SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE - SES
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN

TATIANE ENI DA SILVA TAVARES

“ASPECTOS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA DE *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA TENAGOPHILA* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE)”

SÃO PAULO

2021

TATIANE ENI DA SILVA TAVARES

“ASPECTOS MORFOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA DE *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA TENAGOPHILA* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE)”

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência de Controle de Endemias, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários.

Orientadora: Dra. Fernanda Pires Ohlweiler.

SÃO PAULO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Tavares, Tatiane Eni da Silva

Aspectos morfológicos e histológicos do complexo peniano e vagina de Biomphalaria tenagophila tenagophila (molusca: planorbidade) / Tatiane Eni da Silva Tavares. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários .

Orientação: Prof(a). Dr(a). Fernanda Pires Ohlweiler.

1. Anatomia. 2. Histologia. 3. Biomphalaria/anatomia & histologia. 4. Feminino. 5. Masculino.

SES/CCD/SUCEN - 107/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

A todos que me ajudaram ao longo desta caminhada, especialmente a minha mãe Quitéria, meu esposo Thomas e minha orientadora Fernanda, que dedicaram seu tempo para me auxiliar e me incentivar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer meus familiares e amigos por me apoiarem durante todo o ano. Um ano atípico, onde passamos por muitas dificuldades e, em meio a todo esse turbilhão ainda foi possível manter as esperanças e continuar.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Quitéria, que passou por um ano muito conturbado, mas sempre esteve ao meu lado me ajudando no que fosse preciso e, ao meu esposo Thomas por me acompanhar e me apoiar durante todo o ano.

Aos meus amigos pela companhia e apoio. À minha família pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por tudo.

Agradeço a minha amiga Thays por toda ajuda e conselhos durante esses anos em que trabalhamos juntas no Laboratório de Malacologia da Superintendência de Controle de Endemias (Sucen).

Sou grata aos meus amigos do curso de especialização pelo auxílio, troca de conhecimento e pelos momentos de descontração, que tornaram meus dias melhores. “Somos unidos como carrapatos!"

Sou grata a Lúcia, Washington e Edson pelo aprendizado e pela coleta dos materiais utilizados no trabalho.

Agradeço a todos os pesquisadores da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pelo conhecimento passado ao longo do curso, em especial a minha orientadora Fernanda pelos anos de aprendizado e por sua paciência e compreensão nos momentos difíceis. Obrigada pela oportunidade de ser sua aluna.

À Sucen pelo curso de especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários e por possibilitar a realização do meu trabalho.

Por fim, sou grata a todos que me ajudaram, de forma direta ou indireta ao longo do ano para realização desse trabalho.

RESUMO: O gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910), da família Planorbidae, tem importância médica no Brasil, pois inclui três espécies suscetíveis ao trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila tenagophila* (d'Orbigny, 1935) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). A correta determinação destas espécies depende da observação de caracteres taxonômicos confiáveis. Entretanto, as semelhanças existentes entre determinados táxons levaram alguns especialistas a formarem complexos de espécies. No Brasil, existem dois complexos de espécies no gênero *Biomphalaria*; o complexo *Biomphalaria tenagophila* proposto por Spatz e colaboradores (1999) e o complexo *Biomphalaria straminea* proposto por Paraense (1988), cujos táxons, pertencentes a cada um deles, foram assim agrupados devido às semelhanças morfológicas e genéticas. Dos três táxons que integram o complexo *Biomphalaria tenagophila*, *B. t. tenagophila* é a única espécie suscetível ao *S. mansoni*, tendo grande importância epidemiológica nas regiões sul e sudeste do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). As semelhanças morfológicas entre os três táxons do complexo *Biomphalaria tenagophila* podem levar a erros de identificação específica, dificultando o reconhecimento de áreas vulneráveis para transmissão da esquistossomose nas regiões sul e sudeste do país. As estruturas morfológicas de maior valor taxonômico em *Biomphalaria* estão relacionadas ao sistema reprodutor. No presente estudo, propomos estudar os aspectos morfológicos e histológicos do complexo peniano e região da vagina de *B. t. tenagophila* para fornecer novos subsídios que auxiliem na sistemática de Planorbidae. Foram coletados moluscos *B. t. tenagophila* em cinco municípios de São Paulo, os quais foram comparados com o material de coleção do Laboratório de Malacologia da Divisão de Programas Especiais (DPE) da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Foi realizado estudo morfológico e histológico das estruturas que compõe o complexo peniano e vagina de *B. t. tenagophila*. Para o estudo morfológico, foram descritas as estruturas que compõe o complexo peniano e a região da vagina de 23 espécimes. No estudo histológico foram observados, por meio de cortes histológicos seriados de 7 a 10 µm, os aspectos do tecido epitelial de revestimento e do tecido muscular de 10 espécimes. Nossos resultados mostram que o complexo peniano e a região da vagina de *B. t. tenagophila* apresentam caracteres morfológicos diagnósticos para a determinação específica do táxon. Os aspectos histológicos do complexo peniano e região da vagina de *B. t. tenagophila* são descritos aqui pela primeira vez. A carência de informações sobre os aspectos histológicos do complexo peniano e região da vagina de

outras *Biomphalaria* dificulta o estudo comparativo. Neste caso, sugerimos que estudos dos aspectos histológicos do complexo peniano e região da vagina sejam feitos em outras espécies do gênero *Biomphalaria* de forma a confirmar o valor taxonômico destas duas regiões.

Palavras chaves: Anatomia, Histologia, *Biomphalaria*, Feminino e Masculino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8

2. OBJETIVOS 12

3. MATERIAIS E MÉTODOS 13

3.1. MATERIAL DE ESTUDO 13

3.2. PROCEDIMENTO DE COLETA 13

3.3. TRIAGEM DO MATERIAL 14

3.4. EXAME PARASITOLÓGICO 14

3.5. PROCEDIMENTO PARA ANESTESIA DOS CARAMUJOS 15

3.6. ESTUDO MORFOLÓGICO DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA 15

3.7. ESTUDO HISTOLÓGICO DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA 16

4. RESULTADOS 19

4.1. MORFOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO 19

4.1.1. Prepúcio 19

4.1.2. Bainha do Pênis 19

4.1.3. Pênis e Ducto Ejaculatório 20

4.2. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO 21

4.2.1. Prepúcio 21

4.2.2. Bainha do pênis 22

4.2.3. Pênis e Ducto Ejaculatório 23

4.3. MORFOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL 24

4.4. HISTOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL 25

5. DISCUSSÃO 27

5.1. MORFOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA 27

5.1.1. Complexo Peniano 27

5.1.2. Vagina e Bolsa Vaginal 28

5.2. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA 29

5.3. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO 30

5.3.1. Prepúcio.....30
5.3.2. Bainha do Pênis.....31
5.3.3. Pênis e Ducto Ejaculatório.....32
5.4. HISTOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL.....33
6. CONCLUSÃO.....34
REFERÊNCIAS.....35

1. INTRODUÇÃO

A classe Gastropoda abrange em torno de 75% das espécies do filo Mollusca, incluindo aquelas com importância na transmissão de helmintoses, como a esquistossomose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As esquistossomoses, denominadas também como esquistossomíases ou bilharzioses são parasitoses transmitidas ao homem por trematódeos do gênero *Schistosoma* (Weiland, 1858), em especial pelos agentes etiológicos *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) e *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) (REY, 2008).

As esquistossomoses são bastante difundidas nas Américas, Ásia e África, acometendo cerca de 240 milhões de pessoas em 78 países do mundo, onde mais de 700 milhões de indivíduos vivem em áreas endêmicas (KATZ e ALMEIDA, 2003; WHO, 2020). São doenças graves, consideradas um problema de saúde pública não somente no Brasil, mas no mundo (SOUZA *et al.*, 2011). São doenças negligenciadas, associadas a populações de baixa renda, onde os investimentos financeiros em pesquisa e produção de medicamentos são escassos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2021).

No Brasil, a esquistossomose é resultante da infecção humana pelo trematódeo *S. mansoni* (SOUZA *et al*., 2007). Existem 19 Unidades Federadas com transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil (Ceará, Piauí e Maranhão, no Nordeste; Pará, no Norte; Goiás e Distrito Federal, no Centro-Oeste; Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro, no Sudeste; Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no Sul), e estima-se que 1,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo trematódeo. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014, 2019).

O gênero *Biomphalaria*, no país, inclui três espécies suscetíveis ao *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria tenagophila tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Outras três espécies; *Biomphalaria peregrina* (d'Orbigny, 1835), *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966 e *Biomphalaria cousini* Paraense, 1966, são consideradas hospedeiras em potencial deste trematódeo, por mostrarem-se suscetíveis ao parasita em condições experimentais. Os demais táxons pertencentes ao gênero, no Brasil, são refratários ao parasita tanto em condições naturais como laboratoriais; *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1975, *Biomphalaria*

occidentalis Paraense, 1981, *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883) e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Biomphalaria glabrata é notificada em 16 estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe), além do Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Sua distribuição geográfica está, quase sempre, associada à transmissão da esquistossomose (PARAENSE 1972; CARVALHO *et al*. 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Biomphalaria tenagophila tenagophila distribui-se desde o sul do estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo). A espécie possui importância epidemiológica no Sul e Sudeste do País, sendo responsável pela maioria dos casos autóctones de esquistossomose em São Paulo (PARAENSE, 1975; CARVALHO *et al*., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008, 2014).

Biomphalaria straminea está presente em quase todas as bacias hidrográficas brasileiras e, devido a sua ampla distribuição geográfica, é considerada a espécie mais bem adaptada às diferentes condições ambientais encontradas no país (CARVALHO *et al*., 2018). Sua maior concentração é o nordeste brasileiro, onde ela é responsável pela transmissão da endemia, principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (LUZ *et al*., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A correta determinação e o conhecimento da distribuição geográfica das três *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias do *S. mansoni* são importantes na orientação dos agentes de saúde e na tomada de medidas de vigilância e controle ambiental em áreas vulneráveis à transmissão da esquistossomose, possibilitando assim a interrupção do ciclo da doença (CARVALHO *et al*., 2018).

A identificação das *Biomphalaria* é feita, principalmente, com base na morfologia, sendo os caracteres do sistema reprodutor os mais utilizados nas diagnoses das espécies (PARAENSE, 1972). No entanto, a semelhança existente entre determinados táxons levou alguns especialistas a formarem complexos de espécies. Exemplo disso é o complexo *Biomphalaria tenagophila* proposto por Spatz e colaboradores, em 1999, que inclui *B. t. tenagophia, B. t. guaibensis* e *B. occidentalis* e o complexo *Biomphalaria straminea* que inclui *B. straminea, B. kuhniana* e *B. intermedia*, proposto por Paraense, em 1988.

Os táxons do complexo *Biomphalaria tenagophila* foram assim agrupados devido às semelhanças da região posterior da vagina e do complexo peniano. *Biomphalaria t. tenagophila* difere morfologicamente de *B. t. guaibensis* por apresentar um prepúcio mais curto e robusto, na subespécie o prepúcio é mais longo e esguio, porém ambas possuem bolsa vaginal. *Biomphalaria occidentalis* difere de *B. t. tenagophila e B. t. guaibensis* pela ausência de bolsa vaginal (PARAENSE, 1981, 1984; PALASIO *et al.,* 2017; OHLWEILER *et al*., 2020). Estas diferenças se mostram bastantes sutis, em espécimes jovens, o que dificulta a correta determinação dos táxons.

O complexo peniano e a vagina são as duas regiões do sistema reprodutor mais importante na identificação das *Biomphalaria*, pois contêm caracteres de grande valor sistemático (ABDEL-MALEK, 1952; BAKER, 1945). No entanto, ainda, existem lacunas de conhecimento em torno da microanatomia dos órgãos reprodutivos desses moluscos planorbídeos.

Paraense (1988) realizou cortes microanatômicos da porção média do pênis de *B. kuhniana*, *B. straminea* e *B. intermedia* demonstrando que estas espécies diferem quanto ao número de camadas musculares do pênis.

Detalhes histológicos da musculatura de órgãos reprodutivos de gêneros de Planorbidae, que não *Biomphalaria*, como por exemplo, *Anisus leucostoma* (Rossmassler, 1835), *Anisus vortex* (Linnaeus, 1758), *Bathyomphalus contortus* (Linnaeus, 1758), *Choanomphalus angulatus* (Dybowski & Grochmalicki, 1925) *Choanomphalus eurystomus* Lindholm, 1909, *Choanomphalus riparius* (Westerlund, 1865), *Gyraulus albus* (Muller, 1774), *Gyraulus crista* (Linnaeus, 1758), *Helisoma trivolvis* (Say, 1817), *Planorbis planorbis* (Linnaeus, 1758*), Planorbella duryi* (Wetherby, 1879*)* e *Segmentina oelandica* (Westerlund, 1885) foram descritas por Abdel-Malek (1952, 1954a), Soldatenko e Petrov (2009, 2012, 2019) e Soldatenko e Shatrov (2013), inclusive com o objetivo de verificar se o arranjo muscular pode estar relacionado com o mecanismo de cópula e a função dos próprios órgãos. De acordo com os autores, o arranjo muscular do complexo peniano dessas espécies de planorbídeos não mostra relação com o comportamento de acasalamento.

Soldatenko e Petrov (2012) afirmam que o arranjo muscular dos órgãos copulatórios, analisados no microscópio confocal, possui importância taxonômica não apenas para os caramujos pulmonados, mas para os invertebrados.

A análise comparativa da musculatura da bainha do pênis e do pênis tem se mostrado uma ferramenta promissora para resolver impasses da filogenia de Hygrophila; superordem que inclui a família Planorbidae (SOLDATENKO e PETROV, 2019).

A taxonomia clássica da família Planorbidae refere-se às descrições morfológicas da concha e partes moles, sendo poucos os autores que dedicaram seus estudos aos aspectos microanatômicos de *Biomphalaria*.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo estudar os aspectos morfológicos e histológicos do complexo peniano e da vagina de *B. t. tenagophila*, ressaltando os caracteres de valor sistemático para a espécie, que integra o Complexo *Biomphalaria tenagophila*. E, assim, fornecer subsídios para a sistemática de Planorbidae.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDO: Foram coletados moluscos *B. t. tenagophila* em cinco municípios do Estado de São Paulo-SP. A escolha dos locais de coleta foi feita a partir dos registros conhecidos da espécie no banco de dados da Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), em coleções hídricas que apresentam condições favoráveis para a manutenção dos moluscos como presença de vegetação aquática e águas de curso lento (OHLWEILER e ROSSIGNOLI, 2016). Os caramujos coletados foram comparados com material da coleção malacológica da Divisão de Programas Especiais (DPE) da Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN), procedentes de Peruíbe no Estado de São Paulo e de Arambaré no Estado do Rio Grande do Sul **(Tabela I).**

Tabela I. *Biomphalaria tenagophila tenagophila* utilizadas no estudo morfológico e histológico do complexo peniano e da vagina, procedentes dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.

Estado	Município	Lote DPE	EC	Morfologia	Histologia	Latitude (S)	Longitude (W)
São Paulo	Barueri	3002	05	05	02	23°28'49.5"	46°52'17.2"
	Biritiba Mirim	3089	23	02	01	23°35’09.0’’	46°02'08.1"
	Carapicuíba	3180	20	02	02	23º30'50.6"	46º50'23.0"
	Itaquaquecetuba	3177	12	05	02	23º29'34.6"	46º17'51.0"
	Guarulhos	3167	09	05	01	23º24'50.0"	46º28'33.4"
	Peruíbe*	3145	06	02	02	24°18'13.5"	47°01'05.9"
Rio Grande do Sul	Arambaré*	9011	04	02	0	31°03'12.7"	51°30'22.6"
Total de Espécimes			79	23	10		

DPE: Divisão de Programas Especiais, EC: Espécimes coletados, *material da coleção malacológica da DPE-SUCEN.

3.2. PROCEDIMENTO DE COLETA: As coletas foram realizadas com o auxílio de pinça e concha metálica perfurada acoplada a um cabo de madeira. Para a captura dos moluscos foi necessário bater o coletor sobre o substrato, vegetação e água com movimentos verticais, de acordo com a técnica utilizada no Manual Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) **(Figura 1).** O GPS foi utilizado para a obtenção das coordenadas geográficas dos pontos de coletas.

Figura 1: Espécimes de *Biomphalaria tenagophila tenagophila* obtidos em coleta de campo.

3.3. TRIAGEM DO MATERIAL: Os moluscos coletados foram armazenados em potes plásticos com tampas de rosca contendo vegetação do local, etiquetados com os dados de campo e transportados para o Laboratório de Malacologia da Divisão de Programas Especiais da SUCEN. No laboratório, os moluscos foram colocados em aquários devidamente etiquetados, contendo água filtrada e alface seca, onde permaneceram por 24 horas.

3.4. EXAME PARASITOLÓGICO: Passado 24 horas da coleta, os caramujos tiveram suas conchas limpas e foram colocados, individualmente, em poços de placa de cultura de célula, contendo cerca de 3 ml de água declorada e filtrada, e expostos à luz artificial (lâmpada de 60 w), por 4 horas, para a eliminação de larvas de trematódeos. Após a exposição, a água de cada poço foi examinada no microscópio estereoscópico para a verificação da presença ou não de larvas de trematódeos. O exame parasitológico foi realizado como forma de triar os animais sadios, ou seja, sem infecção parasitária, os quais foram anestesiados e, posteriormente, utilizados no estudo morfológico e histológico do complexo peniano e vagina.

3.5. PROCEDIMENTO PARA ANESTESIA DOS CARAMUJOS: Após o exame parasitológico, os caramujos sadios foram colocados em Becker de vidro contendo água filtrada e uma camada de cristais de mentol cobrindo a superfície, e levados para a geladeira a 4ºC durante 48 horas, até o total relaxamento.

3.6. ESTUDO MORFOLÓGICO DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA: Os caramujos, previamente anestesiados, foram parcialmente imersos em água a 70ºC, com a abertura da concha voltada para cima, durante 15 segundos. Em seguida, foram imersos na mesma água por mais 25 segundos e, posteriormente, em água com temperatura ambiente para o resfriamento, de forma a evitar o cozimento dos tecidos. Os corpos dos moluscos foram separados de suas respectivas conchas, com auxílio de uma pinça, puxando-os delicadamente pelo pé, no sentido das voltas da concha, até o seu desprendimento. As conchas limpas foram armazenadas a seco para sua melhor conservação. As partes moles foram colocadas em fixador Raillet-Henry por 48 horas, para melhor fixação do animal. Após as 48 horas de fixação, os corpos dos caramujos foram colocados em placas de Petri contendo parafina preta e álcool 70%, com a região cefalopodal voltada para a esquerda do observador, sendo possível a observação das aberturas genitais. Foi realizado um corte longitudinal no lado esquerdo do manto, rebatendo-o para cima, expondo-se os órgãos excretores, que estão situados na face ventral do manto. Posteriormente, foi feita uma incisão longitudinal da região dorsal da cabeça até o início do tegumento, o qual foi retirado cuidadosamente para a exposição do sistema reprodutor. A identificação dos caramujos foi feita com base nos caracteres morfológicos da concha, manto, órgãos excretores e sistema reprodutor, seguindo os critérios de DESLANDES (1951), PARAENSE e DESLANDES (1955a, 1955b, 1959) e PARAENSE (1975, 1981). Após a identificação do caramujo, o sistema reprodutor **(Figura 2)** foi mantido no fixador Raillet-Henry e direcionado para os estudos morfológicos e, posteriormente, para os estudos histológicos. O material testemunho, como as conchas e as partes moles que não utilizadas no estudo histológico, receberam um número de lote e foram incluídos na coleção do Laboratório de Malacologia da Divisão de Programas Especiais da SUCEN **(Tabela I)**. Para o estudo morfológico foram descritas as estruturas que compõem o complexo peniano e a vagina de 23 caramujos **(Tabela I)** com diâmetro de concha superior a 10 mm, na tentativa de atenuar o erro das medidas em exemplares jovens. As medidas foram obtidas com o auxílio de paquímetro DEO MEO e expressas em milímetros. As estruturas do complexo peniano e

vagina foram observadas e fotografadas sob o microscópio estereoscópico Leica MZ 9.5 com Câmera Digital Leica Modelo DFC290-série 243302807.

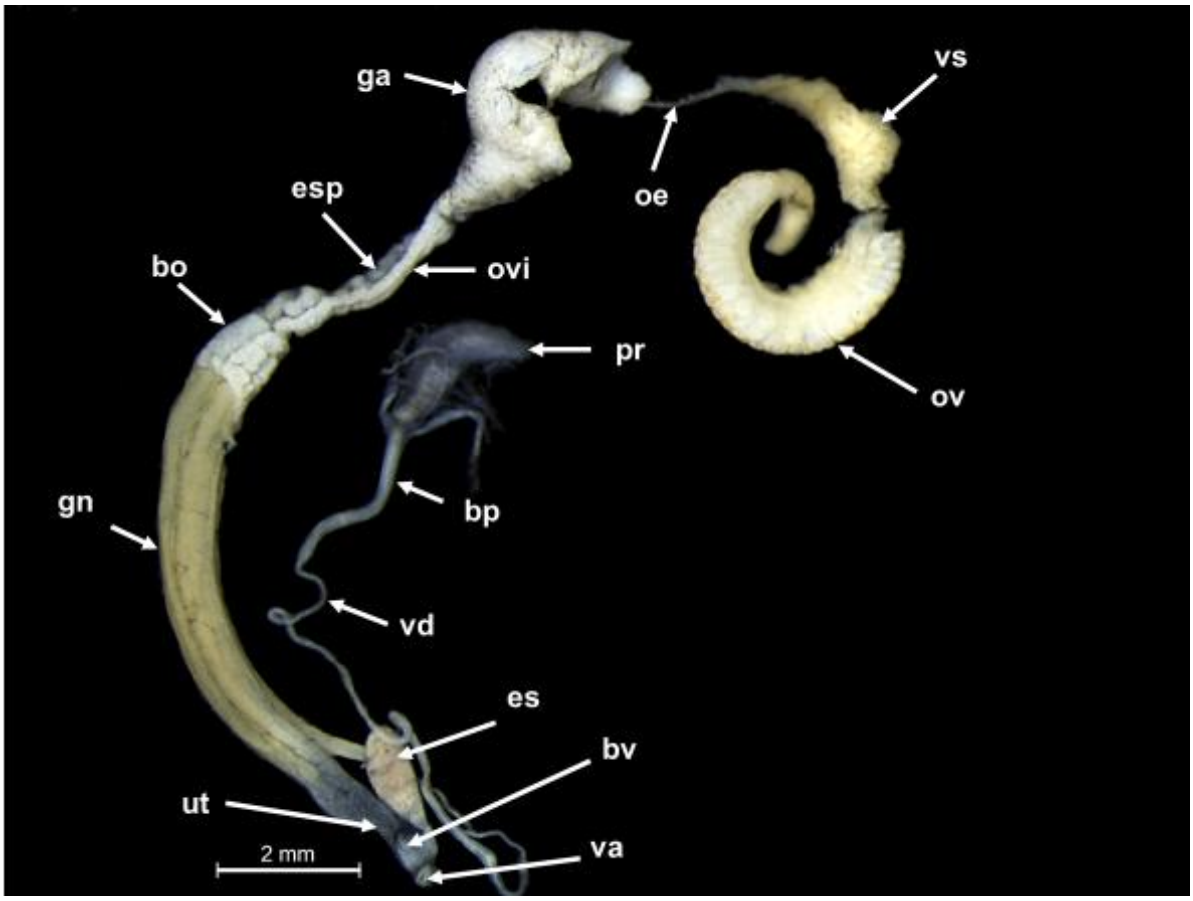

Figura 2: *Biomphalaria tenagophila tenagophila*. Vista geral do sistema reprodutor. Abreviações – bo: bolsa do oviduto; bp: bainha do pênis; es: espermateca; esp: espermioduto; ga: glândula do albumen; gn: glândula nidamental; oe: ovispermiduto; ov: ovoteste; ovi: oviduto; pr: prepúcio; ut: útero; va: vagina anterior; vd: vaso deferente; vs: vesícula seminal.

3.7. ESTUDO HISTOLÓGICO DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA: No estudo histológico são observados aspectos do tecido epitelial de revestimento e do tecido muscular do complexo peniano e da vagina de 10 espécimes de *B. t. tenagophila*. Para isso, foi necessário seguir as seguintes etapas:

I. Lavagem do sistema reprodutor em água corrente para a retirada do excesso do fixador Raillet-Henry;

II. Desidratação nos alcoóis 70%, 80%, 90% e 100% por 15 minutos em cada um, sendo que no último álcool o material permaneceu por mais 15 minutos;

III. Diafanização do material em dois banhos de xilol (1 hora em cada um);

IV. Preparação da parafina para os banhos e inclusão do material em blocos: colocou-se 200 g de parafina e 8 g de cera de abelha em um Becker, na estufa a uma temperatura de 60ºC, para que a fusão de ambas as substâncias. A mistura foi batida até sua completa homogeneização, filtrada e mantida na estufa a 60ºC em três diferentes cubas, duas para os banhos de parafina (banho I e II) e a outra para a formação dos blocos que conterão o material de estudo;

V. Impregnação do material em parafina líquida (dois banhos de parafina de 1 hora cada) na estufa à 60ºC;

VI. Inclusão do material em blocos de parafina: Para a inclusão do material em blocos de parafina foi necessário colocar parafina liquida e filtrada dentro de forma de alumínio (2 cm de comprimento x 2 cm de altura) e, em seguida, o material. Com o auxílio de uma pinça pré-aquecida retirou-se as possíveis bolhas que, por ventura, se formaram na parafina. As formas contendo o material de estudo foram deixadas em temperatura ambiente para o resfriamento e endurecimento da parafina por no mínimo 24 horas;

VII. Os blocos foram retirados das formas e fixados em cubos de madeira para então serem feitos os cortes no micrótomo rotativo semi-automático YD-335;

VIII. Foram feitos cortes histológicos seriados de 7 a 10 µm de espessura, longitudinais e transversais (**Figura 3**), os quais foram colocados, juntamente, com duas gotas de água destilada, sobre lâminas contendo albumina previamente preparada. Para a distensão dos cortes, as lâminas foram colocadas sobre um extensor elétrico aquecido até 45ºC;

IX. As lâminas contendo os cortes foram secas em estufa DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à 40ºC por 12 horas;

X. Coloração das lâminas contendo os cortes histológicos: As lâminas contendo os cortes passaram por dois banhos de xilois (xilol I e II – 1h30 hora cada) para a retirada da parafina, por uma série alcoólica (100%, 90%, 80% e 70% - 10 minutos em cada) para a hidratação e na água destilada (5 minutos) para a lavagem. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavados em água corrente por 3 minutos, diferenciados rapidamente no ácido acético glacial 0,2% e lavados em água corrente por 2 minutos. Depois, foram corados com Eosina Y aquosa 1% por 3 minutos, passados rapidamente em água corrente para não descorar, desidratados em uma série alcoólica (alcoóis 70% e 80% por 10 minutos cada e alcoóis 90% e 100% por 20 minutos em cada) e diafanizados nos xilois I, II e III por no mínimo 2 minutos em cada;

XI. Colocou-se Entellan sobre as lâminas contendo os cortes e, em seguida, cobriram-se as mesmas com lamínula;

XII. As lâminas montadas foram colocadas em estufa DBO à 40ºC por 12 horas, para a secagem. Os cortes foram analisados e fotografados no microscópio óptico Leica DFC 290.

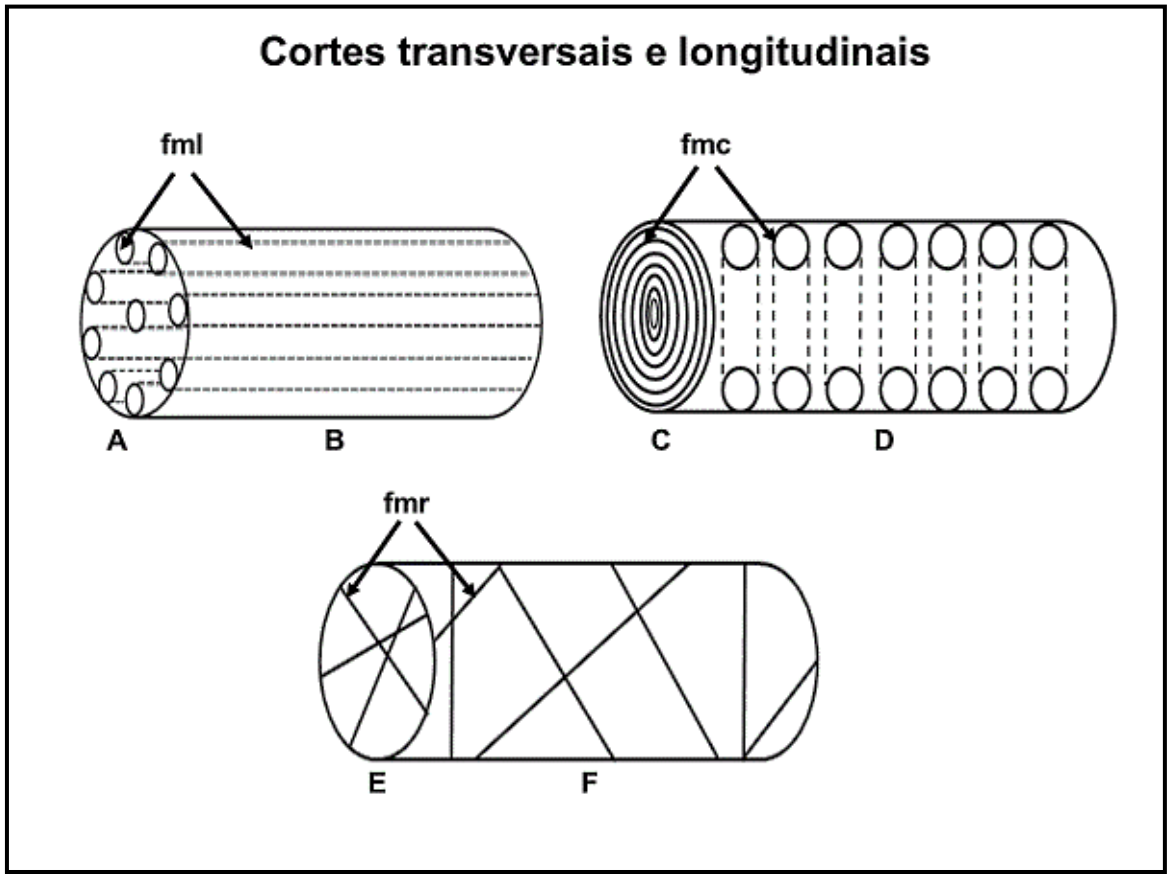

Figura 3: Esquema de cortes Histológicos. A, C e E: Cortes transversais de fibras musculares. B, D e F: Cortes longitudinais de fibras musculares. Abreviações – fmc: fibra muscular circular. fml: fibra muscular longitudinal. fmr: fibra muscular radial.

4. RESULTADOS

4.1. MORFOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO

O complexo peniano de *Biomphalaria* (Preston, 1910) é composto pelo prepúcio, bainha do pênis, pênis e ducto ejaculatório **(Figura 4, A-D).** Na junção da bainha do pênis com o prepúcio são encontrados feixes de fibras musculares denominados de músculos protratores e os músculos retratores. Na superfície externa do prepúcio observam-se músculos secundários, que são constituídos por inúmeras e delgadas fibras musculares.

4.1.1. Prepúcio

O prepúcio é um tubo cilíndrico com a extremidade distal larga **(Figura 4 A)** e aderida à abertura genital masculina, a qual está localizada abaixo do tentáculo esquerdo do caramujo.

Na região apical do prepúcio, ou seja, na sua junção com a bainha do pênis, existe uma região mais robusta denominada diafragma **(Figura 4, A e C)**. O diafragma apresenta parede pregueada internamente e abre-se no lúmen do prepúcio por meio de um orifício bastante evidente **(Figura 4 C)**. O pênis passa da bainha para o lúmen do prepúcio através deste orifício.

Internamente, na parede do prepúcio, são observadas ondulações transversais e duas pilastras longitudinais **(Figura 4, B e C)**. As ondulações presentes na parede do prepúcio tornam-se mais proeminentes na medida em que se aproxima da região do diafragma.

4.1.2. Bainha do Pênis

A bainha do pênis é um tubo cilíndrico de espessura inferior à do prepúcio, com uma estrutura longa e estreita, em seu interior, denominada pênis. Ela está situada entre a região distal do vaso deferente e o diafragma no prepúcio **(Figura 4, A e B)**.

4.1.3. Pênis e Ducto Ejaculatório

O pênis é a porção distal modificada do vaso deferente. É uma estrutura alongada, estreita e com comprimento semelhante ao da bainha do pênis. Em seu interior forma o ducto ejaculatório, que pode ser visto por transparência. O pênis se fixa à bainha do pênis em sua extremidade apical. A extremidade distal do pênis é pontiaguda e não possui estilete **(Figura 4 D)**.

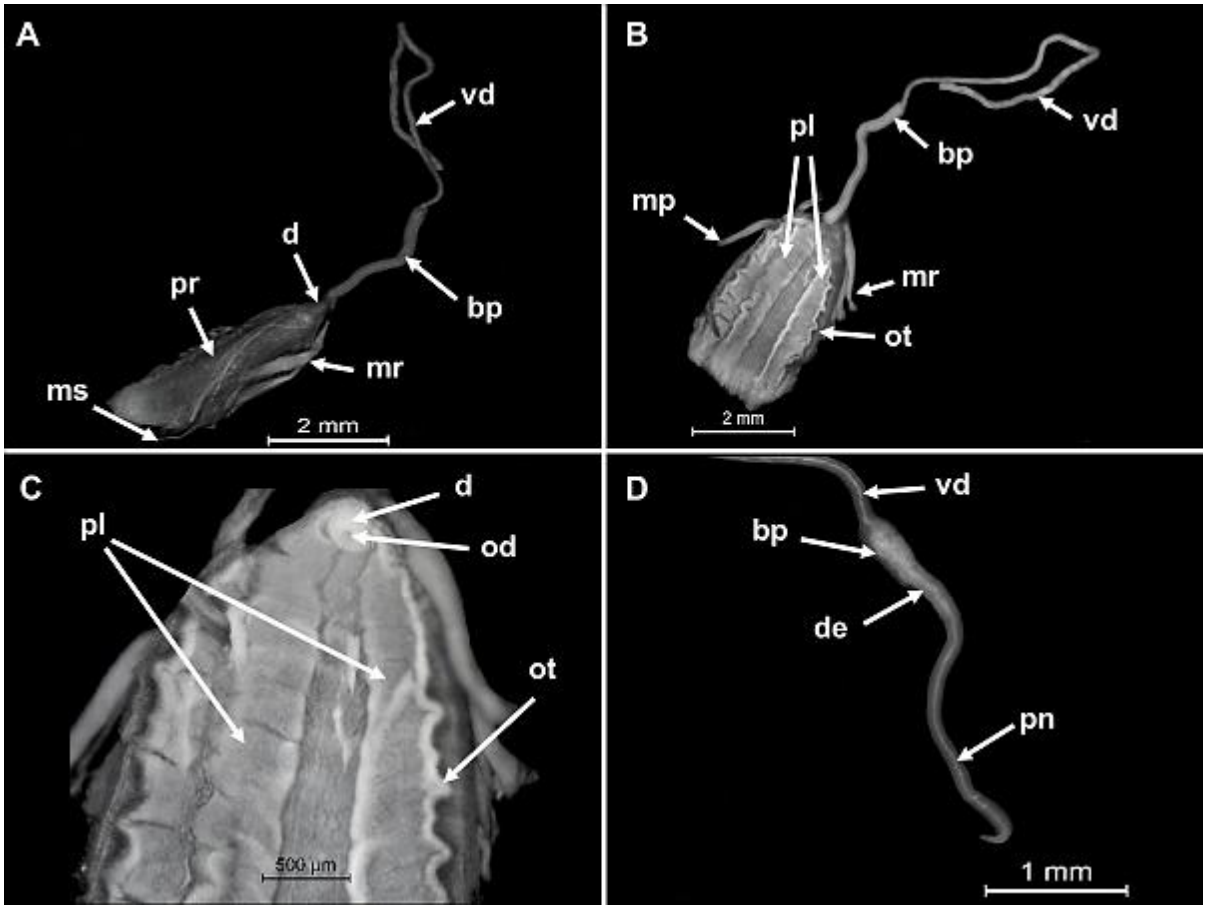

Figura 4: Complexo peniano de *Biomphalaria tenagophila tenagophila.* A: Vista geral do complexo peniano. B: Complexo peniano mostrando o prepúcio internamente. C: Vista interna do prepúcio com destaque das pilastras e diafragma. D: Bainha do pênis seccionada expondo o pênis e o ducto ejaculatório por transparência. Abreviações – bp: bainha do pênis; d: diafragma; de: ducto ejaculatório; od: orifício do diafragma; ot: ondulações transversais; mp: músculo protratores; mr: músculos retratores; ms: músculos secundários; pl: pilastras; pn: pênis; pr: prepúcio; vd: vaso deferente.

4.2. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO

4.2.1. Prepúcio

O prepúcio apresenta uma camada de tecido epitelial de revestimento colunar com células ciliadas e núcleos elípticos e basais, que descansa sobre uma membrana basal. À medida que se aproxima da região do diafragma as células epiteliais tornam-se mais baixas, dando impressão de um epitélio de revestimento cúbico ciliado **(Figura 5)**.

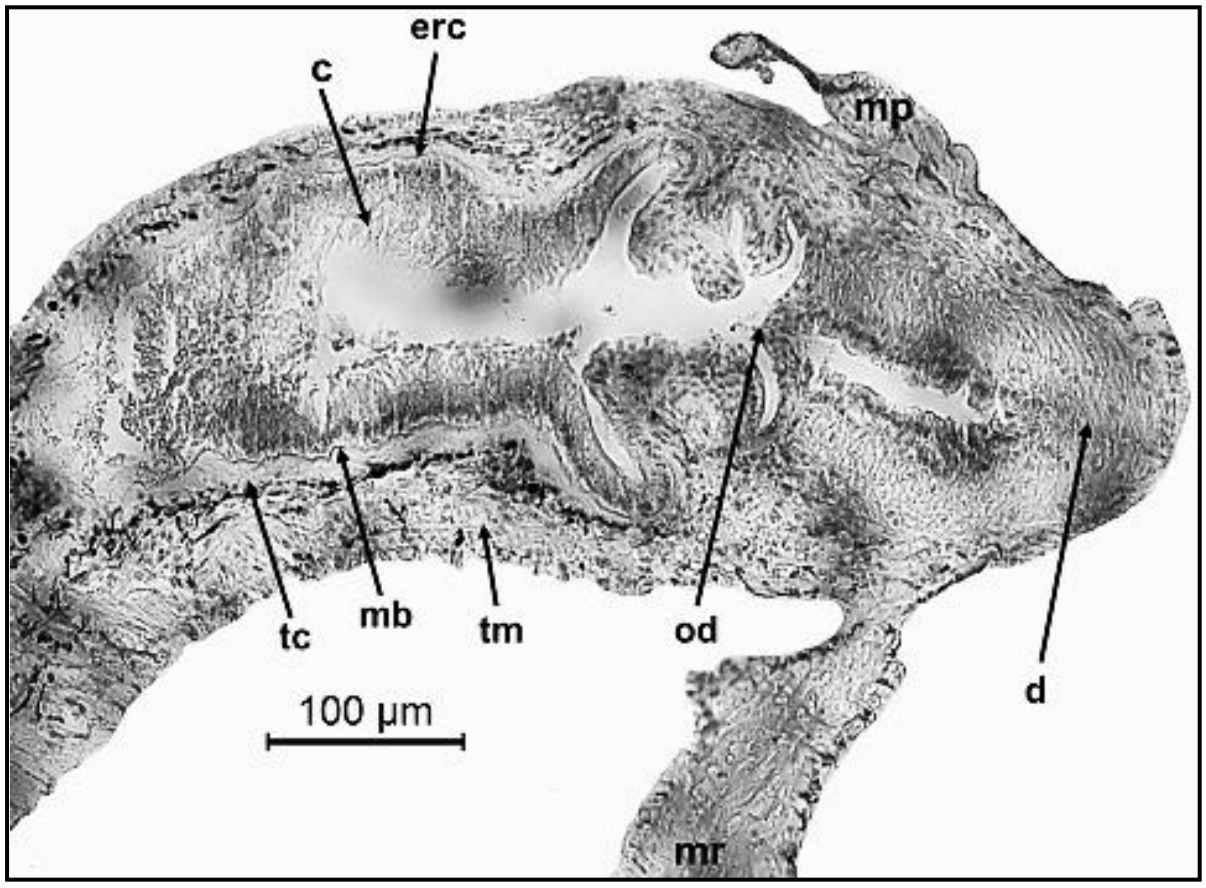

Figura 5: *Biomphalaria tenagophila tenagophila*. Corte longitudinal do prepúcio. Abreviações – c: cílios; d: diafragma; od: orifício do diafragma; erc: epitélio de revestimento colunar; mb: membrana basal; mp: músculo protratores; mr: músculos retratores; tc: tecido conjuntivo; tm: tecido muscular.

O tecido muscular que predomina na arquitetura do prepúcio é constituído por três camadas de fibras musculares – 1. Camada interna de fibras musculares circulares junto ao

tecido conjuntivo. 2. Camada intermediária espessa de fibras musculares frouxas circulares, radiais e longitudinais dispostas de forma desordenada. 3. Camada externa delgada formada por fibras musculares circulares. Externamente, no tecido muscular são observados pigmentos escuros, os quais dão aspecto escuro ao prepúcio **(Figura 6)**.

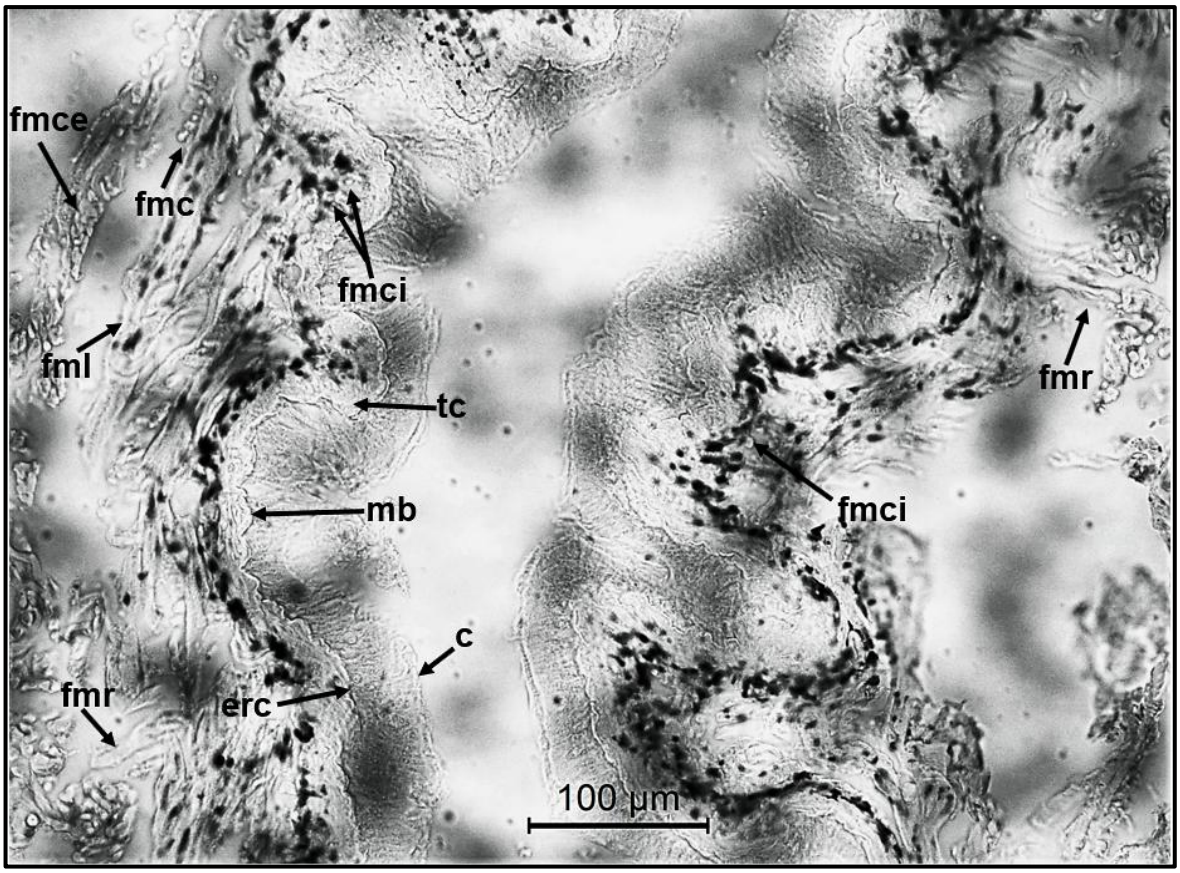

Figura 6: *Biomphalaria tenagophila tenagophila*. Corte longitudinal do prepúcio, destacando as fibras musculares e tecido epitelial. Abreviações – c: cílios; erc: epitélio de revestimento colunar; fmc: fibras musculares circulares; fmce: fibra muscular circular externa; fmci: fibra muscular circular interna; fml: fibra muscular longitudinal; fmr: fibra muscular radial; mb: membrana basal; tc: tecido conjuntivo.

4.2.2. Bainha do pênis

A bainha do pênis possui tecido epitelial de revestimento cúbico, com células não ciliadas de núcleos esféricos. O epitélio repousa sob uma membrana basal, a qual é sustentada por uma fina camada de tecido conjuntivo **(Figura 7)**.

Além do tecido epitelial, a bainha do pênis possui duas camadas de tecido muscular: 1. Camada interna espessa, cujas fibras musculares estão dispostas, em sua maioria, de forma circular. Nesta camada, são encontradas também fibras musculares longitudinais e radiais

(Figura 7). 2. Camada externa delgada de tecido muscular contendo fibras longitudinais **(Figura 7)**. Externamente, no tecido muscular são observados pigmentos escuros, os quais, assim como no prepúcio, dão aspecto escuro à bainha do pênis. **(Figura 7)**.

4.2.3. Pênis e Ducto Ejaculatório

O pênis e o ducto ejaculatório possuem uma camada interna constituída por tecido epitelial de revestimento cúbico com células não ciliadas e núcleo esférico **(Figura 7)**, uma camada intermediária muscular formada por fibras, em sua maioria, de circulares, podendo ser também observadas fibras longitudinais e radiais, **(Figura 7)** e uma camada externa formada por tecido epitelial de revestimento pavimentoso com células de núcleo elíptico **(Figura 7)**. As células desta última camada caracterizam-se por serem mais baixas do que altas.

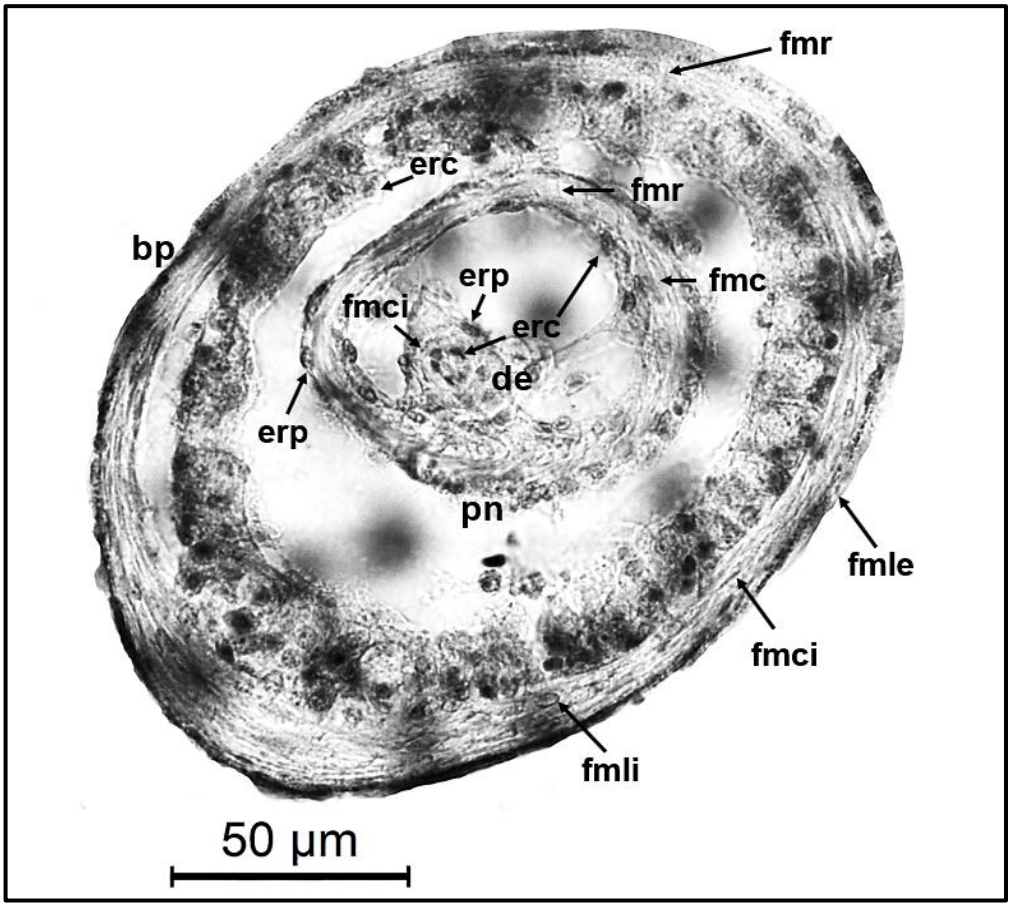

Figura 7: *Biomphalaria tenagophila tenagophila*. Corte transversal da Bainha do Pênis, Pênis e Ducto ejaculatório. Abreviações – bp: bainha do pênis; erc: epitélio de revestimento cúbico; erp: epitélio de revestimento pavimentoso; de: ducto ejaculatório; fmci: fibra muscular circular interna, fmle: fibra muscular longitudinal externa; fmli: fibra muscular longitudinal interna; fmr: fibra muscular radial.

4.3. MORFOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL

A vagina divide-se em duas regiões; região posterior e região anterior. A vagina posterior é a porção compreendida entre o útero e a inserção do ducto da espermateca e a vagina anterior inclui a porção entre a inserção do ducto da espermateca e a abertura vaginal **(Figura 8 A e B)**. A região distal da vagina anterior fica aderida à abertura genital feminina, a qual está localizada sob a pseudobrânquia, no lado esquerdo do corpo do caramujo. Internamente, a parede das duas regiões da vagina, anterior e posterior, é pregueada **(Figura 8 C)**.

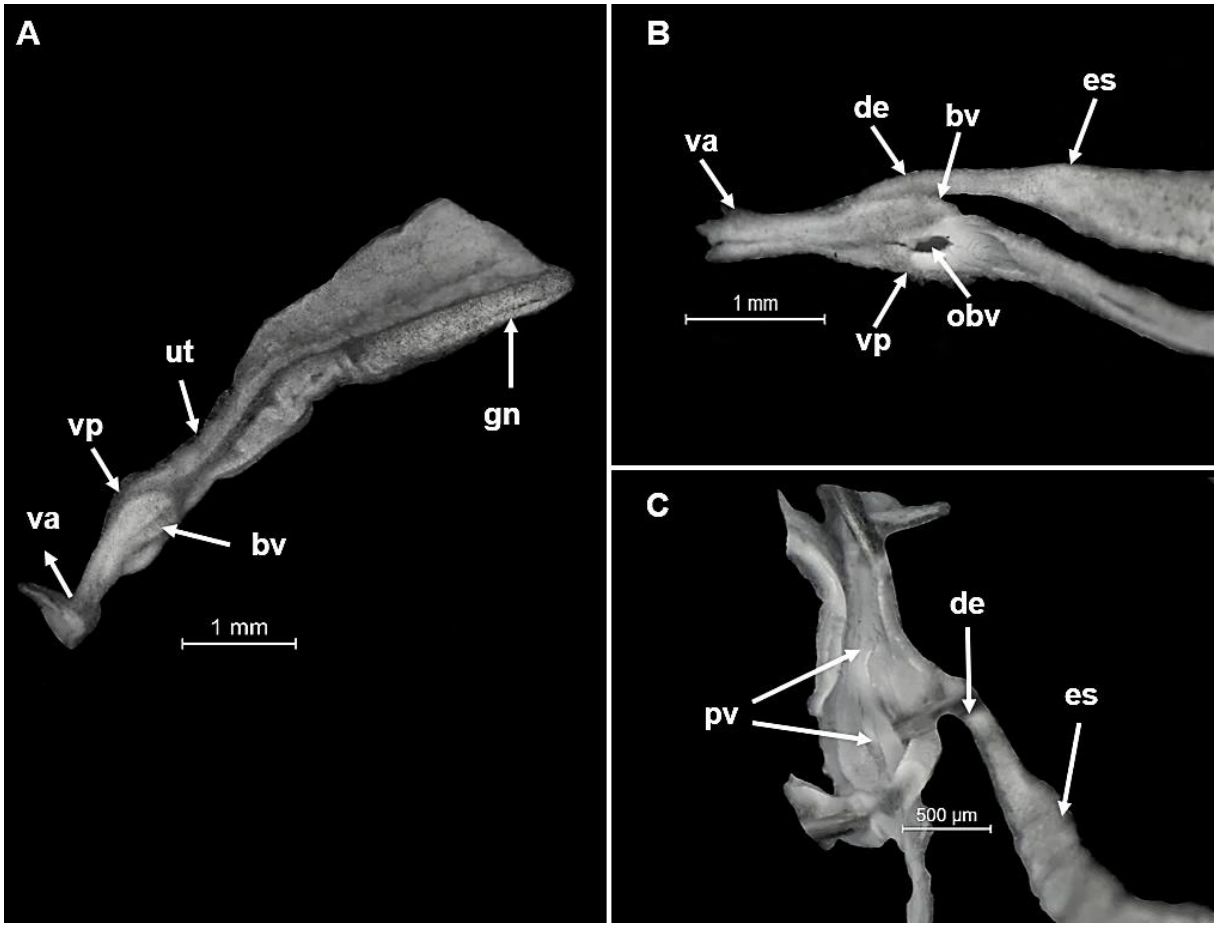

Figura 8: Região da Vagina de *Biomphalaria tenagophila tenagophila*. A: Região da vagina com o útero seccionado. B: Região da vagina seccionada evidenciando o orifício vaginal. C: Vista interna da vagina anterior e posterior destacando as pregas vaginais. Abreviações – bv: bolsa vaginal; de: ducto da espermateca; es: espermateca; gn: glândula nidamental; obv: orifício vaginal; pv: prega vaginal; ut: útero; va: vagina anterior; vp: vagina posterior.

Na face ventral da vagina posterior observa-se uma área abaulada e avolumada que corresponde à bolsa vaginal. A área da bolsa vaginal equivale à extensão da vagina posterior.

Internamente, a parede da bolsa vaginal é pregueada, o que pode ser visualizado por transparência **(Figura 8 C)**.

A vagina anterior e o ducto da espermateca comunicam-se diretamente com a vagina posterior e a bolsa vaginal. Esta última forma uma concavidade que se abre na região distal do útero ou região proximal da vagina posterior através do orifício da bolsa vaginal **(Figura 8 B)**.

4.4. HISTOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL

A vagina e a bolsa vaginal possuem tecido epitelial de revestimento colunar, com células ciliadas e núcleo basal. O tecido epitelial está sob uma membrana basal, seguida por tecido conjuntivo e tecido muscular **(Figura 9 e 10)**.

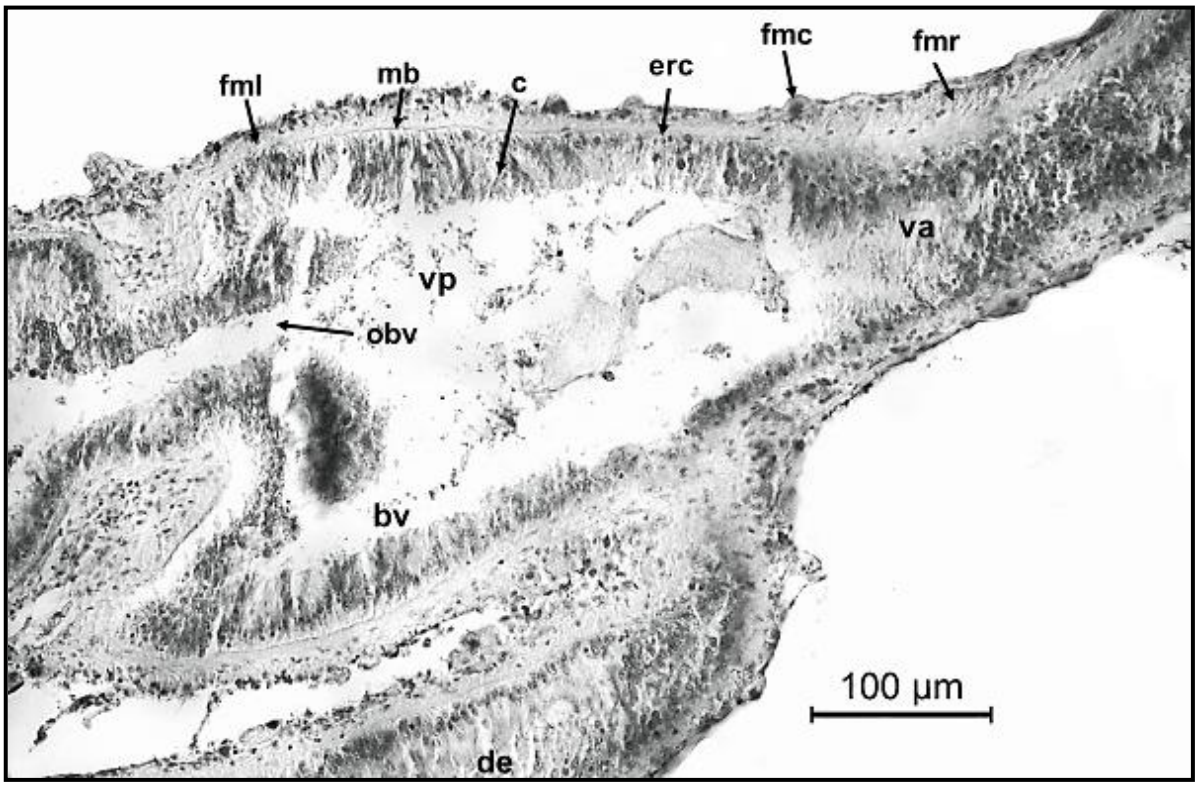

Figura 9: *Biomphalaria tenagophila tenagophila.* Vagina e bolsa vaginal em corte longitudinal. Abreviações – bv: bolsa vaginal. c: cílios; de: ducto da espermateca; erc: epitélio de revestimento colunar; fmc: fibra muscular circular; fml: fibra muscular longitudinal; fmr: fibra muscular radial; mp: membrana basal; obv: orifício da bolsa vaginal; va: vagina anterior; vp: vagina posterior.

O tecido muscular em ambas as estruturas consta de uma camada interna de fibras musculares longitudinais e uma camada externa mais espessa formada por fibras musculares circulares **(Figura 10)**.

Podem-se observar algumas fibras musculares radiais em ambas as camadas musculares, assim como algumas fibras circulares na camada interna longitudinal e fibras longitudinais na camada externa circular. Na superfície externa da vagina e da bolsa vaginal são observados pigmentos escuros **(Figura 10)**.

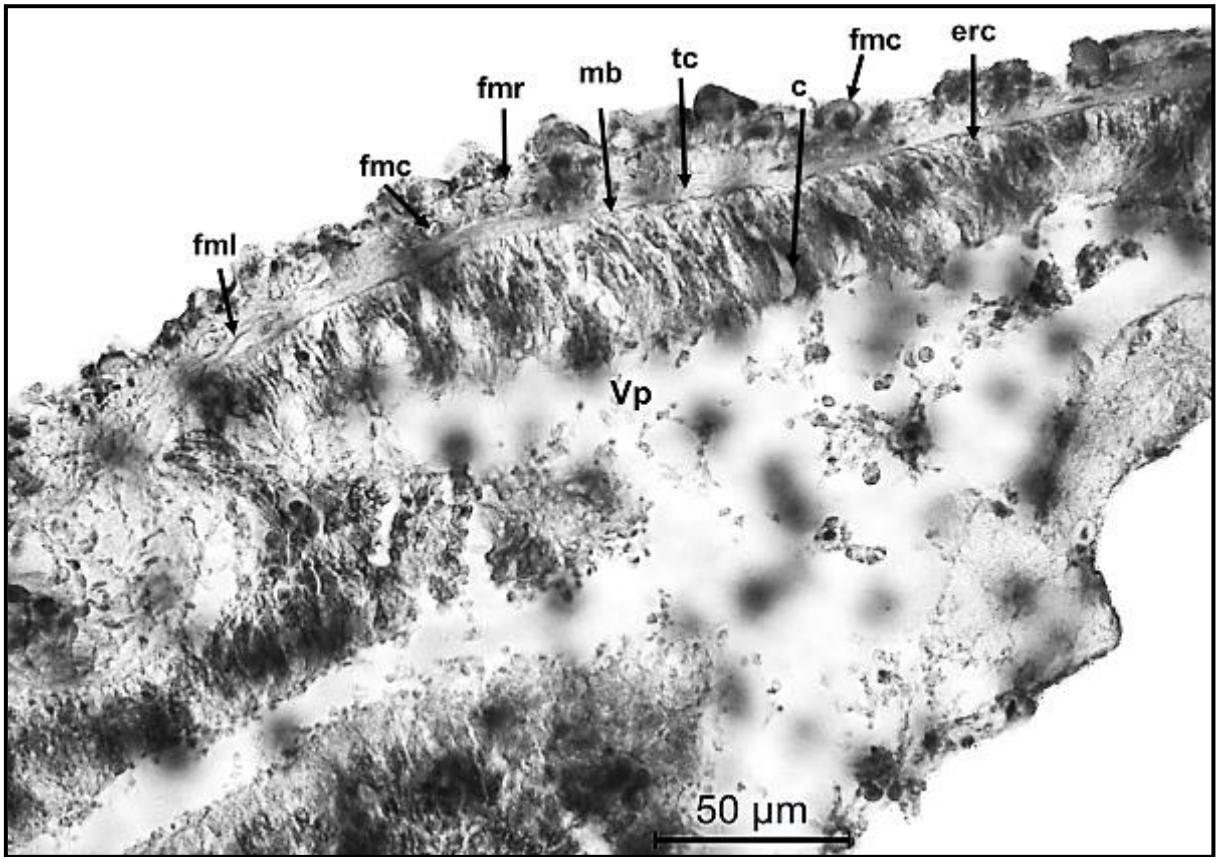

Figura 10: *Biomphalaria tenagophila tenagophila.* c: cílios; erc: epitélio de revestimento colunar; fmc: fibra muscular circular; fml: fibra muscular longitudinal; fmr: fibra muscular radial; mb: membrana basal; vp: vagina posterior; tc: tecido conjuntivo.

5. DISCUSSÃO

O sistema reprodutor possui estruturas de importância taxonômica para o gênero *Biomphalaria*, inclusive para táxons que pertencem a complexos de espécies, como no caso de *B. t. tenagophila*, que junto a *B. t. guaibensis* e *B. occidentalis*, formam o Complexo *Biomphalaria tenagophila*. Dentre as estruturas morfológicas com relevância na determinação específica de *B. t. tenagophila*, estão algumas relacionadas ao complexo peniano e à vagina.

5.1. MORFOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA

5.1.1. Complexo Peniano

O complexo peniano de *B. t. tenagophila* mostra diferenças relevantes com relação ao seu aspecto, extensão da bainha do pênis em relação ao prepúcio e dimensão do prepúcio, quando comparada a *B. t. guaibensis* (PARAENSE, 1984) e *B. occidentalis* (PARAENSE, 1981).

O aspecto robusto do complexo peniano de *B. t. tenagophila*, também observado por Paraense *et al*. (1964) e Ohlweiler *et al*. (2020), a distingue de *B. t. guaibensis* (PARAENSE, 1984; OHLWEILER *et al.*, 2020) e *B. occidentalis* (PARAENSE, 1981; OHLWEILER *et al*., 2020), nas quais o complexo peniano apresenta aspecto esguio.

Bainha do pênis com comprimento aproximado ao prepúcio como observado em *B. t. tenagophila* corrobora a descrição de Paraense *et al*. (1964) para a espécie e, é também verificado em *B. occidentalis* (PARAENSE, 1981). No entanto, difere de *B. t. guaibensis*, que segundo Ohlweiler *et al*. (2020), apresenta a bainha do pênis em torno de 50% menor do que o prepúcio.

A dimensão do prepúcio de *B. t. tenagophila* reforça a descrição fornecida por Paraense *et al.* (1964), que diz que a espécie possui a extremidade distal livre do prepúcio mais larga do que a extremidade apical, da mesma forma como em *B. t. guaibensis* (PARAENSE, 1984). Entretanto, *B. t. tenagophila* distingue-se de *B. occidentalis*, que de acordo com Paraense (1981), possui o prepúcio com mesmo diâmetro em toda sua extensão.

O diafragma e as duas pilastras longitudinais encontradas no prepúcio de *B. t. tenagophila* já haviam sido ilustradas em *B. t. tenagophila* por Paraense e Deslandes (1955b), em *B. glabrata* por Paraense e Deslandes (1955a) e Pan (1958) e em *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) por Abdel-Malek (1954b).

De acordo com Paraense e Deslandes (1955a), o diafragma tem a função de controlar a passagem do pênis da bainha para o prepúcio e as pilastras de darem sustentação ao prepúcio. Prepúcio contendo duas pilastras é também mencionado nos Planorbidae *Bathyomphalus contortus* (Linnaeus, 1758) (SOLDATENKO e PETROV, 2012), *Choanomphalus riparus* (Westerlund, 1865) (SOLDATENKO e PETROV 2012) e *Planorbis planorbis* (Linnaeus, 1758) (SOLDATENKO e PETROV, 2012) e no Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* (Linnaeus, 1758) (HOLM,1946).

A extremidade distal pontiaguda do pênis e ausência de estilete observados em nossos achados, também foi mencionada por Paraense e Deslandes (1955a, 1955b) em *B. glabrata* e *B.t. tenagophila.*

5.1.2. Vagina e Bolsa Vaginal

A bolsa vaginal de *B. t. tenagophila* é um caractere morfológico importante na diagnose da espécie, corroborando com os achados de Paraense *et al.* (1964), Paraense (1984), Tuan *et al.* (2012), Palasio *et al.* (2017) e Ohlweiler *et al.* (2020).

A presença de bolsa vaginal na face ventral da vagina posterior de *B. t. tenagophila* a torna semelhante à *B. t. guaibensis* (PARAENSE, 1984) e a difere de *B. occidentalis* (PARAENSE, 1981), na qual a bolsa vaginal está ausente.

O orifício presente na bolsa vaginal de *B. t. tenagophila*, que faz a comunicação da vagina posterior e da bolsa vaginal com o útero não é apresentado na bibliografia disponível para o gênero *Biomphalaria*, sendo descrito aqui pela primeira vez.

A bolsa vaginal de *B. t. tenagophila* confunde com a dilatação encontrada na face ventral da vagina posterior de alguns espécimes de *B. occidentalis* procedentes de Campo Grande no Mato Grosso do Sul (PARAENSE, 1981) e de Suzano em São Paulo (OHLWEILER *et al*., 2020), o que acarreta dúvidas na determinação dessas duas espécies.

É importante informar que o estudo microanatômico da vagina posterior de *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis* está sendo realizado no laboratório de malacologia da Sucen, já que se trata de uma região de importância taxonômica para os referidos táxons que, junto com

B. t. tenagophila, pertencem ao complexo *Biomphalaria tenagophila*. O estudo microanatômico da vagina posterior de *B. t. guaibensis*, que possui bolsa vaginal, e de *B. occidentalis*, que embora não apresente bolsa vaginal, pode conter uma área dilatada na vagina posterior, confirmará a presença ou não de um orifício nestes dois táxons, assim como encontrado na bolsa vaginal de *B. t. tenagophila*. Isto esclarecerá as dúvidas relacionadas às possíveis variações morfológicas que existem nesta região, evitando, assim, erros de diagnóstico.

5.2. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO E VAGINA

A caracterização histológica do complexo peniano e da vagina de Planorbidae, disponível na bibliografia consultada, refere-se principalmente aos gêneros *Anisus* (SOLDATENKO e SHATROV, 2013; SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Bathyomphalu*s (SOLDATENKO e PETROV, 2012), *Choanomphalus* (SOLDATENKO e PETROV, 2012, 2019), *Gyraulus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Helisoma* (ABDEL-MALEK, 1952, 1954a), *Planorbella* (SOLDATENKO e PETROV, 2012, 2019), *Planorbis* (SOLDATENKO e SHATROV, 2013, SOLDATENKO e PETROV, 2012, 2019) e *Segmentina* (SOLDATENKO e SHATROV, 2013; SOLDATENKO e PETROV, 2009, 2012).

Com relação aos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, os estudos histológicos do complexo peniano e da vagina são pouco inclusivos, e limitam-se à *B. glabrata* (PARAENSE e DESLANDES 1955a; PAN, 1958; SOLDATENKO e PETROV, 2019), *B. intermedia* (PARAENSE, 1988), *B. kuhniana* (PARAENSE, 1988), *B. straminea* (PARAENSE, 1988) e *B. alexandrina* (ABDEL-MALEK, 1954b).

A caracterização dos tecidos, epitelial e muscular, do complexo peniano e da vagina de *B. t. tenagophila* é aqui fornecida pela primeira vez.

5.3. HISTOLOGIA DO COMPLEXO PENIANO

5.3.1. Prepúcio

O epitélio de revestimento colunar com células ciliadas encontrado no prepúcio de B. t. tenagophila é mencionado na descrição de Pan (1958) para *B. glabrata*. O autor cita, assim como observado por nós, que as células epiteliais colunares são mais baixas na região do diafragma. Epitélio de revestimento colunar é reportado também para o prepúcio dos Planorbidae *B. alexandrina* (ABDEL-MALEK, 1954b) e *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1952) e do Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* (HOLM, 1946).

A arquitetura das camadas musculares do prepúcio de *B. t. tenagophila* é semelhante ao que é relatado por Abdel-Malek (1954b) para *B. alexandrina* e por Pan (1958) para *B. glabrata*. Porém em *B. t. tenagophila* observamos uma camada intermediária espessa formada por fibras frouxas longitudinais, circulares e radiais dispostas de maneira desordenada, enquanto que em *B. alexandrina* (ABDEL-MALEK, 1954B) e *B. glabrata* (PAN, 1958) a camada intermediária possui apenas fibras musculares longitudinais e radiais.

Não foi possível compararmos os tecidos, musculares e epiteliais, do prepúcio de *B. t. tenagophila* aqui estudada com outras espécies de *Biomphalaria*, que não *B. glabrata* e *B. alexandrina*, devido à falta de informações disponíveis na literatura consultada. As descrições de *B. intermedia*, *B. kuhniana* e *B. straminea*, fornecidas por Paraense (1988), inclusive de *B. glabrata* fornecida por Soldatenko e Petrov (2019) não abordam caracteres microanatômicos do prepúcio.

A musculatura do prepúcio de *B. t. tenagophila*, difere das informações disponibilizadas para o Planorbidae *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1952) e para o Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* (HOLM, 1946). Em *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1952), o prepúcio apresenta somente uma camada de fibras musculares longitudinais e circulares junto ao tecido conjuntivo e em *Lymnaea stagnalis apressa* (HOLM, 1946), possui duas camadas; uma de músculos longitudinais junto ao tecido conjuntivo e outra de músculos circulares.

5.3.2. Bainha do Pênis

O tecido epitelial de revestimento cúbico não ciliado encontrado na bainha do pênis de *B. t. tenagophila* corrobora com os relatos de Abdel-Malek (1954b) para *B. alexandrina* e de Paraense e Deslandes (1955a) e Pan (1958) para *B. glabrata*. Diferente do que é citado para os Planorbidae *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1954a), *Anisus vortex* (SOLDATENKO e SHATROV, 2013) e *Planorbis planorbis* (SOLDATENKO e SHATROV, 2013) e para o Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* (HOLM, 1946), nos quais o tecido epitelial de revestimento da bainha do pênis consta de células colunares.

O número e a disposição das fibras das camadas musculares (camada interna circular e camada externa longitudinal) encontradas na bainha do pênis de *B. t. tenagophila* coincidem com o que Abdel-Malek (1954b) apresenta para *B. alexandrina* e Pan (1958) para *B. glabrata*. No entanto, difere da descrição de Soldatenko e Petrov (2019), que utilizaram como ferramenta de estudo o microscópio confocal de varredura a laser em *B. glabrata*. Segundo Soldatenko e Petrov (2019) a bainha do pênis de *B. glabrata* possui quatro camadas: 1. Camada externa de fibras longitudinais. 2. Camada de fibras circulares. 3. Camada de fibras longitudinais. 4. Camada interna de fibras radiais.

Ao compararmos as camadas musculares da bainha do pênis de *B. t. tenagophila* aqui estudada com os Planorbidae *Anisus leucostoma* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Gyraulus crista* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Bathyomphalus contortus* (SOLDATENKO e PETROV, 2012), *Choanomphalus angulatus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Choanomphalus eurystomus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Choanomphalus riparius* (SOLDATENKO e PETROV, 2012, 2019), *Gyraulus albus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Planorbella duryi* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Planorbis planorbis* (SOLDATENKO e PETROV, 2012), *Segmentina oelandica* (SOLDATENKO e PETROV, 2019) *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1954a) , o Acroloxidae *Acroloxus lacustris* (SOLDATENKO e PETROV, 2019) e os Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* (HOLM, 1946), *Radix auricularia* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), observamos diversidade quanto ao número de camadas e no arranjo das fibras musculares dentre os táxons.

5.3.3. Pênis e Ducto Ejaculatório

O epitélio de revestimento pavimentoso que recobre a parede do pênis e do ducto ejaculatório de *B. t. tenagophila* foi também observado, por Paraense e Deslandes (1955a) em *B. glabrata*.

A camada interna da parede do pênis e do ducto ejaculatório de *B. t. tenagophila,* formada por epitélio de revestimento cúbico não ciliado, difere do que é apresentado por Pan (1958) para *B. glabrata* e por Abdel-Malek (1954b) para *B. alexandrina*. Em *B. glabrata,* Pan (1958) menciona a camada interna da parede do pênis composta por epitélio cúbico ciliado, enquanto que em *B. alexandrina*, Abdel-Malek (1954b) cita a camada interna do ducto ejaculatório constituída por epitélio cúbico ciliado. Tais diferenças merecem serem investigadas também em outras espécies do gênero *Biomphalaria*.

No táxon estudado, observamos uma camada muscular contendo fibras circulares, longitudinais e radiais no pênis e no ducto ejaculatório, enquanto que em *B. alexandrina* (ABDEL-MALEK, 1954b), *B. glabrata* (PAN, 1958, SOLDATENKO e PETROV, 2019), *B. intermedia* (PARAENSE, 1988) e *B. kuhniana* (PARAENSE, 1988) são mencionadas duas camadas musculares e em *B. straminea* três camadas.

Ao compararmos nossas observações sobre a musculatura do pênis de *B. t. tenagophila* com as descrições dos Planorbidae *Anisus leucostoma* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Gyraulus crista* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Bathyomphalus contortus* (SOLDATENKO e PETROV, 2012), *Choanomphalus angulatus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Choanomphalus eurystomus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Choanomphalus riparus* (SOLDATENKO e PETROV 2012, 2019), *Gyraulus albus* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), *Planorbis planorbis* (SOLDATENKO e PETROV, 2012, 2019) e *Segmentina oelandica* (SOLDATENKO e PETROV, 2009), do Acroloxidae *Acroloxus lacustris* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), do Lymnaeidae *Radix auricularia* (SOLDATENKO e PETROV, 2019) e do Physidae *Physella acuta* (SOLDATENKO e PETROV, 2019), verificamos diferenças no número de camadas musculares, que varia de 2 a 3 camadas nas espécies elencadas pelos respectivos autores e 1 camada no nosso material.

Soldatenko e Petrov (2019) observam, em *B. glabrata*, fibras musculares delgadas que conectam a parede interna do pênis com a parede externa do ducto ejaculatório, as quais não são verificadas em *B. t. tenagophila* e nem mencionado para *B. intermedia* (Paraense, 1988), *B. kuhniana* (Paraense, 1988) e *B. straminea* (Paraense, 1988).

5.4. HISTOLOGIA DA VAGINA E BOLSA VAGINAL

O epitélio de revestimento colunar com células ciliadas observado na vagina e na bolsa vaginal de *B. t. tenagophila* coincide com as descrições de *B. glabrata* (PARAENSE e DESLANDES, 1955a; PAN, 1958) e *B. alexandrina* (ABDEL-MALEK, 1954b). O mesmo é reportado para o Planorbidae *Helisoma trivolvis* por Abdel-Malek (1954a) e para o Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa* por Holm (1946).

O número de camadas e a arquitetura das fibras musculares da vagina e da bolsa vaginal de *B. t. tenagophila* estão em concordância com os achados de Pan (1958) para *B. glabrata*, e de Abdel-Malek (1954a) para o Planorbidae *Helisoma trivolvis*, que mostram a vagina e a bolsa vaginal com duas camadas musculares, sendo a interna formada por fibras longitudinais e a externa formada por fibras circulares. Paraense e Deslandes (1955a) e Paraense (1988) não discriminam as camadas musculares da vagina e da bolsa vaginal de *B. glabrata* e *B. kuhniana*, respectivamente, o que não nos permite comparar com *B. t. tenagophila* aqui descrita.

A estruturação do tecido muscular do Lymnaeidae *Lymnaea stagnalis apressa*, descrita por Holm (1946) e do Planorbidae *B. alexandrina* descrita por Abdel-Malek (1954b), difere do que é observado em nossos espécimes *B. t. tenagophila* e, em *B. glabrata* (Pan 1958) e *Helisoma trivolvis* (ABDEL-MALEK, 1954a), por apresentar vagina com duas camadas musculares, uma interna com fibras circulares e outra externa com fibras longitudinais.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que:

1. O conjunto dos caracteres morfológicos do complexo peniano (complexo peniano robusto, prepúcio com a extremidade distal livre mais larga do que a extremidade apical e bainha do pênis com comprimento aproximado ao prepúcio) e da região da vagina (presença de bolsa vaginal que se abre na região distal do útero ou na região proximal da vagina posterior através de um orifício) é considerado diagnóstico para *B. t. tenagophila*

2. O orifício da bolsa vaginal é descrito aqui pela primeira vez em *B. t. tenagophila.*

3. Os aspectos histológicos do complexo peniano e região da vagina, descrito aqui pela primeira vez, não auxiliaram na determinação de *B. t. tenagophila*.

4. *Biomphalaria t. tenagophila* que, juntamente com *B. occidentalis* e *B. t. guaibensis*, compõe o complexo *Biomphalaria tenagophila*, distingue-se do primeiro táxon pelo aspecto da vesícula seminal, presença de bolsa vaginal que se abre na região distal do útero ou na região proximal da vagina posterior através de um orifício, aspecto do complexo peniano e pelo diâmetro do prepúcio, e do segundo táxon pelo aspecto do complexo peniano e pela extensão da bainha do pênis em relação ao prepúcio.

5. Sugerimos o estudo histológico do complexo peniano e região da vagina de outras espécies do gênero *Biomphalaria*, em particular daquelas pertencentes a complexos de espécies, cujos táxons possuem grandes semelhanças nos órgãos reprodutores. O estudo histológico do complexo peniano e região da vagina em outras *Biomphalaria* são importantes para termos de comparação e desse modo identificar se há ou não variações entre os táxons, evitando, assim, erros de determinação específica.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Malek ET. The preputial organ of snails in the genus *Helisoma* (Gastropoda. Pulmonata). Am Midl Nat, V.48, p, 94 -102, 1952.
2. Abdel-Malek ET. Morphological studies on the family Planorbidae (Mollusca: Pulmonata). I. Genital organs of *Helisoma trivolvis* (Say) (Subfamily *Helisomatinae* FC Baker, 1945). Trans Am Microsc Soc, v. 73, n. 2, p. 103-124, 1954a.
3. Abdel-Malek ET. Morphological studies on the family Planorbidae (Mollusca: Pulmonata). II. The genital organs of *Biomphalaria boissyi* (subfamily Planorbinae, HA Pilsbry, 1934). Trans Am Microsc Soc, v. 73, n. 3, p. 285-296, 1954b.
4. Baker FC. The Molluscan Family Planorbidae. Univ Illinois Press. 1945.
5. Carvalho ODS, Mendonça CLFD, Marcelino JMDR, Passos LKJ, Fernandez MA, Leal RDS, Caldeira RL, Scholte RGC, Carmo EH**,** Mesquita SC, Thiengo SC. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. Epidemiol Serv Saúde, v. 27, p. e2017343, 2018.
6. Carvalho ODS, Scholte RGC, Amaral RS, Dutra LV, Guerra MAM. Distribuição Espacial de *Biomphalaria glabrata, B. straminea* e *B. tenagophila* Hospedeiros Intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, (Org.). *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 2008. 1.ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008; v. 1, p. 529-46
7. Deslandes N. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. Rev Serv Espec Saude Publica, v. 4, p. 371-82, 1951.
8. Holm LW. Histological and functional studies on the genital tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. Trans Am Microsc Soc, v. 65, n. 1, p. 45-68, 1946.
9. Katz N, Almeida K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciênc Cult, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.
10. Luz E, Silva SM, Carvalho AP, Castro N. Atualização da sistemática e distribuição geográfica dos planorbídeos (Gastropoda, Pulmonata) no Estado do Paraná (Brasil). Acta Biol Par, 27, 39-55, 1998.
11. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Doenças tropicais negligenciadas. 30 de janeiro – Dia mundial de combate às Doenças tropicais negligenciadas. Número especial. Mar. 2021. [Acesso em 08 de março de 2021] Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf
12. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2019.

13. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas. 4.ed. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde, 2014.

14. Ministério da Saúde (BR). Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saúde Pública. 2010, vol.44, n.1pp.200-202. [Acesso em 02 de março de 2021] Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102010000100023&lng=en&nrm=iso

15. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2.ed. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde, 2008.

16. Ohlweiler FP; Rossignoli, TJ. Biodiversidade das *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae) na Região Metropolitana de São Paulo como complemento à carta planorbídica do estado de São Paulo. BEPA, p. 1-17, 2016.

17. Ohlweiler FP, Rossignoli, TDJ, Palasio RGS, & Tuan, R. Taxonomic diversity of Biomphalaria (Planorbidae) in São Paulo state, Brazil. Biota Neotrop, v. *20* n. 2, 2020.

18. Palasio RGS, Almeida Guimarães MC, Ohlweiler FP, Tuan R. Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil. ZooKeys, n 668, p. 11, 2017.

19. Pan Chia-Tung. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. Bull Mus comp Zool Harv, v. 119, n. 3, p. 237-99, 1958.

20. Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. In: Lacaz, CS.; Baruzzi, GR.; Siqueira, JR., eds. Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo., Ed. Edgard Blucher/EdUSP, 1971 p. 213-39.

21. Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq do Mus Nac, v. 55, p. 105- 128 1975.

22. Paraense WL. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca, Basommatophora, Pulmonata). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 76, n. 2, p. 199-211, 1981.

23. Paraense WL. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sp. n. from Southern Braziland Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 79, n. 4, p. 465-469, 1984.

24. Paraense WL. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 83, n. 1, p. 1-12, 1988.

25. Paraense WL; Nicanor, HI; Hernán, CM. *Australorbis tenagophilus* in Peru, and its susceptibility to Schistosoma mansoni. Am j trop med hyg; v. 13, n. 4, p. 534-540, 1964.

26. Paraense WL, Deslandes N. The renal ridge as a reliable character for separating *Taphius glabratus* from *Taphius tenagophilus*. Am j trop med hyg, v. 8, n. 4, p. 456-472, 1959.

27. Paraense WL, Deslandes N. Observation on the morphology of *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 53, n. 1, p. 87-103, 1955a.

28. Paraense WL, Deslandes N. Observations on the morphology of *Australorbis nigricans*. Mem Inst Oswaldo Cruz, p. 121-134, 1955b.

29. Rey L. Parasitologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

30. Soldatenko EV, Petrov AA. The characteristics of copulation in *Segmentina oelandica* (Westerlund, 1885) (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae). Zoosyst Ross, v. 18, n. 2, p. 196-204, 2009.

31. Soldatenko EV, Petrov AA. Mating behaviour and copulatory mechanics in six species of Planorbidae (Gastropoda: Pulmonata). J Molluscan Stud, v. 78, n. 2, p. 185-196, 2012.

32. Soldatenko, EV, Shatrov, AB. Comparative ultrastructure of the terminal portions of the male copulatory apparatus in Planorbidae (Gastropoda: Pulmonata). Invertebr Reprod *Dev*, v. 57, n. 3, p. 224-236, 2013.

33. Soldatenko EV, Petrov AA. Musculature of the penial complex: A new criterion in unravelling the phylogeny of Hygrophila (Gastropoda: Pulmonata). J Morphol, v. 280, n. 4, p. 508-525, 2019.

34. Souza DD, Falcão ACMG, Gargioni C, Kanamura HY, Ciaravolo RMDC, Eduardo MBDP. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: normas e instruções. In *Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: normas e instruções*, p. 45-45, 2007.

35. Souza FPCD, Vitorino RR, Costa AP, Faria Júnior FC, Santana LA; Gomes, AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Rev Bras Clin Med, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

36. Spatz L, Vidigal TH, Caldeira RL, Neto ED, Cappa SMG, Carvalho OS. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. J Molluscan Stud, v. 65, n. 2, 1999.

37. Teles HMS. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de Schistosoma mansoni no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.

38. Tuan R, Ohlweiler FP, Palasio RGS., Zanna RD, Guimarães MCA. Pattern of genetic divergence of Mitochondrial DNA sequences in *Biomphalaria tenagophila* complex species based on Barcode and morphological analysis. *Schistosomiasis*, 2012.

39. Vitorino RR, Souza FPC, Costa AP, Faria Júnior FC, Santana LA e Gomes AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Rev Soc Bras Clin Med, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

40. World Health Organization (WHO). Schistosomiasis. 2020. [acesso em 16 de novembro de 2020] Disponível em: https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/indicator-groups/indicator-group-details/GHO/schistosomiasis

41. World Health Organization (WHO). Schistosomiasis (Bilharzia)**.** 2020. [acesso em 16 de novembro de 2020] Disponível em: https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1