	1	6
79	Figueira	0.62	4	4	1	1	4
80	Cabiuna	1.122	12	12	1	1	10
81	Ag. Jacu	2.72	10	10	1	1	9
82	Freire	2.532	14	14	1	1	12
83	Fortuninha	0.172	9	9	1	1	7
84	Ag. da Porca	0.61	7	7	1	1	7
85	Ag. do Óleo	3.572	15	14	1	2	12
86	Fortuna	8.583	16	16	1	1	12
87	Fortuninha2	1.27	1	1	1	1	0
88	Paulista	0.97	12	11	1	2	10
89	Baixadão	0.783	11	9	1	2	6
90	Cabral	0.08	6	6	1	1	6
91	Lagarto Verde	0.262	3	3	1	1	1
92	Serraria	1.946	1	1	1	1	1
93	Cateto	2.93	1	1	1	1	1
94	Ag. Tempestade	0.01	1	1	1	1	1
95	Ag. do Cervo	1.08	19	18	1	2	15
96	Ag. da Mata	0.714	2	2	1	1	2
97	Ag. da Pinga	0.432	5	5	1	1	5
98	Ag. da Divisa	0.016	2	2	1	1	2
99	Ag. do Café	4.36	4	4	1	1	3
100	Ag. do Campestre	0.888	3	3	1	1	2
101	Ag. Cedro	0.844	3	3	1	1	3
102	Ag. da Anta	15.345	12	12	1	1	12
103	Ag. Tanquinho	1.955	1	1	1	1	1
104	Faz. Bom Retiro	0.594	1	1	1	1	1
105	Ag. Cruz	0.135	1	1	1	1	1
106	Ag. Baixada	0.034	1	1	1	1	1
107	Rib. São Bartolomeu	0.339	1	1	1	1	1
108	Tijuco	0.439	1	1	0	0	1
109	Alambrado	1.746	1	1	0	0	1
110	Lemprado	0.785	1	1	0	0	1
111	Ag. Bonita	0.284	7	7	1	1	7
112	Ag. do Capão Bonito	2.677	6	6	1	1	5
113	Ag. Mombuca	8.853	1	1	1	1	1
114	Ag. Mombuquinha	0.688	4	4	1	1	3

ANEXO B V - Casos autóctones, importados e indeterminados de esquistossomose dos oito municípios autóctones da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016). *Subtt = Subtotal; *Imp = Importado; *Ind = Indeterminado. Fonte: Sucen e Sinan.

Período de estudo	Município Ano	Ourinhos				Assis				Ipaussu				Cândido Mota				Palmital			
		Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total
1º: 1978-1988	1978	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	70	0	74	0	23	4	27
	1979	45	40	2	87	10	115	0	125	0	4	0	4	1	10	0	11	0	17	1	18
	1980	44	35	2	81	7	55	2	64	0	4	0	4	1	8	0	9	0	2	0	2
	1981	86	19	4	109	8	16	1	25	0	4	0	4	1	8	0	9	0	2	0	2
	1982	255	108	39	402	11	102	0	113	0	0	0	0	0	26	1	27	1	6	1	8
	1983	251	112	48	411	3	12	0	15	0	0	0	0	0	13	0	13			0	0
	1984	157	108	15	280	9	16	0	25	2	11	0	13	1	11	0	12	0	2	0	2
	1985	85	19	9	113	10	61	0	71	0	0	0	0	1	10	0	11			0	0
	1986	12	4	3	19	3	11	0	14	0	0	0	0	0	7	0	7	0	1	0	1
	1987	20	13	2	35	1	7	0	8	1	2	0	3	0	7	1	8	0	3	0	3
1988	8	13	2	23	0	12	0	12	0	0	0	0	0	3	0	3			0	0	
	Subtt	963	472	126	1561	62	407	3	472	3	25	0	28	8	165	2	175	1	54	6	61
2º: 1989-1999	1989	12	7	1	20	2	5	0	7	1	1	1	3	0	1	0	1	1	0	0	1
	1990	25	7	2	34	11	13	3	27	0	2	0	2	0	1	0	1	0	2	0	2
	1991	5	8	3	16	1	3	1	5	1	1	0	2	0	1	0	1	0	3	0	3
	1992	76	9	4	89	0	6	0	6	0	5	0	5			0	0			0	0
	1993	16	6	2	24	1	3	0	4	1	3	0	4			0	0	0	5	0	5
	1994	8	7	0	15	2	3	0	5	0	2	0	2	0	3	0	3			0	0
	1995	14	5	3	22	0	1	0	1	2	1	0	3			0	0	0	1	0	1
	1996	11	8	2	21	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	1997	245	56	65	366	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
	1998	0	0	3	3	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
	1999	2	2	3	7	0	0	0	0	5	1	0	6	0	0	1	1	0	0	1	1
	Subtt	414	115	88	617	18	38	5	61	10	16	1	27	0	7	1	8	1	14	3	18
3º: 2000-2006	2000	0	0	13	13	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	5			0	0
	2001	0	0	9	9	0	0	0	0	0	0	3	3			0	0			0	0
	2002	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2			0	0
	2003	0	0	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2004	0	0	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2005	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2006	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
		Subtt	0	0	61	61	0	0	1	1	0	0	3	3	0	0	7	7	0	0	0
4º: 2007-2016	2007	3	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			0	0
	2008	1	0	2	3	0	2	0	2	0	0	0	0			0	0			0	0
	2009	8	2	17	27	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2010	4	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2011	2	2	9	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	2
	2012	1	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
	2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2014	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2015	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	2016	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0			0	0
	Subtt	25	5	33	63	0	2	0	2	0	0	0	0	0	3	0	3	2	1	0	3
	Total	1402	592	308	2302	80	447	9	536	13	41	4	58	8	175	10	193	4	69	9	82

Continuação da ANEXO B V

Período de estudo	Município Ano	Chavantes				Canitar				São Pedro do Turvo			
		Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total	Autóctone	Imp	Ind	Total
1º: 1978-1988	1978		0		0		0		0	0	0	0	0
	1979		0		0		0		0		15	0	15
	1980	0	2	0	2		0		0	0	5	0	5
	1981	0	25	0	25		0		0	0	2	0	2
	1982	0	1	0	1	0	3	0	3	0	8	0	8
	1983		0		0		0		0		0		0
	1984		0		0	0	3	0	3		0		0
	1985	0	15	0	15	0	2	0	2		0		0
	1986	0	4	0	4	0	1	0	1	1	10	0	11
	1987	0	4	0	4		0		0		0		0
1988	0	3	0	3		0		0		0		0	
	Subtt	0	54	0	54	0	9	0	9	1	40	0	41
2º: 1989-1999	1989		0		0		0		0		0		0
	1990	0	1	0	1		0		0	0	1	0	1
	1991		0		0		0		0		0		0
	1992		0		0	0	1	0	1		0		0
	1993		0		0		0		0	0	1	0	1
	1994		0		0	0	1	0	1		0		0
	1995	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
	1996		0		0		0		0		0		0
	1997		0		0	0	1	0	1		0		0
	1998		0		0		0		0		0		0
1999	0	1	0	1	0	0	1	1		0		0	
	Subtt	1	2	0	3	0	4	1	5	0	3	0	3
3º: 2000-2006	2000		0		0		0		0	0	0	1	1
	2001		0		0		0		0		0		0
	2002	0	0	1	1		0		0	0	0	1	1
	2003		0		0		0		0		0		0
	2004		0		0		0		0		0		0
	2005		0		0		0		0		0		0
	2006		0		0		0		0		0		0
	Subtt	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2
4º: 2007-2016	2007		0		0		0		0		0		0
	2008		0		0	1	0	0	1		0		0
	2009	1	0	0	1		0		0		0		0
	2010		0		0		0		0		0		0
	2011		0		0		0		0		0		0
	2012		0		0		0		0		0		0
	2013		0		0		0		0		0		0
	2014		0		0		0		0		0		0
	2015		0		0		0		0		0		0
2016		0		0		0		0		0		0	
	Subtt	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	Total	2	56	1	59	1	13	1	15	1	43	2	46

ANEXO B VI - Casos importados e indeterminados de esquistossomose dos demais municípios da unidade GeoSentinelas do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo, Brasil, segundo os quatro períodos do estudo (1978 a 2016). *Subtt = Subtotal; *Imp = Importado; *Ind = Indeterminado. Fonte: SUCEN e SINAN.

Período de estudo	Município Ano	Santa Cruz do Rio Pardo			Tarumã			Paraguçu Paulista			Cruzália			Maracáí			Ribeirão do Sul			Florínea			Ibirarema			Salto Grande		
		Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Total	
1º: 1978-1988	1978	2	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1			0				
	1979	17	0	17	26	0	26	4	0	4	8	0	8	4	0	4	5	0	5	12	0	12			0	12	12	
	1980	38	0	38	19	1	20	1	0	1	23	0	23	1	0	1	2	0	2		0	0	14	0	14			
	1981	9	0	9	10	0	10	66	1	67		0	0	26	0	26	2	0	2		0	0			0	1	1	
	1982	4	0	4	24	0	24	1	0	1	2	0	2	20	0	20	2	0	2	14	0	14			0	2	2	
	1983	55	0	55	1	0	1	1	0	1	11	0	11	7	0	7	0	0	0	0	1	1	2	0	2			
	1984	2	0	2	6	0	6	31	0	31	4	0	4	3	0	3	0	0	0	0	0	0			0			
	1985	3	0	3	16	0	16	4	0	4	1	0	1	15	0	15	0	0	0	0	0	0			0	4	4	
	1986	4	0	4	0	0	0	1	0	1		0	0	6	0	6	10	0	10		0	0			0	1	1	
	1987	2	0	2	5	0	5	1	0	1	7	0	7	6	0	6	2	0	2	3	1	4			0	2	2	
1988	3	0	3	4	0	4	0	0	0		0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0			0				
Subtt	139	1	140	111	1	112	110	1	111	56	0	56	91	0	91	23	0	23	30	2	32	16	0	16	22	22		
2º: 1989-1999	1989	1		1	3		3	4	0	4	1	0	1	1	0	1	6	0	6		0	0	1	0	1			
	1990	1		1	2		2	0	0	0	1	0	1	8	0	8	1	0	1		0	0			0			
	1991	1		1	1		1	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1			0			
	1992				1		1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1		0	0			0			
	1993				1		1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0		0	0			0			
	1994						0	1	1	1	0	1	1	0	1	2	0	2		0	0			0				
	1995	6		6	1		1	0	0	0		0	0	4	0	4	0	0	0		0	0			0			
	1996			0			0	0	0	0		0	0	1	0	1	0	0	0		0	0			0			
	1997	4		4			0	0	0	0		0	0	2	0	2	3	0	3		0	0			0			
	1998	2		2			0	0	0	0		0	0	3	0	3	5	0	5		0	0			0			
1999		4	4	1		1	0	0	0	1	3	4	1	1	2	0	1	1		0	0	3	3	6				
Subtt	15	4	19	10	0	10	5	0	5	8	3	11	23	1	24	18	1	19	1	0	1	4	3	7	0	0		
3º: 2000-2006	2000	0	5	5	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	6	6				
	2001	0	1	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2002	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2003	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2004	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2005	0	1	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2		0	0	0			0				
	2006	0	0	0	0		0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
Subtt	0	7	7	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	1	0	6	6	0	0			
4º: 2007-2016	2007	1	0	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2008	0	3	3	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2009	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2010	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2011	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2012	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2013	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2014	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
	2015	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0				
2016	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0			0					
Subtt	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Total	155	15	170	121	1	122	115	3	118	64	3	67	115	1	116	41	3	44	31	3	34	20	9	29	22	22		

Continuação ANEXO B VI

Período de estudo	Município	Ano	Pedrinhas Paulista		Platina		Lutécia		Bernardino de Campos			Borá		Óleo		Espírito Santo do Turvo			Timburi	
			Imp	Total	Imp	Total	Imp	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Total	Imp	Ind	Total	Imp	Total		
1º: 1978-1988		1978	1	1							0					0	0			
		1979	0	0			1	1			0	2	2			0	0			
		1980	5	5	11	11	10	10			0	4	4			0	0			
		1981	1	1					6		6			1	1	0	0			
		1982	0	0							0					0	0			
		1983	3	3	2	2					0	1	1			0	0		1	1
		1984	0	0	1	1			2		2					0	0			
		1985	0	0							0			1	1	0	0			
		1986	0	0							0					0	0			
		1987	2	2							0					0	0			
	1988	2	2					1		1					0	0				
	Subtt	14	14	14	14	11	11	9	0	9	7	7	2	2	0	0	0	1	1	
2º: 1989-1999		1989	4	4					1		1			1	1	0	0			
		1990	0	0	1	1					0					0	0			
		1991	2	2							0					0	0			
		1992	0	0							0					0	0			
		1993	0	0							0					0	0			
		1994	0	0			1	1			0				1	0	1			
		1995	0	0							0					0	0			
		1996	0	0							0					0	0			
		1997	0	0							0					0	0			
		1998	0	0							0					0	0			
	1999	0	0							0					0	0				
	Subtt	6	6	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	
3º: 2000-2006		2000	0	0						0						0				
		2001	0	0						0						0				
		2002	0	0					1	1						0				
		2003	0	0							0				1	1				
		2004	0	0							0					0				
		2005	0	0							0					0				
		2006	0	0							0					0				
	Subtt	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
4º: 2007-2016		2007	0	0						0						0				
		2008	0	0						0						0				
		2009	0	0						0						0				
		2010	0	0						0						0				
		2011	0	0						0						0				
		2012	0	0						0					1	1				
		2013	0	0						0						0				
		2014	0	0						0						0				
		2015	0	0						0						0				
	2016	0	0						0						0					
	Subtt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
	Total	20	20	15	15	12	12	10	1	11	7	7	3	3	1	2	3	1	1	

ANEXO B VII - Coordenadas geográficas dos 258 pontos de coletas de *Biomphalaria* e Malaco Fauna associada em 92 coleções hídricas nos cinco municípios de estudo no período de 2015-2018, na região do Médio Paranapanema, São Paulo, Brasil e os número de referência das sequências de COI do GenBank e *Voucher*. M= Município, Ch=Chavantes, Ip= Ipaussu LBMSU - Laboratório de Biologia Molecular da SUCEN, LRNEM - Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose, do Instituto Oswaldo Cruz.

M	Coleção Hídrica	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Espécies	GenBank (COI)	Voucher (LBMSU)	Voucher (LRNEM)	
Ipaussu	Douradão	1.03	23°04'56.82" S	49°32'35.88" W	<i>B. peregrina</i>				
		2.02	23°04'16.07" S	49°32'14.03" W	<i>Pomacea</i>			NA094/17	
	Vituosa	2.03	23°03'06.74" S	49°32'54.17" W	<i>B. peregrina</i>				
		2.04	23°03'36.26" S	49°32'57.92" W	<i>B. peregrina, Physa, Pomacea</i>			NA089/17	
	Pau D'Alho	3.01	23°04'44.76" S	49°32'52.16" W	<i>B. peregrina e B. straminea</i>	MK395801	829		
	Água Úmida	4.01	23°05'07.92" S	49°33'39.24" W	<i>B. peregrina</i>	MK395802	1170		
	Palmeiras	5.01	23°01'33.42" S	49°33'54.08" W	<i>B. peregrina e B. occidentalis</i>	MK395803	817		
	Lambari	6.01	23°06'17.64" S	49°34'18.48" W	<i>B. peregrina</i>				
	Sto Antonio	7.01	23°05'57.59" S	49°35'31.28" W	<i>Pomacea</i>				
	Santa Hermínia		8.01	23°05'18.86" S	49°36'37.55" W	<i>Drepanotrema</i>			
			8.02	23°05'03.84" S	49°36'23.51" W	<i>B. peregrina</i>			
			8.05	23°04'06.35" S	49°37'19.74" W	<i>Biomphalaria</i>			
	Faz. Boa Vista		9.01	23°05'39.59" S	49°39'01.52" W	<i>B. tenagophila e B. straminea</i>	MK395804-05	757, 884	
			9.03	23°03'34.42" S	49°37'36.41" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395806-09	772, 773, 804, 882	
			9.04	23°03'32.01" S	49°37'25.40" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395810-14	751, 803, 885, 713, 714	
			9.05	23°03'28.91" S	49°37'19.31" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	MK395815-16	750, 881	
			10.01	23°03'53.10" S	49°37'48.90" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis</i>	MK395817-20	777, 802, 891, 954	
			10.02	23°03'36.29" S	49°37'41.99" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis</i>	MK395821-23	774, 888, 951	
		São Luiz, Sapó	10.06	23°02'51.11" S	49°37'48.90" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395824-28	711, 712, 748, 879, 952	
			10.07	23°02'47.62" S	49°37'39.11" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	MK395829-32	779, 798, 799, 950	
			10.1	23°02'44.70" S	49°37'30.90" W	<i>B. peregrina</i>	MK395833	753	
			11.02	23°00'05.40" S	49°37'49.55" W	<i>B. occidentalis, Physa, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	MK395834	824	NA090/17
	Mombuca		11.03	23°00'10.37" S	49°37'50.09" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis, Pomacea</i>	MK395835-36	776, 827	
			11.04	23°00'04.97" S	49°37'57.36" W	<i>Physa, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>			NA091/17
			12.02	23°00'20.63" S	49°37'56.64" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina, Physa</i>	MK395837-38	767, 1166	NA087/17
Mombuquinha		12.03	23°00'28.91" S	49°38'01.32" W	<i>B. peregrina, Physa e Melanoides</i>	MK395839-40	759, 894	NA086/17	
		12.04	23°00'36.80" S	49°38'08.88" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	MK395841-43	778, 1172, 890		
	Ag. do Triunfo	13.05	23°03'49.32" S	49°39'46.55" W	<i>Biomphalaria, Pomacea</i>			NA092/17	
Barranco Vermelho		14.01	23°04'21.08" S	49°40'51.78" W	<i>B. peregrina, Physa, Pomacea</i>	KX354442, MK395844-47	754, 755, 825, 886, 1165		
		14.03	23°03'26.39" S	49°40'55.49" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	MK395848-49	749, 887		
		14.05	23°03'08.21" S	49°40'38.90" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	KX354441, MK395850	756, 889		
		14.07	23°03'25.38" S	49°40'54.56" W	<i>Pomacea</i>				
		14.08	23°03'21.14" S	49°40'54.92" W	<i>Physa, Pomacea</i>				
		14.09	23°03'13.97" S	49°40'56.00" W	<i>Drepanotrema, Pomacea</i>				
		14.1	23°03'07.74" S	49°40'56.28" W	<i>Physa, Pomacea, Drepanotrema</i>				
		15.01	23°02'14.10" S	49°38'46.14" W	<i>Biomphalaria, Physa, Pomacea</i>				
		15.02	23°01'56.46" S	49°38'55.94" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina, Pomacea</i>	MK395851-54	760, 877, 1164, 1209	NA093/17	
		15.03	23°01'52.58" S	49°38'58.56" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395855-57	758, 820, 883		
Ribeirão Grande		15.04	23°01'53.04" S	49°39'02.06" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395858-63	703, 704, 715, 732, 762, 823		
		15.06	23°01'46.64" S	49°39'12.35" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina, Physa, Pomacea</i>	KX354440, MK395864-65	761, 1169, 893		
Ch		15.1	22°59'48.05" S	49°40'42.53" W	<i>Drepanotrema, Pomacea</i>			NA079/17	
Ip	Boa Vista (Divisa)	16.03	23°01'17.04" S	49°40'22.19" W	<i>B. tenagophila e B. peregrina</i>	MK395866	878		
	Ribeirão Bonito		18.01	23°06'07.13" S	49°41'51.36" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395867-68	1154, 1155	
			18.06	23°03'33.84" S	49°42'35.03" W	<i>Pomacea</i>			
			18.07	23°03'29.45" S	49°42'39.24" W	<i>Physa</i>			
			18.08	23°03'16.46" S	49°42'28.37" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>	MK395869	1158	NA082/17
	Toperó		19.01	23°04'40.19" S	49°41'26.24" W	<i>Biomphalaria, Physa, Drepanotrema cimex</i>			NA081/17
			19.03	23°03'05.22" S	49°41'38.69" W	<i>B. occidentalis, Physa</i>	MK395870	1153	
			19.04	23°02'56.33" S	49°41'39.30" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>	MK395871-72	1151, 1152	NA080/17
			20.01	23°01'52.97" S	49°42'09.98" W	<i>B. peregrina, Melanoides tuberculata</i>			
	Santo Antonio		20.02	23°01'53.66" S	49°41'54.78" W	<i>Drepanotrema</i>			
			20.03	23°01'33.71" S	49°41'21.48" W	<i>B. occidentalis, Physa</i>	MK395873-76	718, 785, 1146, 1147	NA077/17
			20.04	23°01'17.33" S	49°40'59.63" W	<i>B. tenagophila, Physa</i>	MK395877-82	720, 721, 722, 786, 801, 1148	
Piranhas	21.01	23°00'50.51" S	49°41'04.82" W	<i>B. tenagophila, Pomacea</i>	MK395883-84	1149, 1150	NA078/17		

M	Coleção Hídrica	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Espécies	GenBank (COI)	Voucher (LBMSU)	Voucher (LRNEM)
	Morais	22.01	22°58'58.19" S	49°41'22.13" W	<i>Pomacea</i>			NA083/17
		22.02	22°58'26.84" S	49°41'12.23" W	<i>Biomphalaria, Pomacea, Drepanotrema, Lymnaea</i>			
	Harmonia	23.03	23°04'52.43" S	49°44'20.15" W	<i>B. peregrina</i>	MK395885-86	1144, 1145	
	Colossinho	24.03	23°03'39.24" S	49°44'10.04" W	<i>B. straminea</i>	MK395887	781	
		24.07	23°02'37.32" S	49°42'42.48" W	<i>B. peregrina e B. occidentalis</i>	MK395888-89	780, 806	
	Tupanciretã	25.01	23°04'07.25" S	49°45'49.32" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395890	1142	
	Ag. Morna	27.01	23°01'07.86" S	49°42'50.87" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>	MK395891-92	1156, 1157	NA085/17
	Ag. coqueiros	28.01	23°00'53.82" S	49°44'25.88" W	<i>B. peregrina, Physa</i>	MK395893-95	1159, 1160, 1161	NA084/17
	Bento	30.01	23°02'00.42" S	49°46'16.07" W	<i>Drepanotrema</i>			
Ch	Pq. Trianon	31.01	22°56'32.64" S	49°43'28.13" W	<i>B. straminea, Physa, Melanoides, Drepanotrema, Lymnaea</i>			
	Lageadinho	32.04	23°01'22.19" S	49°49'36.23" W	<i>B. glabrata</i>	MK395896-98	943, 944, 1120	
		32.05	23°00'39.50" S	49°49'28.20" W	<i>B. glabrata</i>			
		33.01	23°03'52.10" S	49°51'10.80" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>	MK395899-901	974, 1122, 1123	
		33.03	23°02'35.74" S	49°51'13.97" W	<i>Biomphalaria</i>			
		33.04	23°02'29.87" S	49°51'14.22" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395902	953	
		33.09	23°02'29.94" S	49°51'36.83" W	<i>B. glabrata</i>	MK395903	975	
	Sobra	33.11	23°02'23.10" S	49°51'42.84" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395904	947	
		33.12	23°02'17.99" S	49°51'41.04" W	<i>B. straminea e B. occidentalis</i>	MK395905	946	
		33.13	23°01'56.64" S	49°51'31.04" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395906	957	
		33.14	23°01'38.90" S	49°51'53.54" W	<i>B. glabrata</i>	MK395907-908	948, 949	
		33.15	23°01'30.22" S	49°51'49.86" W	<i>B. straminea</i>	MK395909	955	
		33.16	23°01'26.87" S	49°51'48.96" W	<i>B. peregrina</i>	MK395910	956	
	Café	34.01	23°04'03.00" S	49°51'59.84" W	<i>B. occidentalis, Drepanotrema</i>	MK395911	1009	
		35.01	23°03'28.88" S	49°52'36.95" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395912	973	
	Japoneses	35.02	23°03'22.04" S	49°52'38.39" W	<i>B. peregrina</i>	MK395913-14	977, 1026	
		35.05	23°03'07.20" S	49°52'10.28" W	<i>B. peregrina</i>	MK395915	976	
	Canaa	36.02	23°02'33.11" S	49°52'59.78" W	<i>B. peregrina</i>	MK395916	945	
	Paraíso	37.01	23°02'03.34" S	49°54'52.71" W	<i>Drepanotrema</i>			
		38.02	22°59'19.50" S	49°48'04.22" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395917	1121	
	Barreirinha	38.03	22°59'15.29" S	49°48'02.16" W	<i>B. peregrina e B. occidentalis, Drepanotrema</i>	MK395918-19	1051, 1052	
		38.04	22°59'08.88" S	49°48'01.88" W	<i>B. tenagophila</i>	MK395920	1053	
		39.01	23°00'58.72" S	49°54'18.00" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis</i>	MK395921-26	670, 671, 745, 873, 876, 942	
		39.02	23°01'16.22" S	49°52'38.21" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis</i>	MK395927-30	746, 870, 941, 775	
		39.03	23°01'27.05" S	49°52'14.96" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395931-32	1210, 1211	
	Jacu	39.04	23°00'32.19" S	49°52'21.90" W	<i>B. glabrata, Physa, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	KX354436, KX354434, MK395933-34	763, 765, 866, 940	NA108/17
		39.06	23°00'24.81" S	49°51'48.71" W	<i>B. peregrina, Physa, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	KX354444, MK395935-36	739, 871, 939	NA107/17
		39.09	23°00'11.49" S	49°51'41.40" W	<i>B. peregrina, Melanoides tuberculata</i>	KX354443, MK395937	747, 872	NA106/17
	Jacuzinho	40.03	22°59'42.40" S	49°52'27.59" W	<i>B. straminea, Physa, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	MK395938	738	NA100/17
		41.02	22°58'50.81" S	49°50'31.46" W	<i>B. occidentalis, Physa, Pomacea</i>	MK395939-41	769, 807, 808	NA104/17
	Furnas	41.03	22°58'45.20" S	49°50'43.41" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395942-44	770, 800, 809	
		41.05	22°58'14.24" S	49°51'07.20" W	<i>B. occidentalis, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	MK395945-47	680, 771, 822	NA105/17
	São Joaquim	42.01	22°58'23.27" S	49°49'12.98" W	<i>B. peregrina</i>	MK395948	1130	
		43.01	22°59'08.02" S	49°50'59.90" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis, Drepanotrema, Pomacea, Melanoides</i>	MK395949-51	742, 875, 816	NA101/17
	Furninhas	43.02	22°58'37.42" S	49°51'06.02" W	<i>B. occidentalis, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	MK395952-54	828, 874, 674	NA102/17
		43.03	22°58'36.38" S	49°51'06.30" W	<i>B. tenagophila, Physa, Pomacea, Drepanotrema</i>			NA103/17
	Monjolinho	44.01	22°59'53.99" S	49°54'01.01" W	<i>B. occidentalis, Physa, Pomacea</i>	MK395955-56	737, 1177	
	Chumbiadinha	45.01	22°58'31.73" S	49°53'27.06" W	<i>B. occidentalis, Physa, Pomacea</i>	MK395957-60	707, 744, 865, 938	NA099/17
		46.05	22°58'03.36" S	49°52'28.85" W	<i>B. glabrata, Pomacea, Melanoides tuberculata</i>	KX354433, MK395961-66	766, 818, 819, 868-869, 935, 1025	NA095/17
		46.06	22°58'01.64" S	49°52'30.62" W	<i>B. glabrata</i>			
	Christoni	46.1	22°57'52.10" S	49°52'32.27" W	<i>B. occidentalis, Melanoides tuberculata, Lymnaea</i>	MK395967-68	812, 813	NA096/17
		46.11	22°57'10.19" S	49°52'34.79" W	<i>B. occidentalis e B. glabrata, Physa, Pomacea, Drepanotrema</i>	MK395969-74, KX354437-38	743, 815, 708, 733, 735, 867, 936, 937	NA097/17
		46.12	22°57'00.18" S	49°52'33.06" W	<i>B. occidentalis e B. glabrata, Pomacea, Drepanotrema depressissimum</i>	KX354435, MK395975-76	764, 864B, 814	NA098/17

M	Coleção Hídrica	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Espécies	GenBank (COI)	Voucher (LBMSU)	Voucher (LRNEM)	
Ourinhos	Ag. Veada	47.1	22°57'11.60" S	49°52'41.92" W	<i>B. straminea</i> e <i>B. occidentalis</i>	MK395977-88	694-702, 810, 811, 736		
	Providencia	48.01	22°58'54.12" S	49°55'32.09" W	<i>Drepanotrema</i> , <i>Pomacea</i>				
		48.02	22°58'41.60" S	49°55'19.92" W	<i>Physa</i>				
	Fazenda Paraíso	49.01	22°58'15.96" S	49°56'01.43" W	<i>Drepanotrema cimex</i>				
		49.02	22°57'42.77" S	49°56'34.44" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>				
	Faz. Figueirinha	51.01	22°57'49.79" S	49°47'47.66" W	<i>Melanoides</i> , <i>Lymnaea</i>				
	Faz. Nova Era	52.01	22°57'46.26" S	49°47'14.54" W	<i>B. peregrina</i> , <i>Physa</i> , <i>Drepanotrema</i>				
	Usina São Luiz	53.01	22°56'31.56" S	49°49'45.02" W	<i>Drepanotrema</i> , <i>Pomacea</i>				
		53.02	22°56'24.18" S	49°48'35.82" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i> , <i>Pomacea</i>	MK395989	1050		
		53.03	22°55'56.57" S	49°47'25.26" W	<i>Pomacea</i>				
		53.04	22°56'36.68" S	49°46'05.52" W	<i>Physa</i> , <i>Melanoides</i> , <i>Pomacea</i> , <i>Drepanotrema</i>				
		53.05	22°55'45.20" S	49°45'51.20" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>	MK395990-91	1047, 1048		
	Faz. Jaquarere	54.01	22°56'34.73" S	49°44'55.07" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Melanoides</i>	MK395992	1049		
	Asa Branca	55.01	22°55'10.42" S	49°50'43.84" W	<i>B. peregrina</i>	MK395993-94	1045, 1046		
		55.02	22°55'00.92" S	49°50'19.22" W	<i>Biomphalaria</i>				
	Fundo	56.01	22°53'03.59" S	49°51'20.27" W	<i>B. occidentalis</i>	MK395995	1018		
		56.04	22°52'46.56" S	49°51'26.18" W	<i>B. peregrina</i> e <i>B. occidentalis</i>	MK395996	1017		
		56.05	22°52'36.41" S	49°51'29.81" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>	MK395997	1016		
		56.06	22°52'19.02" S	49°51'47.60" W	<i>Drepanotrema lucidum</i> , <i>Pomacea</i>				
		56.09	22°52'08.69" S	49°51'55.26" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Drepanotrema</i>	MK395998	1014		
		56.12	22°51'45.80" S	49°52'12.29" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Drepanotrema</i>	MK395999	1013		
		56.15	22°51'40.07" S	49°52'24.32" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i> , <i>Pomacea</i> , <i>Melanoides tuberculata</i>	MK396000-01	1011, 1012		
		56.17	22°52'09.59" S	49°51'47.16" W	<i>Drepanotrema</i>				
		56.19	22°51'54.83" S	49°51'58.14" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>				
		Ribeirão Grande	57.01	22°53'10.94" S	49°50'44.34" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Drepanotrema</i> , <i>Pomacea</i>	MK396002	1044	
	57.02		22°52'40.52" S	49°50'25.52" W	<i>Biomphalaria</i>				
	57.04		22°52'34.32" S	49°50'15.90" W	<i>B. occidentalis</i>	MK396003	1042		
	57.05		22°52'31.08" S	49°50'11.48" W	<i>B. peregrina</i>				
	57.06		22°52'27.38" S	49°50'07.19" W	<i>Drepanotrema</i>				
	57.08		22°52'14.60" S	49°50'02.69" W	<i>B. peregrina</i> , <i>Physa</i>	MK396004	1024		
	57.1		22°52'04.52" S	49°49'59.78" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i>	MK396005	1023		
	57.13		22°51'47.06" S	49°49'32.52" W	<i>B. peregrina</i> , <i>Physa</i> , <i>Drepanotrema</i>	MK396006	1022		
	57.14		22°51'55.80" S	49°49'29.00" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Drepanotrema</i>				
	57.15		22°52'46.49" S	49°50'03.95" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Drepanotrema</i> , <i>Pomacea</i>	MK396007	1021		
	57.16		22°52'40.98" S	49°50'03.48" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i>	MK396008	1019		
	57.28		22°46'47.10" S	49°52'09.05" W	<i>Drepanotrema</i>				
	57.4		22°46'43.76" S	49°52'20.39" W	<i>B. peregrina</i>				
	57.41		22°46'34.68" S	49°52'20.00" W	<i>B. peregrina</i>	MK396009-10	1139-1140		
	Burgues		58.01	22°48'49.86" S	49°55'23.45" W	<i>B. occidentalis</i>	MK396011	709	
		58.04	22°47'37.68" S	49°54'07.92" W	<i>Biomphalaria</i>				
		58.05	22°47'35.99" S	49°54'03.86" W	<i>Drepanotrema</i>				
		58.06	22°47'36.32" S	49°53'59.18" W	<i>Drepanotrema</i>				
		58.07	22°47'22.67" S	49°53'48.23" W	<i>Physa</i>				
	Água do Cascavel	59.01	22°48'10.34" S	49°54'04.86" W	<i>B. peregrina</i> , <i>Physa</i> , <i>Drepanotrema</i>	MK396012	1062		
		59.02	22°48'08.00" S	49°54'18.47" W	<i>Physa</i>				
	Sapeçado	60.03	22°47'25.01" S	49°51'30.42" W	<i>Drepanotrema</i>				
		62.01	22°48'30.14" S	49°57'58.04" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>	MK396013	1141		
		62.02	22°48'11.09" S	49°57'43.82" W	<i>B. peregrina</i> , <i>Pomacea</i>				
		62.03	22°47'47.15" S	49°57'36.44" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i> , <i>Pomacea</i> , <i>Drepanotrema</i>	MK396014-15	1059, 1060		
		62.04	22°46'53.87" S	49°55'39.72" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Melanoides</i> , <i>Pomacea</i>	MK396016	1056		
		62.05	22°47'25.08" S	49°57'10.91" W	<i>B. straminea</i>	MK396017-19	793, 794, 1058		
		Ribeirão do Pinto	62.06	22°47'15.44" S	49°56'56.94" W	<i>B. peregrina</i> e <i>B. occidentalis</i> , <i>Melanoides</i> , <i>Pomacea</i>	MK396020-21	792, 805	
			62.09	22°47'02.22" S	49°56'29.76" W	<i>B. straminea</i> e <i>B. occidentalis</i> , <i>Melanoides</i> , <i>Pomacea</i>	MK396022-23	791, 1138	
		62.1	22°46'58.26" S	49°56'05.28" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Physa</i> e <i>Melanoides</i>	MK396024	790		
		62.11	22°46'50.09" S	49°55'59.24" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Pomacea</i>	MK396025-26	789, 710		
	62.12	22°46'52.14" S	49°55'35.51" W	<i>B. occidentalis</i> , <i>Melanoides</i>	MK396027-30	787, 788, 1054, 1055			
	62.28	22°45'32.69" S	49°53'39.95" W	<i>B. occidentalis</i>					
	Capim	63.08	22°44'05.46" S	49°57'02.88" W	<i>B. peregrina</i>				
		63.13	22°43'26.76" S	49°56'36.71" W	<i>Drepanotrema</i>				
		63.14	22°43'28.28" S	49°56'38.58" W	<i>Drepanotrema</i>				
		63.15	22°43'25.14" S	49°56'33.62" W	<i>B. peregrina</i>				
		63.16	22°43'21.18" S	49°56'32.00" W	<i>B. peregrina</i>				
		63.2	22°42'28.16" S	49°56'24.36" W	<i>B. peregrina</i>				
		65.08	22°44'58.10" S	49°55'55.13" W	<i>B. peregrina</i>				
	Matão	65.1	22°44'55.50" S	49°56'08.63" W	<i>B. peregrina</i>				
		65.11	22°44'54.24" S	49°56'21.74" W	<i>Drepanotrema</i>				

M	Coleção Hídrica	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Espécies	GenBank (COI)	Voucher (LBMSU)	Voucher (LRNEM)
		65.12	22°44'52.19" S	49°56'46.76" W	<i>B. straminea, lesma</i>	MK396031-32	706, 1097	
	Ag. Boa Vista	66.01	22°43'49.70" S	49°54'28.26" W	<i>B. peregrina</i>			
	Guariroba	67.01	22°42'30.14" S	49°53'41.90" W	<i>B. peregrina</i>			
	Lagoa	68.01	22°44'06.11" S	49°57'38.42" W	<i>B. straminea</i>	MK396033	1137	
	Água da Pirapitinga	72.02	22°39'29.52" S	50°19'16.07" W	<i>B. occidentalis, Drepanotrema</i>			
		72.04	22°37'53.08" S	50°19'01.85" W	<i>B. occidentalis</i>			
	Água Funda	73.01	22°40'25.97" S	50°19'48.18" W	<i>B. peregrina e B. straminea</i>			
		73.02	22°40'24.17" S	50°19'38.54" W	<i>B. peregrina</i>			
		73.03	22°40'17.33" S	50°20'06.29" W	<i>B. straminea</i>			
		74.05	22°38'11.66" S	50°20'14.57" W	<i>B. peregrina</i>			
	Água do Barreiro	74.06	22°38'13.49" S	50°19'49.88" W	<i>Drepanotrema</i>			
		74.08	22°38'18.50" S	50°19'30.26" W	<i>Biomphalaria</i>			
	Ag. Lagoa	75.02	22°36'18.90" S	50°20'25.52" W	<i>B. occidentalis</i>			
Assis		76.01	22°41'11.22" S	50°22'03.90" W	<i>B. occidentalis</i>			
	Água do Pavão	76.06	22°38'23.10" S	50°21'57.17" W	<i>Drepanotrema, Pomacea</i>			
		76.08	22°39'19.70" S	50°21'51.02" W	<i>Lymnaea</i>			
		76.14	22°40'15.35" S	50°21'52.92" W	<i>Drepanotrema</i>			
		77.06	22°40'40.26" S	50°22'58.91" W	<i>Physa</i>			
	Água do Matão	77.08	22°40'35.40" S	50°23'03.56" W	<i>Physa e Melanoides</i>			
		77.12	22°40'28.28" S	50°23'15.36" W	<i>Drepanotrema</i>			
		77.13	22°40'23.34" S	50°23'20.40" W	<i>Pomacea</i>			
		77.14	22°40'09.48" S	50°23'40.85" W	<i>Drepanotrema</i>			
	Ag. Pavãozinho	78.01	22°38'40.10" S	50°22'49.16" W	<i>Physa</i>			
	Figueira	79.01	22°42'17.03" S	50°25'11.36" W	<i>Physa, Drepanotrema</i>			
		79.02	22°42'12.17" S	50°24'54.08" W	<i>Drepanotrema, Melanoides</i>			
		80.01	22°42'00.83" S	50°24'08.90" W	<i>Physa e Melanoides</i>			
		80.02	22°41'56.30" S	50°24'21.35" W	<i>B. occidentalis</i>	MK396034-35	1188, 1189	
		80.03	22°41'38.69" S	50°24'41.58" W	<i>Drepanotrema, Melanoides, Physa</i>			
		80.04	22°41'33.47" S	50°24'50.69" W	<i>Melanoides</i>			
	Cabiuna	80.06	22°41'26.16" S	50°24'57.17" W	<i>B. occidentalis, Lymnaea columella, Physa, Melanoides tuberculata</i>	MK396036-37	1195, 1196	NA198/18
		80.07	22°41'21.12" S	50°25'07.22" W	<i>Physa, Drepanotrema</i>			
	80.08	22°41'15.11" S	50°25'06.86" W	<i>Melanoides tuberculata, Physa</i>			NA194/18	
	80.09	22°41'02.76" S	50°25'10.31" W	<i>Physa</i>			NA193/17	
	80.12	22°40'42.32" S	50°25'11.18" W	<i>Physa, Pomacea</i>				
	Água do Jacu	81.07	22°40'15.06" S	50°24'22.04" W	<i>B. tenagophila e B. occidentalis, Physa</i>	MK396038-40	1178, 1179, 1180	
		82.02	22°41'04.67" S	50°26'04.92" W	<i>Pomacea</i>			NA195/18
		82.03	22°41'06.98" S	50°26'05.21" W	<i>Pomacea</i>			NA196/19
	Freire	82.04	22°41'10.32" S	50°26'06.83" W	<i>Drepanotrema lucidum, Pomacea</i>			NA197/20
		82.06	22°41'17.45" S	50°26'15.80" W	<i>Physa, Pomacea, Drepanotrema</i>			
		82.08	22°41'01.68" S	50°27'10.80" W	<i>B. peregrina, Physa, Pomacea</i>	MK396041-42	1184, 1185	
		82.12	22°40'53.15" S	50°27'19.37" W	<i>Biomphalaria</i>			
		82.14	22°40'47.82" S	50°27'26.18" W	<i>Melanoides, Pomacea</i>			
		83.02	22°39'27.62" S	50°25'48.90" W	<i>Biomphalaria</i>			
	Fortuninha	83.03	22°39'29.56" S	50°26'07.62" W	<i>Drepanotrema, Melanoides tuberculata</i>			
		83.05	22°39'36.87" S	50°26'15.04" W	<i>B. glabrata, Lymnaea</i>	MK396043-44	1191, 1192	
		83.06	22°39'39.28" S	50°26'19.18" W	<i>Melanoides tuberculata</i>			NA199/17
		84.01	22°38'35.56" S	50°25'04.80" W	<i>Physa, Drepanotrema</i>			
	Água da Porca	84.02	22°38'13.74" S	50°25'04.73" W	<i>Melanoides, Physa, Pomacea</i>			
		84.04	22°37'55.56" S	50°25'13.34" W	<i>Physa, Melanoides, Pomacea, Drepanotrema</i>			
Assis		85.01	22°38'19.29" S	50°26'03.20" W	<i>Biomphalaria</i>			
		85.11	22°36'44.57" S	50°27'04.65" W	<i>Drepanotrema cimex, Drepanotrema depressissimum</i>			NA200/17
		85.13	22°36'39.06" S	50°27'05.08" W	<i>B. occidentalis, Pomacea, Melanoides, Lymnaea, Drepanotrema</i>	MK396045-46	1193, 1194	
		85.14	22°36'36.29" S	50°27'10.05" W	<i>Melanoides tuberculata, Pomacea, Physa, Lymnaea columella</i>			NA201/17
		86.09	22°39'27.26" S	50°30'08.54" W	<i>B. occidentalis</i>	MK396047-48	1200, 1201	
		86.1	22°39'28.44" S	50°30'23.48" W	<i>B. occidentalis</i>	MK396049-50	1202, 1203	
	Fortuna	86.11	22°39'20.42" S	50°30'31.22" W	<i>Drepanotrema</i>			
		86.14	22°39'23.22" S	50°31'06.68" W	<i>B. peregrina</i>	MK396051-52	1204, 1205	
		86.15	22°39'20.63" S	50°31'14.45" W	<i>B. peregrina</i>	MK396053-54	1206, 1207	
	Fortuninha2	87.01	22°40'37.28" S	50°29'07.01" W	<i>B. peregrina, Melanoides</i>	MK396055	1208	
		88.04	22°38'54.10" S	50°27'47.27" W	<i>Drepanotrema</i>			
	Paulista	88.06	22°38'47.91" S	50°27'31.83" W	<i>B. peregrina, Melanoides, Pomacea</i>	MK396056	1212	
	89.03	22°39'02.60" S	50°29'43.55" W	<i>B. peregrina e B. straminea, Drepanotrema</i>	MK396057	1216		
	89.05	22°38'55.68" S	50°29'23.93" W	<i>B. straminea, Drepanotrema</i>	MK396058	1215		
Baixadão	89.06	22°38'52.55" S	50°28'46.92" W	<i>Physa, Drepanotrema, outra</i>				
	89.07	22°38'43.44" S	50°29'26.92" W	<i>B. straminea, Lymnaea, Physa, Drepanotrema</i>	MK396059-60	1213, 1219		
	89.08	22°38'39.99" S	50°29'22.89" W	<i>Drepanotrema</i>				
Cabral	90.06	22°39'40.43" S	50°31'01.56" W	<i>Melanoides</i>				
Lagarto Verde	91.01	22°39'05.12" S	50°30'23.51" W	<i>B. peregrina</i>	MK396061-62	1222-1223		

M	Coleção Hídrica	Nº do ponto	Latitude	Longitude	Espécies	GenBank (COI)	Voucher (LBMSU)	Voucher (LRNEM)
		91.03	22°38'18.78" S	50°30'14.48" W	<i>B. peregrina</i>	MK396063-64	1220-1221	
	Serraria	92.01	22°39'25.13" S	50°31'46.02" W	<i>Drepanotrema</i>			
	Cateto	93.01	22°39'33.95" S	50°34'09.02" W	<i>Drepanotrema</i>			
		95.02	22°36'39.89" S	50°26'48.41" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>			
		95.03	22°36'40.07" S	50°26'48.74" W	<i>B. occidentalis</i>			
	Água do Cervo	95.12	22°37'00.30" S	50°31'49.80" W	<i>B. peregrina, Physa, Drepanotrema</i>			
		95.14	22°37'08.33" S	50°32'17.09" W	<i>Physa</i>			
	Água do Café	99.02	22°34'33.42" S	50°18'58.40" W	<i>Pomacea</i>			
		99.04	22°33'55.08" S	50°19'20.82" W	<i>B. peregrina</i>			
	Água do Campestre	100.02	22°35'29.22" S	50°21'32.40" W	<i>B. occidentalis</i>			
	Água da Anta	102.06	22°33'34.10" S	50°26'52.66" W	<i>Melanoides, Lymnaea</i>			
		102.07	22°33'28.05" S	50°26'56.26" W	<i>Melanoides</i>			
	Faz. Bom Retiro	104.01	22°29'30.99" S	50°20'51.80" W	<i>Lymnaea</i>			
	Água Bonita	111.07	22°32'01.22" S	50°26'48.77" W	<i>Drepanotrema</i>			
	Água do Capão	112.01	22°32'04.82" S	50°25'49.66" W	<i>B. occidentalis, Pomacea</i>			
	Bonito	112.04	22°31'58.62" S	50°25'46.92" W	<i>Pomacea</i>			
	Ag.	114.01	22°29'35.74" S	50°22'56.36" W	<i>Lymnaea</i>			
	Mombuquinha	114.03	22°27'28.05" S	50°25'05.13" W	<i>B. occidentalis</i>			

ANEXO B VIII - Teste do DNA Barcode, ABDG

ABDG N= 98

Initial Partition with prior maximal distance P=2.15e-02
Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000
Group[1] n: 56 ;id: Bsp1OU30 Bsp21OU30 Bsp2OU30 Bsp3OU34 Bsp29OU32 Bsp30OU32 Bsp31OU32 Bsp6OU38 Bsp10OU38 Bsp7OU38 Bsp8OU38 Bsp9OU38 Bsp11OU38 ma1OU37 Bsp17OU35 Bsp15CV17 Bsp32IP9 Bsp33IP10 ma5RB46 ma8CV20 ma11OU34 ma14OU34 Bsp5OU38 Bsp12OU38 ma6OU32 ma10OU37 ma17OU25 Bsp36OU25 Bsp38OU42 ma19OU42 Bsp39OU43 Bsp40OU43 Bsp4OU32 ma9OU32 Bsp43OU43 Bsp44RB46 ma21OU25 ma22OU25 ma23RB46 Im4CV16 Im7CV15 ma28CV22 ma24CV17 ma25CV17 Im5CV16 Bsp49CV16 Im6CV15 ma29CV22 ma30CV15 Bsp50AS52 Bsp51AS52 ma34OU30 ma33OU30 Bsp53AS57 Bsp52AS57 Bsp13OU38
Group[2] n: 12 ;id: Bsp28IP11 ma12IP13 ma13IP13 Im3OU34 ma15IP8 ma18IP9 Bsp37OU25 Bsp20OU34 ma20OU29 ma16IP11 ma26CV18 ma27CV18
Group[3] n: 10 ;id: ma4OU37 Im1OU37 Im2OU37 Bsp42OU37 Bsp26OU30 Bsp27OU30 Bsp35OU24 Bsp34OU24 ma31AS55 ma32AS55
Group[4] n: 7 ;id: Bsp16OU38 Bsp18OU31 Bsp57AS60 Bsp56AS60 ma3IP8 Bsp14RB48 Bsp46RB46
Group[5] n: 12 ;id: Bsp45RB45 Bsp41OU43 Bsp19OU30 Bsp22OU30 Bsp25IP13 ma7RB46 Bsp47CV19 Bsp48CV19 Bsp55AS59 Bsp54AS58 Bsp24IP11 ma2IP8
Group[6] n: 1 ;id: Bsp23IP9

ABDG N= 177

Group[1] n: 58 id: Bo5OU30 Bo11OU32 Bo12OU32 Bo13OU38 Bo14OU38 Bo1OU36 Bo2RB44 Bo4OU36 Bo6CV17 Bo7RB46 Bo8RB46 Bo9RB46 Bo10RB46 Bo15OU37 Bo16OU37 Bo17OU37 Bo19IP10 Bo20IP10 Bo25OU30 Bo21OU36 Bo23OU30 Bo24OU34 Bo26OU36 Bo28OU30 Bo29OU25 Bo27OU30 Bo18OU32 Bo30OU27 Bo31OU25 Bo32OU26 Bo33OU42 Bo34OU42 Bo35OU42 Bo36OU42 Bo37OU42 Bo38OU43 Bo39OU43 Bo40OU39 Bo41OU39 Bo42OU40 Bo43OU39 Bo44RB46 Bo45RB46 Bo46RB46 Bo47RB46 Bo48CV21 Bo49OU35 Bo50AS53 Bo51AS53 Bo52AS53 Bo22OU30 Bo58AS57 Bo57AS57 Bo56AS52 Bo54AS56 Bo53AS56 Bo3RB46
Group[2] n: 46 id: Bt1IP13 Bt2IP13 Bt12IP9 Bt3IP9 Bt4IP9 Bt5IP8 Bt6IP8 Bt7IP13 Bt8CV17 Bt9CV17 Bt11IP13 Bt13IP8 Bt14IP13 Bt15IP13 Bt16IP13 Bt17IP8 Bt18IP8 Bt19OU30 Bt20IP9 Bt22CV17 Bt21IP9 Bt23IP9 Bt24IP9 Bt25CV17 Bt26IP9 Bt27IP8 Bt28IP8 Bt29IP13 Bt31IP9 Bt32IP8 Bt33IP13 Bt30IP14 Bt41IP9 Bt40IP9 Bt42IP9 Bt34IP8 Bt35IP12 Bt36IP9 Bt37IP12 Bt38IP9 Bt39IP13 Bt43OU29 Bt44CV17 Bt45IP13 Bt46IP11 Bt10CV17
Group[3] n: 17 id: Bg2OU37 Bg1OU37 Bg3OU37 Bg4OU37 Bg5OU37 Bg7OU37 Bg8OU37 Bg9OU37 Bg10OU37 Bg11OU37 Bg12OU37 Bg6OU30 Bg13OU30 Bg14OU25 Bg15OU25 Bg16OU25 Bg17OU24
Group[4] n: 11 id: Bs11AS60 Bs10AS60 Bs1CV20 Bs3RB46 Bs2RB46 Bs4RB46 Bs6OU25 Bs5IP8 Bs7RB46 Bs8RB48 Bs9RB51
Group[5] n: 37 id: Bp16OU25 Bp33IP4 Bp3IP12 Bp4IP12 Bp10OU30 Bp11OU30 Bp14OU30 Bp6CV20 Bp5IP11 Bp15OU28 Bp18OU27 Bp17OU27 Bp19OU43 Bp20OU27 Bp23OU29 Bp24OU29 Bp25OU33 Bp26RB43 Bp27RB43 Bp1IP12 Bp35AS54 Bp36AS54 Bp34IP11 Bp32IP13 Bp2IP12 Bp41IP13 Bp42AS61 Bp43AS61 Bp44AS61 Bp45AS61 Bp38AS57 Bp37AS57 Bp13IP11 Bp7IP5 Bp21OU41 Bp22OU41 Bp9IP3
Group[6] n: 8 id: Bp12IP12 Bp8IP12 Bp30CV23 Bp29CV23 Bp31IP12 Bp28CV23 Bp40AS57 Bp39AS57

ABDG N= 275

Initial Partition with prior maximal distance P=2.15e-02
Group[1] n: 114 ;id: Bsp1OU30 Bsp21OU30 Bo5OU30 Bsp2OU30 Bsp3OU34 Bo11OU32 Bo12OU32 Bsp29OU32 Bsp30OU32 Bsp31OU32 Bsp6OU38 Bsp10OU38 Bsp7OU38 Bsp8OU38 Bsp9OU38 Bsp11OU38 Bo13OU38 Bo14OU38 Bo1OU36 Bo2RB44 ma1OU37 Bsp17OU35 Bsp15CV17 Bsp32IP9 Bsp33IP10 Bo4OU36 Bo6CV17 Bo7RB46 Bo8RB46 Bo9RB46 Bo10RB46 ma5RB46 ma8CV20 Bo15OU37 Bo16OU37 Bo17OU37 ma11OU34 Bo19IP10 Bo20IP10 ma14OU34 Bo25OU30 Bo21OU36 Bo23OU30 Bo24OU34 Bsp5OU38 Bsp12OU38 ma6OU32 ma10OU37 Bo26OU36 Bo28OU30 ma17OU25 Bo29OU25 Bo27OU30 Bo18OU32 Bsp36OU25 Bo30OU27 Bo31OU25 Bo32OU26 Bo33OU42 Bo34OU42 Bo35OU42 Bo36OU42 Bsp38OU42 ma19OU42 Bo37OU42 Bsp39OU43 Bsp40OU43 Bo38OU43 Bo39OU43 Bo40OU39 Bo41OU39 Bo42OU40 Bsp4OU32 ma9OU32 Bsp43OU43 Bo43OU39 Bo44RB46 Bo45RB46 Bsp44RB46 Bo46RB46 Bo47RB46 ma21OU25 ma22OU25 ma23RB46 Bo48CV21 Im4CV16 Im7CV15 Bo49OU35 ma28CV22 ma24CV17 ma25CV17 Im5CV16 Bsp49CV16 Im6CV15 ma29CV22 ma30CV15 Bo50AS53 Bo51AS53 Bo52AS53 Bsp50AS52 Bsp51AS52 Bo22OU30 ma34OU30 ma33OU30 Bo58AS57 Bo57AS57 Bsp53AS57 Bsp52AS57 Bo56AS52 Bo55AS52 Bo54AS56 Bo53AS56 Bo3RB46 Bsp13OU38
Group[2] n: 58 ;id: Bt1IP13 Bt2IP13 Bt12IP9 Bt3IP9 Bt4IP9 Bt5IP8 Bt6IP8 Bt7IP13 Bt8CV17 Bt9CV17 Bt11IP13 Bt13IP8 Bt14IP13 Bt15IP13 Bt16IP13 Bsp28IP11 Bt17IP8 Bt18IP8 Bt19OU30 Bt20IP9 Bt22CV17 Bt21IP9 Bt23IP9 Bt24IP9 Bt25CV17 Bt26IP9 Bt27IP8 Bt28IP8 ma12IP13 ma13IP13 Im3OU34 Bt29IP13 Bt31IP9 Bt32IP8 Bt33IP13 Bt30IP14 ma15IP8 Bt41IP9 Bt40IP9 ma18IP9 Bt42IP9 Bsp37OU25 Bsp20OU34 ma20OU29 Bt34IP8 Bt35IP12 Bt36IP9 Bt37IP12 ma16IP11 Bt38IP9 Bt39IP13 Bt43OU29 ma26CV18 Bt44CV17 ma27CV18 Bt45IP13 Bt46IP11 Bt10CV17
Group[3] n: 27 ;id: Bg2OU37 Bg1OU37 Bg3OU37 ma4OU37 Bg4OU37 Im1OU37 Im2OU37 Bg5OU37 Bg7OU37 Bg8OU37 Bg9OU37 Bg10OU37 Bg11OU37 Bg12OU37 Bsp42OU37 Bg6OU30 Bsp26OU30 Bsp27OU30 Bg13OU30 Bg14OU25 Bg15OU25 Bg16OU25 Bsp35OU24 Bsp34OU24 Bg17OU24 ma31AS55 ma32AS55
Group[4] n: 18 ;id: Bsp16OU38 Bsp18OU31 Bsp57AS60 Bs11AS60 Bs10AS60 Bsp56AS60 ma3IP8 Bsp14RB48 Bs1CV20 Bs3RB46 Bs2RB46 Bs4RB46 Bs6OU25 Bs5IP8 Bs7RB46 Bs8RB48 Bsp46RB46 Bs9RB51
Group[5] n: 49 ;id: Bp16OU25 Bsp45RB45 Bsp41OU43 Bp33IP4 Bp3IP12 Bp4IP12 Bsp19OU30 Bsp22OU30 Bp10OU30 Bp11OU30 Bp14OU30 Bsp25IP13 Bp6CV20 Bp5IP11 Bp15OU28 Bp18OU27 Bp17OU27 Bp19OU43 Bp20OU27 Bp23OU29 ma7RB46 Bp24OU29 Bp25OU33 Bp26RB43 Bp27RB43 Bsp47CV19 Bsp48CV19 Bp1IP12 Bp35AS54 Bp36AS54 Bp34IP11 Bp32IP13 Bp2IP12 Bp41IP13 Bp42AS61 Bp43AS61 Bp44AS61 Bp45AS61 Bsp55AS59 Bp38AS57 Bp37AS57 Bsp54AS58 Bsp24IP11 Bp13IP11 Bp7IP5 Bp21OU41 Bp22OU41 ma2IP8 Bp9IP3
Group[6] n: 9 ;id: Bp12IP12 Bsp23IP9 Bp8IP12 Bp30CV23 Bp29CV23 Bp31IP12 Bp28CV23 Bp40AS57 Bp39AS57

ANEXO B IX- Teste do DNA *Barcode*, bPTP

bPTP 98 seq

# Max likelihood partition	
Species 1 (support = 0.236)	Bsp26OU30,Bsp27OU30,Bsp34OU24,Bsp35OU24,Bsp42OU37,Im1OU37,Im2OU37,ma4OU37,ma32AS55,ma31AS55
Species 2 (support = 1.000)	Bsp23IP9
Species 3 (support = 0.002)	Bsp10OU38,Bsp11OU38,Bsp12OU38,Bsp13OU38,Bsp15CV17,Bsp17OU35,Bsp1OU30,Bsp21OU30,Bsp29OU32,Bsp2OU30,Bsp30OU32,Bsp31OU32,Bsp32IP9,Bsp33IP10,Bsp36OU25,Bsp38OU42,Bsp39OU43,Bsp3OU34,Bsp40OU43,Bsp43OU43,Bsp44RB46,Bsp49CV16,Bsp4OU32,Bsp50AS52,Bsp51AS52,Bsp52AS57,Bsp53AS57,Bsp5OU38,Bsp6OU38,Bsp7OU38,Bsp8OU38,Bsp9OU38,Im4CV16,Im5CV16,Im6CV15,Im7CV15,ma10OU37,ma11OU34,ma14OU34,ma17OU25,ma19OU42,ma1OU37,ma21OU25,ma22OU25,ma23RB46,ma24CV17,ma25CV17,ma28CV22,ma29CV22,ma30CV15,ma33OU30,ma34OU30,ma5RB46,ma6OU32,ma8CV20,ma9OU32
Species 4 (support = 0.062)	Bsp20OU34,Bsp28IP11,Bsp37OU25,Im3OU34,ma12IP13,ma13IP13,ma15IP8,ma16IP11,ma18IP9,ma20OU29,ma26CV18,ma27CV18
Species 5 (support = 0.604)	Bsp19OU30,Bsp22OU30,Bsp25IP13,ma7RB46,Bsp41OU43,Bsp45RB45,Bsp47CV19,Bsp48CV19,Bsp54AS58,Bsp55AS59
Species 6 (support = 0.466)	Bsp24IP11,ma2IP8
Species 7 (support = 0.341)	Bsp14RB48,Bsp46RB46,ma3IP8
Species 8 (support = 0.246)	Bsp16OU38,Bsp18OU31,Bsp56AS60,Bsp57AS60

bPTP N= 177 seqs

# Max likelihood partition	
Species 1 (support = 0.788)	Bg10OU37,Bg11OU37,Bg12OU37,Bg1OU37,Bg2OU37,Bg3OU37,Bg4OU37,Bg5OU37,Bg7OU37,Bg8OU37,Bg9OU37,Bg6OU30,Bg17OU24,Bg16OU25,Bg14OU25,Bg13OU30,Bg15OU25
Species 2 (support = 0.137)	Bp12IP12,Bp28CV23,Bp29CV23,Bp30CV23,Bp31IP12,Bp39AS57,Bp40AS57,Bp8IP12
Species 3 (support = 0.024)	Bt10CV17,Bt11IP13,Bt12IP9,Bt13IP8,Bt14IP13,Bt15IP13,Bt16IP13,Bt17IP8,Bt18IP8,Bt19OU30,Bt1IP13,Bt20IP9,Bt21IP9,Bt22CV17,Bt23IP9,Bt24IP9,Bt25CV17,Bt26IP9,Bt27IP8,Bt28IP8,Bt29IP13,Bt2IP13,Bt30IP14,Bt31IP9,Bt32IP8,Bt33IP13,Bt34IP8,Bt35IP12,Bt36IP9,Bt37IP12,Bt38IP9,Bt39IP13,Bt3IP9,Bt40IP9,Bt41IP9,Bt42IP9,Bt43OU29,Bt44CV17,Bt45IP13,Bt46IP11,Bt4IP9,Bt5IP8,Bt6IP8,Bt7IP13,Bt8CV17,Bt9CV17
Species 4 (support = 0.011)	Bo9RB46,Bo10RB46,Bo11OU32,Bo12OU32,Bo13OU38,Bo14OU38,Bo15OU37,Bo16OU37,Bo17OU37,Bo18OU32,Bo19IP10,Bo1OU36,Bo20IP10,Bo21OU36,Bo22OU30,Bo23OU30,Bo24OU34,Bo25OU30,Bo26OU36,Bo27OU30,Bo28OU30,Bo29OU25,Bo2RB44,Bo30OU27,Bo31OU25,Bo32OU26,Bo33OU42,Bo34OU42,Bo35OU42,Bo36OU42,Bo37OU42,Bo38OU43,Bo39OU43,Bo3RB46,Bo40OU39,Bo41OU39,Bo42OU40,Bo43OU39,Bo44RB46,Bo45RB46,Bo46RB46,Bo47RB46,Bo48CV21,Bo49OU35,Bo4OU36,Bo50AS53,Bo51AS53,Bo52AS53,Bo53AS56,Bo54AS56,Bo55AS52,Bo56AS52,Bo57AS57,Bo58AS57,Bo5OU30,Bo6CV17,Bo7RB46,Bo8RB46

Species 5 (support = 0.915)
Bp10OU30,Bp11OU30,Bp14OU30,Bp15OU28,Bp20OU27,Bp23OU29,Bp24OU29,Bp2IP12, Bp32IP13,Bp3IP12,Bp41IP13,Bp6CV20,Bp16OU25,Bp17OU27,Bp18OU27,Bp1IP12,Bp25O U33,Bp35AS54,Bp36AS54,Bp37AS57,Bp38AS57,Bp42AS61,Bp43AS61,Bp44AS61,Bp45A S61,Bp4IP12,Bp33IP4,Bp19OU43,Bp26RB43,Bp27RB43,Bp34IP11,Bp5IP11
Species 6 (support = 0.224) Bp13IP11,Bp21OU41,Bp22OU41,Bp7IP5,Bp9IP3
Species 7 (support = 0.492) Bs10AS60,Bs11AS60
Species 8 (support = 0.124) Bs1CV20,Bs2RB46,Bs3RB46,Bs4RB46,Bs5IP8,Bs6OU25,Bs7RB46,Bs8RB48,Bs9RB51

N= 275

Max likelihood partition
Species 1 (support = 0.518) Bg2OU37,Bg1OU37,Bg3OU37,ma4OU37,Bg4OU37,Im1OU37,Im2OU37,Bg5OU37,Bg7OU37,Bg8 OU37,Bg9OU37,Bg10OU37,Bg11OU37,Bg12OU37,Bsp42OU37,ma32AS55,ma31AS55,Bg17OU24, Bsp34OU24,Bsp35OU24,Bg16OU25,Bg14OU25,Bg13OU30,Bsp27OU30,Bsp26OU30,Bg6OU30,Bg 15OU25
Species 2 (support = 0.132) Bp12IP12,Bsp23IP9,Bp8IP12,Bp30CV23,Bp29CV23,Bp31IP12,Bp28CV23,Bp40AS57,Bp39AS57
Species 3 (support = 0.001) Bsp1OU30,Bsp21OU30,Bo5OU30,Bsp2OU30,Bsp3OU34,Bo11OU32,Bo12OU32,Bsp29OU32,Bsp30 OU32,Bsp31OU32,Bsp6OU38,Bsp10OU38,Bsp7OU38,Bsp8OU38,Bsp9OU38,Bsp11OU38,Bo13OU 38,Bo14OU38,Bo1OU36,Bo2RB44,ma1OU37,Bsp17OU35,Bsp15CV17,Bsp32IP9,Bsp33IP10,Bo4O U36,Bo6CV17,Bo7RB46,Bo8RB46,Bo9RB46,Bo10RB46,ma5RB46,ma8CV20,Bo15OU37,Bo16OU3 7,Bo17OU37,ma11OU34,Bo19IP10,Bo20IP10,ma14OU34,Bo25OU30,Bo21OU36,Bo23OU30,Bo24 OU34,Bsp5OU38,Bsp12OU38,ma6OU32,ma10OU37,Bo26OU36,Bo28OU30,ma17OU25,Bo29OU25 ,Bo27OU30,Bo18OU32,Bsp36OU25,Bo30OU27,Bo31OU25,Bo32OU26,Bo33OU42,Bo34OU42,Bo3 5OU42,Bo36OU42,Bsp38OU42,ma19OU42,Bo37OU42,Bsp39OU43,Bsp40OU43,Bo38OU43,Bo39O U43,Bo40OU39,Bo41OU39,Bo42OU40,Bsp4OU32,ma9OU32,Bsp43OU43,Bo43OU39,Bo44RB46,B o45RB46,Bsp44RB46,Bo46RB46,Bo47RB46,ma21OU25,ma22OU25,ma23RB46,Bo48CV21,Im4CV 16,Im7CV15,Bo49OU35,ma28CV22,ma24CV17,ma25CV17,Im5CV16,Bsp49CV16,Im6CV15,ma29 CV22,ma30CV15,Bo50AS53,Bo51AS53,Bo52AS53,Bsp50AS52,Bsp51AS52,Bo22OU30,ma34OU30 ,ma33OU30,Bo58AS57,Bo57AS57,Bsp53AS57,Bsp52AS57,Bo56AS52,Bo55AS52,Bo54AS56,Bo53 AS56,Bo3RB46,Bsp13OU38
Species 4 (support = 0.016) Bt1IP13,Bt2IP13,Bt12IP9,Bt3IP9,Bt4IP9,Bt5IP8,Bt6IP8,Bt7IP13,Bt8CV17,Bt9CV17,Bt11IP13,Bt13I P8,Bt14IP13,Bt15IP13,Bt16IP13,Bsp28IP11,Bt17IP8,Bt18IP8,Bt19OU30,Bt20IP9,Bt22CV17,Bt21IP 9,Bt23IP9,Bt24IP9,Bt25CV17,Bt26IP9,Bt27IP8,Bt28IP8,ma12IP13,ma13IP13,Im3OU34,Bt29IP13,Bt 31IP9,Bt32IP8,Bt33IP13,Bt30IP14,ma15IP8,Bt41IP9,Bt40IP9,ma18IP9,Bt42IP9,Bsp37OU25,Bsp20O U34,ma20OU29,Bt34IP8,Bt35IP12,Bt36IP9,Bt37IP12,ma16IP11,Bt38IP9,Bt39IP13,Bt43OU29,ma26 CV18,Bt44CV17,ma27CV18,Bt45IP13,Bt46IP11,Bt10CV17
Species 5 (support = 0.716) Bp16OU25,Bsp45RB45,Bsp41OU43,Bp3IP12,Bsp19OU30,Bsp22OU30,Bp10OU30,Bp11OU30,Bp14 OU30,Bsp25IP13,Bp6CV20,Bp15OU28,Bp20OU27,Bp23OU29,ma7RB46,Bp24OU29,Bp32IP13,Bp2 IP12,Bp41IP13,Bp4IP12,Bsp54AS58,Bp37AS57,Bp38AS57,Bsp55AS59,Bp45AS61,Bp44AS61,Bp43 AS61,Bp42AS61,Bp36AS54,Bp35AS54,Bp1IP12,Bsp48CV19,Bsp47CV19,Bp25OU33,Bp17OU27,B p18OU27,Bp33IP4,Bp19OU43,Bp26RB43,Bp27RB43,Bp5IP11,Bp34IP11
Species 6 (support = 0.130) Bsp24IP11,Bp13IP11,Bp7IP5,Bp21OU41,Bp22OU41,ma2IP8,Bp9IP3
Species 7 (support = 0.163) Bsp16OU38,Bsp18OU31,Bsp57AS60,Bs11AS60,Bs10AS60,Bsp56AS60
Species 8 (support = 0.073) ma3IP8,Bsp14RB48,Bs1CV20,Bs3RB46,Bs2RB46,Bs4RB46,Bs6OU25,Bs5IP8,Bs7RB46,Bs8RB48, Bsp46RB46,Bs9RB51

ANEXO B X - Tabela dos grupos de haplótipos das 275 sequências do gene mitocondrial COI e 193 sequências de rRNA16S, calculada em DnaSP.

	H	N	Código rRNA16S	H	N	Código COI
<i>B. glabrata</i>	H1	7	Bg1, 3, 4, 7OU37 Im2OU37Bg ma4OU37Bg Bsp34OU24Bg	H1	15	Bg1-5, 7-12OU37 ma4OU37Bg Im1-2OU37Bg Bsp42OU37Bg Bg17OU24, Bsp34-35OU24Bg
	H2	5	Bsp26-27OU30Bg Bg14, 16OU25 ma31AS55Bg	H2	11	Bg6, 13OU30 Bsp26-27OU30Bg Bg14, 16OU25 ma31-32AS55Bg
	H3	1	Bg15OU25	H3	1	Bg15OU25
<i>B. occidentalis</i>	H1	70	Bo3, 7-10, 46RB46 Bo11-12, 18OU32 Bo13-14OU38 Bo15, 17OU37 Bo19-20IP10 Bo1, 21OU36 Bo2, 59RB44 Bo30OU27 Bo32OU26 Bo34OU42, Bo38-39OU43 Bo42OU40 Bo43OU39 Bo48CV21, Bo52AS53 Bo53AS56 Bo58AS57 Bo5OU30, Bo60AS62 Bo61AS65 Bo62OU25 Bo6CV17 Bsp5-7, 8-11, 13OU38Bo Bsp15CV17Bo Bsp17OU35Bo Bsp1-2, 21OU30Bo Bsp29-31OU32Bo Bsp32IP9Bo Bsp33IP10Bo sp39OU43Bo Bsp3OU34Bo Bsp51AS52Bo Bsp53AS57Bo Im4CV16Bo Im7CV15Bo ma1, 10OU37Bo ma14OU34Bo ma19OU42Bo ma28CV22Bo ma39AS63Bo ma40AS64Bo ma5RB46Bo ma6, 9OU32Bo ma8CV20Bo	H1	114	Bo3, 7-10, 44-47RB46 Bo11-12, 18OU32 Bo13-14OU38 Bo15-17OU37 Bo19-20IP10 Bo1, 4, 21, 26OU36 Bo5, 22-23, 25, 27-28OU30 Bo24OU34 Bo2RB44 Bo29, 31, 62OU25 Bo32OU26 Bo30OU27 Bo33-37OU42 Bo38-39OU43 Bo40-43OU39 Bo48CV21 Bo49OU35 Bo50-52AS53 Bo53-54AS56 Bo5556AS52 Bo57-58AS57 Bo6CV17 Bsp5-10-13OU38Bo Bsp15CV17Bo Bsp17OU35Bo Bsp1-2, 21OU30Bo Bsp4, 29-31OU32Bo Bsp32IP9Bo Bsp33IP10Bo Bsp36OU25Bo Bsp38OU42Bo Bsp3OU34Bo Bsp39-40, 43OU43Bo Bsp44RB46Bo Bsp49CV16Bo Bsp50-51AS52Bo Bsp52-53AS57Bo Im4-5CV16Bo Im6-7CV15Bo ma1, 10OU37Bo ma11, 14OU34Bo ma19OU42Bo ma21-22OU25Bo ma5, 23RB46Bo ma24-25CV17Bo ma28-29CV22Bo ma30CV15Bo ma33-34OU30Bo ma6, 9OU32Bo ma8CV20Bo
	H1	2	Bp5IP11 Bp34IP11	H1	1	Bp5IP11
<i>B. peregrina</i>	H2	9	Bp3IP12 Bp23OU29 Bp15OU28 Bsp25IP13Bp Bp6CV20 Bp20OU27 ma7RB46Bp Bsp19, 22OU30Bp	H2	1	Bp34IP11
	H3	1	Bp19OU43	H3	16	Bp2-3IP12 Bp32, 41IP13 Bp10-11, 14OU30 Bp6CV20 Bp15OU28 Bp20OU27 Bp23-24OU29 Bsp19, 22OU30Bp Bsp25IP13Bp ma7RB46Bp
	H4	12	Bp26RB43 Bp4IP12 Bp33IP4 Bp16OU25 Bsp45RB45Bp Bsp41OU43Bp Bp43AS61 Bsp47CV19Bp Bsp54AS58Bp Bp25OU33 Bsp55AS59Bp Bp58AS62	H4	3	Bp19, 27OU43 Bp26RB43
				H5	1	Bp4IP12
				H6	1	Bp33IP4
	H5	1	Bp35AS54	H7	3	Bp16OU25 Bsp45RB45Bp Bsp41OU43Bp
				H8	16	Bp43AS61 Bsp47-48CV19Bp Bsp54AS58Bp Bp25OU33 Bsp55AS59Bp Bp37-38AS57 Bp17-18OU27 Bp11IP12 Bp42, 44-45AS61 Bp35-36AS54
	H6	5	Bp12IP12 Bp40AS57 Bp29CV23 Bsp23IP9Bp Bp8IP12	H9	9	Bp12IP12 Bp39-40AS57 Bp28-30CV23 Bsp23IP9Bp Bp8IP12 Bp31IP12
	H7	22	Bp51IP11 Bp52IP17 Bp22OU41 Bp53CV46 Bp21OU41 Bp7IP5 Bp48IP3 Bp50IP7 Bp49IP6 Bp46IP1 Bp47IP2 Bp57RB49 Bp54-56RB47 Bsp24IP11Bp ma38RB50Bp ma17RB46Bp ma2IP8Bp ma36-37RB48Bp ma35RB47Bp Bsp56AS60Bs Bsp16OU38Bs Bs11AS60 Bsp18OU31Bs	H10	7	Bsp24IP11Bp Bp13IP11 Bp7IP5 Bp21OU41 Bp22OU41 ma2IP8Bp Bp9IP3
	H1	4	Bsp56AS60Bs Bsp16OU38Bs Bs11AS60 Bsp18OU31Bs	H1	6	Bsp16OU38Bs Bsp18OU31Bs Bsp57AS60Bs Bs11AS60 Bs10AS60 Bsp56AS60Bs
H2	3	ma3IP8Bs Bs6OU25 Bs5IP8	H2	12	Bs1CV20 Bs2-4, 7RB46 Bs6OU25 Bs5IP8 Bs8RB48 Bs9RB51 Bsp46RB46Bs Bsp14RB48Bs ma3IP8Bs	
H3	7	Bs9RB51 Bs8RB48 Bs1CV20 Bs2-4RB46 Bsp14RB48Bs				
<i>B. tenagophila</i>	H1	41	Bsp28IP11Bt Bsp37OU25Bt Bt2, 7, 11, 14-16, 33, 39IP13 Bt5-6, 13, 17, 27-28, 34IP8 Bt19OU30 Bt3-4, 20-21, 23-24, 26, 36, 47IP9 Bt8-10, 22, 25CV17 Bt35, 37IP12 Bt43OU29 Im3OU34Bt ma15IP8Bt ma16IP11Bt ma20OU29Bt ma26CV18Bt	H1	58	Bt1-2, 7, 11, 13-16, 29, 33, 39, 45IP13 Bt3-4, 12, 20-21, 23-24, 26, 31, 36, 38, 40-42IP9 Bt5-6, 17-18, 27-28, 32, 34IP8 Bt8-10, 22, 25, 44CV17 Bt19OU30 Bt30IP14 Bt35, 37IP12 Bt43OU29 Bt46IP11 Bsp20OU34Bt Bsp28IP11Bt Bsp37OU25Bt Im3OU34Bt ma12-13IP13Bt ma15IP8Bt ma16IP11Bt ma18IP9Bt ma20OU29Bt ma26-27CV18Bt
	H2	3	Bt18IP8 Bt30IP14 Bt32IP8			

ANEXO B XI - Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial COI calculados em DnaSP a partir das 275 sequências. * Município da amostra: Ipaussu: 3-14; Chavantes: 15-23; Ourinhos: 24-43; Ribeirão do Sul: 43-51; Assis: 52-61. Bg=*B. glabrata*, Bs=*B. straminea*, Bt=*B. tenagophila*, Bo=*B. occidentalis*, Bp=*B. peregrina*.

COLEÇÃO HÍDRICA*	BO	BT	BG			BS		BP									
	H1	H1	H1	H2	H3	H1	H2	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
3																	1
4													1				
5																	1
8		10					2										1
9	1	15														1	
10	3																
11		3						1	1								2
12		2								2		1			1	3	
13		13								3							
14		1															
15	3																
16	3																
17	4	6															
18		2															
19															2		
20	1						1			1							
21	1																
22	2																
23																3	
24				3													
25	6	1		2	1		1							1			
26	1																
27	1									1					2		
28										1							
29		2								2							
30	11	1		4						5							
31							1										
32	9																
33															1		
34	4	2															
35	2																
36	4																
37	5		15														
38	11						1										
39	3																
40	1																
41																	2
42	7																
43	5										1			1			
43											2						
44	1																
45														1			
46	12						5			1							
48							2										
51							1										
52	4																
53	3																
54															2		
55				2													
56	2																
57	4														2	2	
58															1		
59															1		
60							4										
61															4		
TOTAL	114	58	15	11	1	6	12	1	1	16	3	1	1	3	16	9	7

10 CURRÍCULO LATTES



Raquel Gardini Sanches Palasio

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1097542643606636>
Última atualização do currículo em 10/12/2018

Doutoranda em Epidemiologia na Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP USP). Mestre em Biologia Animal (Biodiversidade) pela Universidade Estadual de Campinas UNICAMP (2013). Possui graduação em Ciência Biológicas pelo Centro Universitário Fundação Santo André (2007). Fez aprimoramento profissional (PAP FUNDAP, 2009/2010) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Superintendência de Controle de Endemias (LBBM SUCEN). Fez iniciação científica, no Museu de Zoologia da USP (Fapesp 2007), no laboratório de Biologia Molecular. Experiência com genética animal. **(Texto informado pelo autor)**



Francisco Chiaravalloti Neto

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9465571695962929>
Última atualização do currículo em 04/12/2018

Possui graduação em Engenharia pela Escola Politécnica da USP (1981), especialização (1985), mestrado (1993) e doutorado (1999) em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP-USP). Obteve, em 2010, o título de Livre Docência pela FSP-USP. É Professor Associado do Departamento de Epidemiologia da FSP-USP. Desenvolve, projetos de pesquisa nas áreas de Epidemiologia de Doenças Transmissíveis, em especial, as de Agentes Transmitidos por Vetores, e de Análise Espacial em Saúde. É cadastrado com orientador nos Programas de Pós-Graduação em Saúde Pública, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia e no Programa de Pós-Graduação em Entomologia em Saúde Pública (Mestrado Profissional), todos na FSP-USP. **(Texto informado pelo autor)**



Roseli Tuan

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8113670697831592>
Última atualização do currículo em 05/12/2018

Bióloga, graduada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (1983). Título de Mestre e Doutor obtidos, respectivamente, em 1988 e 1996, no Departamento de Biologia e Genética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Pesquisador Científico da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, desenvolve linha de pesquisa em Genética Evolutiva através da análise de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares desenvolvidos em caramujos relacionados com a transmissão da esquistossomose mansônica, e díptera de interesse médico. Inferências filogenéticas derivadas desses estudos, são feitas através da aplicação de ferramentas de bioinformática, cujo desenvolvimento se acentuou em anos recentes. Os estudos são desenvolvidos em projetos de pesquisa e a perspectiva é atualizar o conhecimento sobre a distribuição atual e histórica de hospedeiros intermediários e vetores de doenças. A disseminação do conhecimento gerado por estes estudos é feita através de cursos para especialistas interessados em aplicar ferramentas de biologia molecular e de bioinformática no diagnóstico da variabilidade de vetores, hospedeiros intermediários e parasitas de doenças. **(Texto informado pelo autor)**