



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**MOLUSCOS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DE  
TREMÁTODES: ESTUDO MOLECULAR DE *Helisoma* sp.  
(GASTROPODA; PLANORBIDAE) DE DIFERENTES ÁREAS  
GEOGRÁFICAS**

**Débora dos Santos Correia**

**2011**



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**MOLUSCOS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DE  
TREMÁTODES: ESTUDO MOLECULAR DE *Helisoma* sp.  
(GASTROPODA; PLANORBIDAE) DE DIFERENTES ÁREAS  
GEOGRÁFICAS**

*Tese apresentada para a obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Biomédicas,  
especialidade de Biologia Molecular em  
Medicina Tropical e Internacional*

**Orientadora:**

Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria Manuela Calado

**Co-Orientadora:**

Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria Amélia Grácio

2011

**Publicações no âmbito deste trabalho:**

Correia, D; Calado, M; Afonso, A; Ferreira, P; Ferreira, C; Pinto, A; Maurício, I & Grácio, M.A.A. 2010. ANÁLISE MOLECULAR APLICADA AO DNA MITOCONDRIAL E À REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL DE MOLUSOS DA FAMÍLIA PLANORBIDAE, POTENCIAIS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DE TREMATODES. Acta Parasitológica Portuguesa, 17 (2): 42

## **Agradecimentos**

Foi sem dúvida uma experiência única a realização deste projecto. Ao longo destes dois anos tive a oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas extraordinárias, a todas elas o meu sincero agradecimento:

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, pela disponibilidade que sempre teve para comigo, pelos conhecimentos partilhados sobre Malacologia e pelo rigor na correcção deste trabalho;

À Professora Doutora Maria Manuela Calado, pelos ensinamentos laboratoriais e teóricos e principalmente por ter sido o meu grande suporte ao longo deste projecto;

À Técnica Especialista Isabel Clemente, pela suas palavras de amizade nos bons e maus momentos e por toda a ajuda que me deu quando eu necessitei;

À Professora Doutora Isabel Maurício e à Investigadora Doutora Ana Afonso, pelos ensinamentos e apoio na área da Biologia Molecular;

Aos Mestres Cátia Ferreira, Pedro Ferreira e Sílvia Beato pelos imensos concelhos que me deram e por me auxiliarem em tudo o que eu precisei desde o primeiro momento;

À Investigadora Auxiliar Alcione Trinca, pelos momentos de alegria e boa disposição;

À Professora Aida Esteves, ao Doutor José Simões e ao Mestrando António Pinto, pelo Material Biológico que me forneceram para a realização deste trabalho;

A toda a Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, pelo acolhimento e apoio que me deram;

À minha mãe, por ser um exemplo para mim e por me ter incentivado a seguir sempre o meu caminho mesmo que este pareça difícil de percorrer;

À minha família e às minhas irmãs do coração, Ana Rute, Raquel e Madalena por todo o apoio que me deram ao longo da minha vida e principalmente nestes dois anos;

Ao Professor Doutor Germano de Sousa por me ter dado a oportunidade de fazer este projecto e por sempre me ter encorajado a termina-lo;

Ao Carlos por nunca me ter feito desistir dos meus sonhos;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este projecto, pela amizade e apoio que me foi dado sempre que precisei;

E por fim, a Deus por nunca me ter abandonado e por estar sempre presente na minha vida.

## Resumo

Ao longo dos tempos a caracterização das diferentes espécies da classe Gastropoda baseava-se apenas em características fenotípicas (morfologia da concha e partes moles), as quais eram insuficientes para distinguir espécies e subespécies. Assim, a caracterização genética desenvolvida nos últimos anos, tem-se mostrado uma boa ferramenta aplicada á diferenciação molecular de espécies, permitindo uma melhor compreensão sobre moluscos com um importante papel como hospedeiros intermediários de tremátodes e qual a sua posição dentro da família Planorbidae.

Os objectivos deste trabalho foram, por um lado fazer um estudo comparativo de populações de *Helisoma* sp., de Portugal e Cabo Verde, baseado num estudo molecular utilizando marcadores moleculares, nomeadamente o gene COI do DNA mitocondrial (mtDNA) e o gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) e a região interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal, e recorrendo à técnica PCR-RFLP, direccionada para a região ITS para a identificação de possíveis polimorfismos e, por outro lado estabelecer uma relação filogenética entre as populações portuguesas e cabo verdianas de *Helisoma* e outros planorbideos, hospedeiros intermediários de tremátodes.

Os resultados obtidos, para os genes em análise permitiram a identificação de três regiões distintas: Cabo Verde, Madeira e Portugal Continental, esta última formada pelas amostras de Algarve e Coimbra, apesar da distante geográfica que separa cada umas destas duas áreas.

Os resultados obtidos para os genes COI e 16S e para a região ITS, mostraram uma elevada homologia com as espécies *Helisoma trivolvis* e *H. duryi*.

## Abstract

Over time the characterization of different species of the Class Gastropoda has solely been based on phenotypic characters (morphology of the shell and soft parts), which were insufficient to distinguish some species and subspecies.

Thus, genetic characterization, developed in recent years, has proved a good tool for the molecular differentiation of species, allowing a better understanding of molluscs that have an important role as intermediate hosts of trematodes and of their position within the family Planorbidae.

The aims of this research were to make a comparative study of populations of *Helisoma* sp, from Portugal and Cape Verde, based on a molecular study using molecular markers, including the COI gene of mitochondrial DNA (mtDNA) and 16S ribosomal RNA (rRNA) and the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA, and using PCR-RFLP of the ITS region to identify possible polymorphisms, and on the other hand to establish the phylogenetic relation between populations of *Helisoma* from Portugal and Cap Verde and other Planorbidae intermediate hosts for trematodes.

The results for the genes under analysis allowed the identification of three distinct regions: Cape Verde, Madeira and mainland Portugal, the latter formed by the strains of Algarve and Coimbra, despite the geographical distance that separates each one of these two areas. The results obtained for the genes COI and mitochondrial 16S DNA and the ITS region showed high homology to the species *Helisoma trivolvis* and *H. duryi*.

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE FIGURAS	x
ÍNDICE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv

## **CAPÍTULO 1**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
1.1.Dados históricos sobre os moluscos	2
1.2.Classificação Taxonómica da família Planorbidae	3
1.3.Género <i>Planorbarius</i> Froriep, 1806	6
1.3.1. Características Morfológicas e Anatómicas do <i>Planorbarius metidjensis</i>	6
1.3.2. <i>Planorbarius metidjensis</i> : Importância em Parasitologia	7
1.3.3. Distribuição geográfica do <i>Planorbarius metidjensis</i>	8
1.4. Género <i>Helisoma</i> Swainson, 1840	8
1.4.1. Características Morfológicas e Anatómicas do género <i>Helisoma</i>	8
1.4.2. Importância do género <i>Helisoma</i>	10
1.4.3. Distribuição geográfica do género <i>Helisoma</i>	12
1.5. Importância da Biologia Molecular aplicada ao estudo da família Planorbidae	13
1.5.1. PCR	13
1.5.2. Marcadores moleculares	14
1.5.2.1. DNA mitocondrial	14
1.5.2.2. DNA ribossomal	16
1.5.3. RFLP - PCR	17

## **CAPÍTULO 2**

<b>2. OBJECTIVOS</b>	<b>19</b>
----------------------	-----------

<b><u>CAPÍTULO 3</u></b>	
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Obtenção de Moluscos</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Identificação Morfológica dos Moluscos</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Dissecção de Moluscos</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Extração do DNA genómico</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Quantificação do DNA genómico</b>	<b>22</b>
<b>3.6. Amplificação do DNA genómico</b>	<b>22</b>
<b>3.7. Aplicação de enzimas de restrição para a análise de polimorfismos - PCR-RFLP</b>	<b>25</b>
<b>3.8. Purificação e sequenciação das amostras</b>	<b>26</b>
<b>3.9. Análise molecular das amostras</b>	<b>26</b>
<b><u>CAPÍTULO 4</u></b>	
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Polimorfismos do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA)</b>	<b>28</b>
4.1.1. Diversidade Molecular	28
4.1.2. Distribuição e análise dos haplotipos	29
4.1.3. Análise filogenética	32
<b>4.2. Polimorfismos do gene COI do DNA mitocondrial (mtDNA)</b>	<b>34</b>
4.2.1. Diversidade Molecular	34
4.2.2. Distribuição e análise dos haplotipos	35
4.2.3. Análise filogenética	38
<b>4.3. Polimorfismos da Região Interna Transcrita (ITS) do DNA ribossomal</b>	<b>40</b>
4.3.1. Diversidade Molecular	40
4.3.2. Distribuição e análise dos haplotipos	41
4.3.3. Análise filogenética	44
<b>4.4. Aplicação de enzimas de restrição à Região ITS</b>	<b>46</b>
<b><u>CAPÍTULO 5</u></b>	<b>48</b>
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

<b>Figura 1</b> - <i>Planorbarius metidjensis</i> (Fotografia da autora)	<b>6</b>
<b>Figura 2</b> - Características da concha de <i>Planorbarius metidjensis</i> (Fotografias da autora)	<b>7</b>
<b>Figura 3</b> - <i>Helisoma</i> sp. (Fotografia da autora)	<b>9</b>
<b>Figura 4</b> – Características da concha de <i>Helisoma</i> sp.(Fotografias da autora)	<b>9</b>
<b>Figura 5</b> – Aparelho genital de <i>Helisoma trivolvis</i> (Imagem adaptada de Malek & Cheng, 1974)	<b>10</b>
<b>Figura 6</b> – Esquema do ciclo de vida do <i>Echinostoma</i> sp.	<b>11</b>
<b>Figura 7</b> - Distribuição geográfica do género <i>Helisoma</i> . (Imagem adaptada de <a href="http://www.discoverlife.org/.../map_of_Helisoma.htm">www.discoverlife.org/.../map_of_Helisoma.htm</a> )	<b>12</b>
<b>Figura 8</b> – DNA mitocondrial como herança materna (Imagem adaptada de <a href="http://www.tarafdar.wordpress.com/">www.tarafdar.wordpress.com/</a> )	<b>15</b>
<b>Figura 9</b> – Esquema do genoma do mtDNA e dos genes COI e 16S (Imagem adaptada de <a href="http://www.nature.com/.../v414/n6865/full/414807a.html">www.nature.com/.../v414/n6865/full/414807a.html</a> ).	<b>15</b>
<b>Figura 10</b> – Esquema das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 (Imagem adaptada de <a href="http://www.phytophthora-id.org/Protocol.htm">www.phytophthora-id.org/Protocol.htm</a> ).	<b>16</b>
<b>Figura 11</b> – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para o <b>gene 16S</b> . (1-14 amostras estudadas para diferentes áreas geográficas)	<b>28</b>
<b>Figura 12</b> - Relação entre as populações de moluscos, pela análise das sequências parciais do <b>gene 16S</b> através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.	<b>31</b>

**Figura 13** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao gênero *Helisoma* para as diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais do **gene 16S** através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. 33

---

**Figura 14.** – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para o **gene COI**. (1-19 algumas das amostras estudadas para diferentes áreas geográficas). 34

---

**Figura 15** - Relação entre as populações de moluscos, pela análise das sequências parciais do gene **COI** através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. 37

---

**Figura 16.** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao gênero *Helisoma* para as diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais do **gene COI** através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura-2P. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. 38

---

**Figura 17** – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para a **região ITS** (1-14 - algumas das amostras estudadas para diferentes áreas geográficas). 40

---

**Figura 18** - Análise filogenética das amostras de moluscos com base em sequências parciais da **região ITS**. Método de agrupamento de “neighbor joining”, com base nas distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, em percentagem, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. 43

---

**Figura 19.** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao gênero *Helisoma* para as diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais da **região ITS** através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura-2 parâmetros. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. 45

---

**Figura 20** - Produtos de ITS após aplicação por PCR-RFLP seguido de digestão com *Alu* em gel de agarose a 3%. ..... **46**

**Figura 21** -. Diagrama representativo dos perfis obtidos por PCR-RFLP após digestão dos produtos amplificados da região ITS utilizando a enzima *Alu I*. ..... **47**

<b>Tabela 1</b> – Classes do Filo Mollusca.	<b>3</b>
<b>Tabela 2</b> – Subclasses da Classe Gastropoda.	<b>4</b>
<b>Tabela 3</b> – Ordens da Subclasse Pulmonata.	<b>4</b>
<b>Tabela 4</b> – Famílias da ordem Basommatophora.	<b>5</b>
<b>Tabela 5</b> – Sequências dos oligonucleótidos utilizados para a amplificação dos genes, CO1, 16S e ITS.	<b>23</b>
<b>Tabela 6</b> – Condições térmicas do PCR para os diferentes genes amplificados.	<b>24</b>
<b>Tabela 7</b> - Enzima de restrição utilizada para o estudo da região ITS.	<b>25</b>
<b>Tabela 8</b> - Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o <b>gene 16S</b> .	<b>29</b>
<b>Tabela 9</b> - Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no <b>gene 16S</b> nos diferentes exemplares em estudo.	<b>29</b>
<b>Tabela 10.</b> – Índice de polimorfismos do <b>gene 16S</b> .	<b>30</b>
<b>Tabela 11.</b> Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o <b>gene COI</b> .	<b>35</b>
<b>Tabela 12</b> - Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no <b>gene COI</b> nos diferentes exemplares em estudo.	<b>35</b>
<b>Tabela 13.</b> – Índice de polimorfismos do <b>gene COI</b> .	<b>36</b>
<b>Tabela 14.</b> Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para a <b>região ITS</b> .	<b>40</b>
<b>Tabela 15</b> - Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados na <b>região ITS</b> nos diferentes exemplares em estudo.	<b>41</b>
<b>Tabela 16</b> – Índice de polimorfismos da <b>região ITS</b> .	<b>42</b>

μl	microlitros
COI	Citocromo c oxidase sub-unidade 1
CTAB	<i>Cetyltrimethyl Ammonium Bromide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Sal bissódico do ácido Etileno Diamino Tetra Acético
Eppendorf	Tubos de 1,5 ml
et al. ( <i>et alliae</i> )	e outros (para pessoas)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
ml	mililitros
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	RNA ribossómico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
r.p.m	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta

# **CAPÍTULO 1-Introdução**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DADOS HISTÓRICOS SOBRE OS MOLUSCOS

Como hospedeiros intermediários de tremátodes, os moluscos são um grupo muito vasto, cujos fósseis mostram que eles ocuparam um lugar importante, entre os demais habitantes do planeta Terra, desde os tempos geológicos mais antigos. São seres essencialmente aquáticos, (com habitats em mares, lagos e rios), tendo alguns se adaptado à vida terrestre (Malek & Cheng, 1974 e Grácio, 1981)).

Os moluscos (Filo Mollusca), de acordo com estudo de fósseis, teriam surgido na terra no período Câmbrico, portanto há cerca de 600 milhões de anos (Grácio, 1981 & Kloos & David., 2002). O número actual de espécies de moluscos não é conhecido mas pensa-se que esteja muito próximo de 150.000, estando cerca de 80.000 incluídas na Classe Gastropoda (Malek & Cheng, 1974). Pode-se concluir, através destes números, que os moluscos se encontram entre os animais com mais possibilidade de sucesso, dado que aparecem em todos os tipos de “nichos” ecológicos, desde as profundidades abissais dos oceanos, às mais áridas regiões terrestres.

Só com Swammerdam (1737) se veio a conhecer o papel dos moluscos como hospedeiro intermediários de parasitas, e é a partir desta altura que os biólogos começam a interessar-se pela Malacologia Médica (Grácio, 1981).

Este interesse veio a aumentar nos fins do século XIX com a descoberta, pelo alemão Bilharz, do *Schistosoma*, causador da bilharziose vesical (1851) e com o conhecimento de que aquele parasita necessita no seu ciclo de vida de um molusco de água doce como hospedeiro intermediário (Grácio, 1981).

Dado que a Malacologia, estava ligada a doenças de carácter menos “agudo”, só muito lentamente se foi impondo, sendo que apenas no século XX, começou a ser reconhecida como uma importante área de Biologia Aplicada e da Parasitologia (Malek & Cheng, 1974 e Grácio, 1981).

## 1.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA DA FAMÍLIA PLANORBIDAE

Ao recordarmos alguns moluscos mais conhecidos como caracóis, lesmas, polvo, choco, ostras, mexilhões, etc., fazemos, até certo ponto, ideia da variação de formas que podemos encontrar no Filo Mollusca.

Os moluscos Planorbidae são constituídos por, cabeça, pé, massa visceral e manto e não possuem segmentação. A cabeça aloja os órgãos dos sentidos (tentáculos e olhos) e inclui o bolbo bucal onde se encontra a rádula (este é um órgão exclusivo dos moluscos). O pé representa a região ventral do saco dermo-visceral, particularmente forte e muitas vezes prolongada. A massa visceral é uma volumosa protuberância da região dorsal, que aloja a maioria dos órgãos. E por fim o manto ou palio, região da “pele” que segrega a concha e cobre a massa visceral, e que apresenta uma dobra saliente, o colar do manto, que forma uma cavidade, a cavidade paleal, na qual estão alojados os órgãos respiratórios e nalguns casos os orifícios excretores e sexuais (Malek & Cheng, 1974).

Sendo assim, o Filo **Mollusca** engloba seis classes (**Tabela 1**), das quais apenas faremos referência à classe **Gastropoda** pela sua importância em Medicina.

**Tabela 1** – Classes do Filo Mollusca.

	<b>Classes</b>
<b>Filo Mollusca</b>	Monoplacophora
	Amphineura
	Bivalvia
	Scaphopoda
	Cephalopoda
	<b>Gastropoda</b>

Por sua vez, esta classe divide-se em três subclasses (**Tabela 2**) das quais apenas abordaremos a subclasse **Pulmonata**.

**Tabela 2** – Subclasses da Classe Gastropoda.

		Subclasses
<b>Filo Mollusca</b>	<b>Classe Gastropoda</b>	Prosobranchiata
		Opisthobranchiata
		<b>Pulmonata</b>

Os pulmonados são principalmente caracóis terrestres e de água doce. Alguns, contudo, são marinhos e de águas salobras. Não possuem brânquias e uma parte da cavidade do manto funciona como um pulmão, por apresentar numerosos vasos sanguíneos e daí a designação de pulmonados. A concha, quando presente, possui a forma de uma espiral simples e regular. Os pulmonados são hermafroditas, normalmente ovíparos, mas por vezes ovovivíparos (Malek & Cheng, 1974 e Malek, 1980)

A subclasse Pulmonata está dividida em três ordens (**Tabela 3**). Destas três apenas falaremos da ordem **Basommatophora**.

**Tabela 3** – Ordens da Subclasse Pulmonata.

			Ordens
<b>Filo Mollusca</b>	<b>Classe Gastropoda</b>	<b>Subclasse Pulmonata</b>	Systollommatophora
			Stylommatophora
			<b>Basommatophora</b>

Os membros desta ordem são na sua maioria caracóis de água doce, mas existem alguns terrestres ou apenas marinhos. Possuem um par de tentáculos contrácteis em que os olhos se encontram na base. A concha é cônica, discoidal ou pateliforme (forma de lapa). A região genital masculina e feminina abrem separadamente para o exterior, mas ambas estão localizadas muito perto uma da outra (Malek & Cheng, 1974).

Dentro da ordem Basommatophora existem várias famílias (Tabela 4) entre elas encontra-se a Família **Planorbidae**.

**Tabela 4** – Famílias da ordem Basommatophora.

				Famílias
<b>Filo</b> <b>Mollusca</b>	<b>Classe</b> <b>Gastropoda</b>	<b>Subclasse</b> <b>Pulmonata</b>	<b>Ordem</b> <b>Basommatophora</b>	Siphonaridae
				Gadiniidae
				Ellobiidae
				Carychiidae
				Ancylidae
				Physidae
				Lymnaeidae
				Acroloxidae
				Chilinidae
				<b>Planorbidae</b>

A família Planorbidae é uma das famílias mais importantes do ponto de vista da saúde pública. A concha é discoidal, sinistral (ultradextral) e pode ser globosa ou fisóide. O animal é sinistral com as aberturas pulmonares e genitais situadas no lado esquerdo. Os tentáculos são longos, filiformes e cilíndricos, com olhos situados na base. A estrutura do complexo penial é variável, mas constituído sempre de um prepúcio e de um saco vérgico. A rádula é constituída por um dente bicúspide central, dentes laterais grandes e bi ou tricúspides e os dentes marginais são compridos, estreitos e multicúspides. Uma pseudobrânquia, rodeada pelo colar do manto, altamente vascularizada está presente do lado esquerdo. Os membros desta família possuem hemoglobina na sua hemolinfa e por conseguinte esta apresenta uma cor avermelhada (Malek & Cheng, 1974).

A Família Planorbidae engloba vários géneros dos quais destacamos:

- *Planorbarius* Froriep, 1806;

- *Helisoma* Swainson, 1840.

### 1.3. GÊNERO *Planorbarius* Froriep, 1806

Do género *Planorbarius* apenas faremos referência à espécie *Planorbarius metidjensis* Forbes, 1838.

#### 1.3.1. Características Morfológicas e Anatômicas do *Planorbarius metidjensis*

O *P. metidjensis* (**Figura 1**), é um molusco de água doce, apresenta uma concha (**Figura 2**) discóide, frágil, espira formada por três a quatro voltas arredondadas, com estrias transversais e longitudinais. As estrias longitudinais são finas e mais aparentes nas primeiras voltas. Apresenta uma sutura profunda e bastante umbilicada na face superior e quase plana na face inferior. A abertura é de grandes dimensões, arredondada e um pouco oblíqua. A concha de cor amarela pálida pode, contudo apresentar-se esbranquiçada e translúcida e a epiderme um pouco espessa e castanha escura (Medeiros & Simões., 1985).

Os diâmetros oscilam entre 13 a 17mm (diâmetro maior) e 6 a 10 mm (diâmetro menor).



**Figura 1** - *Planorbarius metidjensis* (Fotografia da autora).



**Figura 2-** Características da concha do *Planorbarius metidjensis* (Fotografias da autora).

A rádula do *P. metidjensis* tal como a de qualquer Planorbidae é uma membrana cartilaginosa, arredondada na extremidade anterior. Fica situada dentro do bolbo bucal perto da sua extremidade posterior. A extremidade anterior é visível através da boca quando o caracol se alimenta. A sua superfície superior está coberta por pequeníssimos dentes, dispostos em inúmeras fiadas transversais. Cada fiada transversal é composta por um dente central de contorno trapezoidal, provido de duas cúspides triangulares com vértices aguçados. De ambos os lados do dente central dispõem-se os dentes laterais, em número de nove, provido de três cúspides aguçadas nas extremidades, uma cúspide central, o mesocone, mais largo que as duas cúspides laterais, o ectocone e o endocone. Aos dentes laterais seguem-se os dentes intermédios, em número de quatro e cuja configuração é idêntica à dos anteriormente descritos mas mais alongados e providos de um mesocone (Azevedo *et al.*, 1954).

### 1.3.2. *Planorbarius metidjensis*: importância em Parasitologia

*P. metidjensis*, desempenha um importante papel como hospedeiro intermediário de *Schistosoma haematobium* no Norte de África (Yacoubi *et al.*, 1999), de *S. bovis* em Salamanca (Ramajo-Martin & Simon-Vicente, 1988), no Sudão, com alguns casos descritos (Touassem & Jourdane, 1986) e foi hospedeiro natural de *S. haematobium* no Algarve (Bettencourt *et al.*, 1921, Bettencourt & Borges, 1922, França, 1923 e Azevedo *et al.* 1948). Para esclarecer o papel destes moluscos, na transmissão de *Schistosoma* sp, vários trabalhos experimentais foram realizados nas últimas décadas (Oliveira *et al.*, 1974, Silva *et al.* 1977, Southgate *et al.*, 1984, Kechemir & Combes, 1988 e Zekhnini, *et al.*, 1997).

### 1.3.3. Distribuição geográfica do *Planorbarius metidjensis*

*P. metidjensis* tem uma distribuição geográfica limitada a duas zonas Mediterrânicas: do Mediterrâneo Norte até à Península Ibérica e do Mediterrâneo Sul até Marrocos e Argélia.

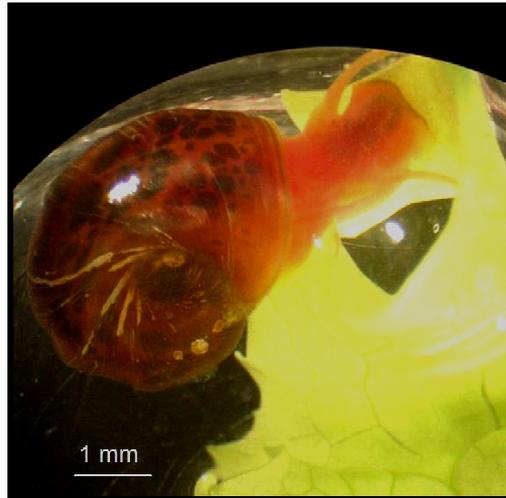
Em Portugal, *P. metidjensis* tem uma ampla distribuição geográfica podendo encontrar-se, praticamente, ao longo de todo o território (Nobre, 1941 e Grácio, 1981).

## 1.4. GÉNERO *Helisoma* Swainson, 1840

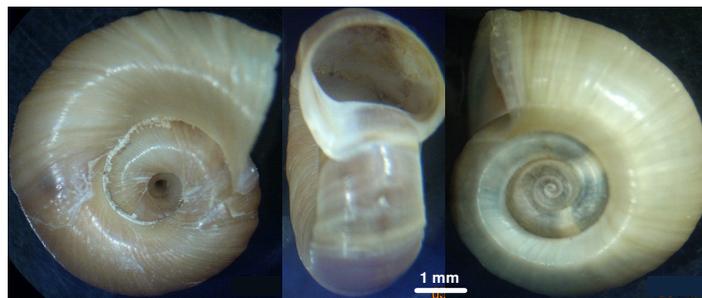
O género *Helisoma* inclui várias espécies, sendo algumas delas hospedeiros intermediários de tremátodes (Malek & Cheng, 1974).

### 1.4.1. Características Morfológicas e Anatômicas do género *Helisoma*

As espécies do género *Helisoma* (**Figura 3**), têm uma concha discóide, com espira moderadamente aumentada, com voltas que se podem apresentar anguladas ou arredondadas no meio. A abertura é de grandes dimensões, em forma de sino (campanulada) (**Figura 4**). Apresentam uma cor avermelhada e a epiderme um pouco espessa e castanha escura. Os diâmetros oscilam entre 13 a 20 mm (Malek & Cheng, 1974).

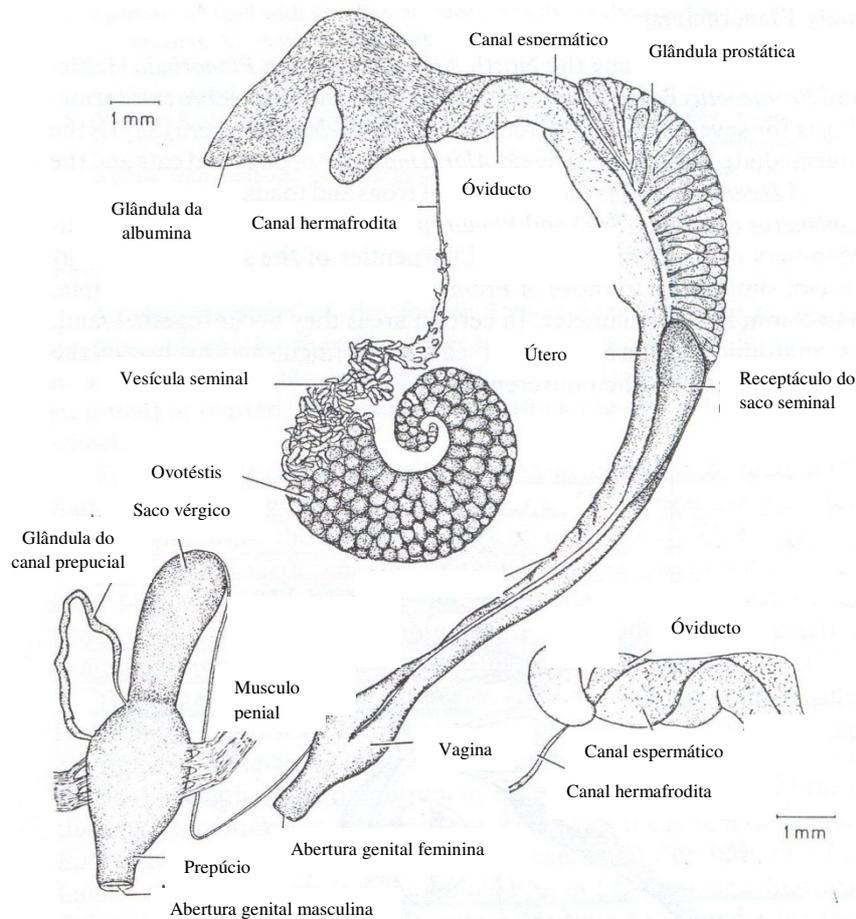


**Figura 3-** *Helisoma* sp. (Fotografia da autora).



**Figura 4** – Características da concha do género *Helisoma* sp.(Fotografias da autora).

No aparelho genital dos membros deste género distingue-se uma glândula prepúcial bem desenvolvida em forma de chávena, a partir da qual se estende um longo canal espermático, a glândula da próstata é multiplamente diverticulada em forma de leque (ou em fole em corte transversal) e os divertículos da próstata são sacos simples dispostos em fiadas simples ao longo do canal da próstata (Brown, 1994 e Ibikounlé *et al.*, 2007). Na **Figura 5** apresentamos como exemplo o aparelho reprodutivo de *Helisoma trivolvis* (Malek & Cheng, 1974).



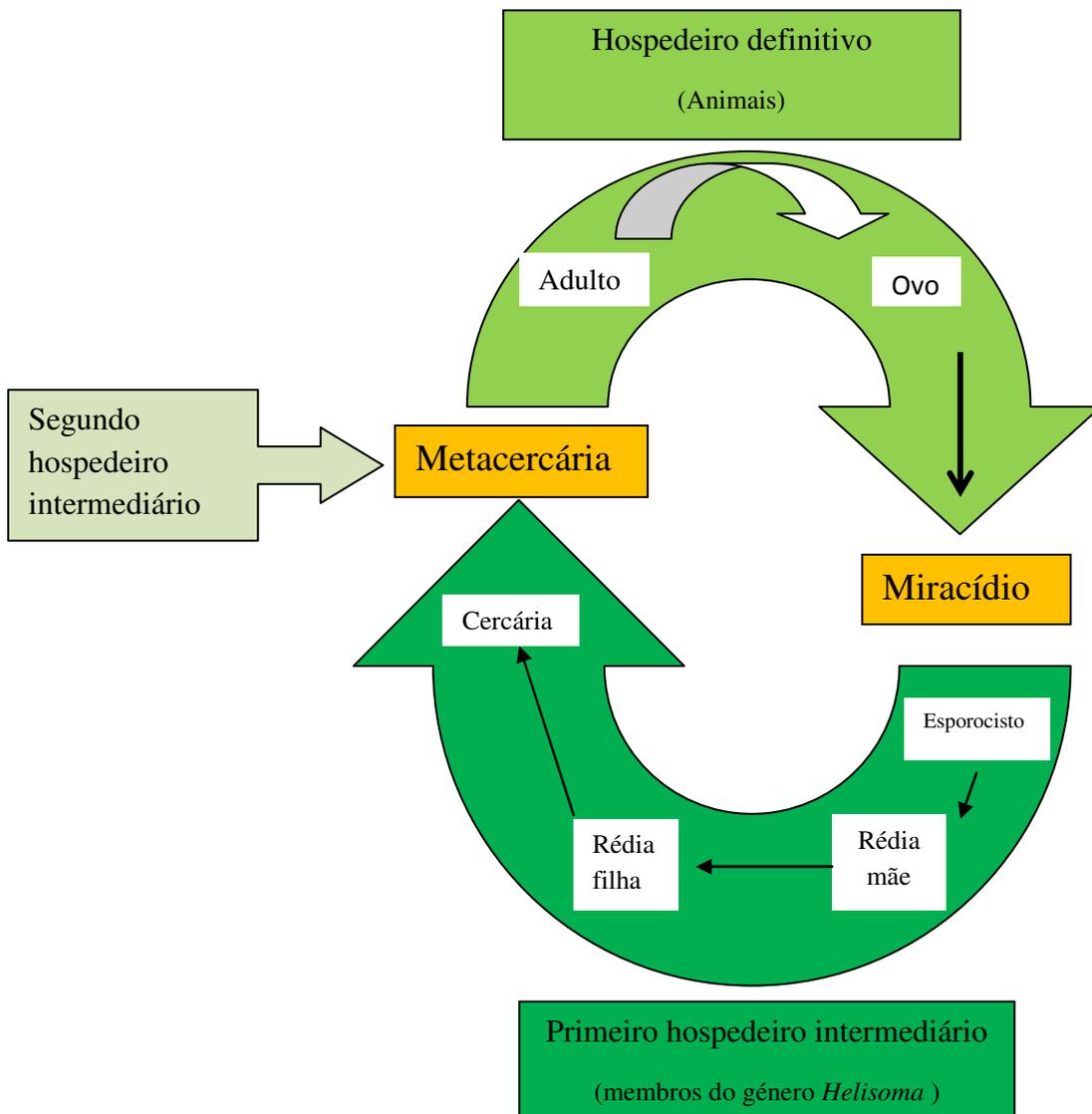
**Figura 5** – Aparelho genital de *Helisoma trivolvis* (Imagem adaptada de Malek & Cheng, 1974).

#### 1.4.2. Importância do género *Helisoma*

O género *Helisoma* tem vindo a ser aplicado cada vez mais, como modelo, para variados estudos, como, por exemplo, estudos neurobiológicos (Jiménez, *et al.* 2006; Vavoulis, *et al.* 2007 e Goldberg, *et al.* 2008), ecotoxicológicos, tanto em ovos (Tchounwou, *et al.* 1991), e em formas embrionárias (Aboul-Ela & Khalil, 1987 e Cole *et al.* 2002), como em estádios juvenis e adultos (Arthur, *et al.* 1987 e Camargo & Alonso 2007). Este facto deve-se em parte, á sua distribuição geográfica, á sua

participação na cadeia trófica em ambientes aquáticos e também á sua cápsula transparente, onde se podem observar os vários estadios embrionários.

Os membros do género *Helisoma* são hospedeiros intermediários de um grande número de espécies de trematódes, nomeadamente, do género *Echinostoma* (Malek & Cheng, 1974). Na **Figura 6**, está esquematizado um ciclo de vida de *Echinostoma* sp.,mostrando o papel que aquele molusco desempenha como hospedeiro intermediário.

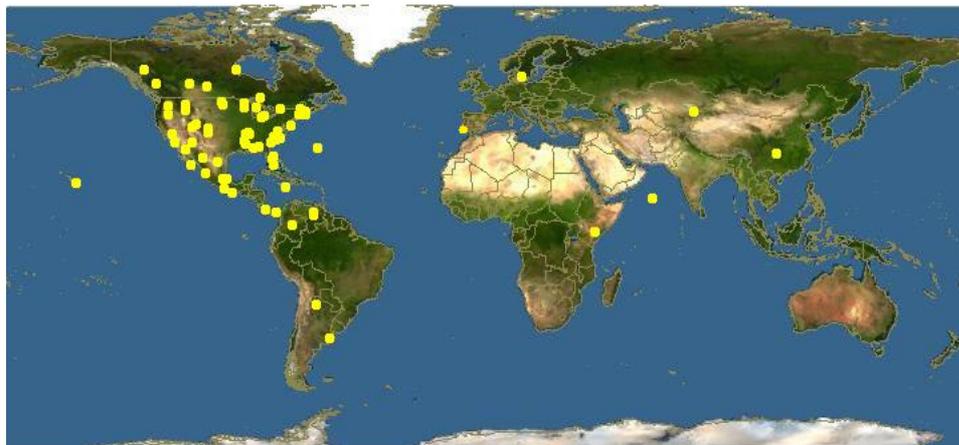


**Figura 6** – Esquema do ciclo de vida do *Echinostoma* sp. (Esquema adaptado de Knaap & Loker, 1990)

Foi descrito, em ensaios laboratoriais, a utilização do *H. duryi* como competidor de hospedeiros intermediários para schistosomas no Egito (Frandsen & Madsen, 1979) e na Tanzânia (Madsen, 1983).

### 1.4.3. Distribuição geográfica do género *Helisoma*

As espécies mais conhecidas pertencentes a este género, são nativas da América do Norte (**Figura 7**). Porém, existem registos da sua presença na região Neotropical, especialmente no Perú, Equador e Colômbia (Kawano *et al.* 1985), desde África até ao Egito (Brown, 1994), este aparecimento deve-se sobretudo á introdução humana ou laboratorial, no Brasil deve-se sobretudo aos aquaristas (Paraense, W. L., 1976), bem como em Portugal (Grácio, 1982).



**Figura 7** - Distribuição geográfica do género *Helisoma*. (Imagem adaptada de [www.discoverlife.org/.../map\\_of\\_Helisoma.htm](http://www.discoverlife.org/.../map_of_Helisoma.htm)).

Os pontos a amarelo indicam os habitats das diferentes espécies do género *Helisoma*.

## 1.5. IMPORTÂNCIA DA BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA FAMÍLIA PLANORBIDAE

Inicialmente, a caracterização das diferentes espécies de moluscos baseava-se apenas em dados fenotípicos (características morfológicas da concha e partes moles), o que se mostrou insuficiente para distinguir espécies e subespécies (Malek & Cheng, 1974, Brown, 1994 e Ibikounlé *et al.*, 2007).

A caracterização genética dos moluscos é mais uma das alternativas para quantificar a sua diversidade. Actualmente, os marcadores genéticos são, sem dúvida, uma das principais ferramentas para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural e, com a sua utilização, é possível também quantificar a variabilidade intrapopulacional.

O métodos moleculares baseiam-se na análise de DNA, examinando directamente o genoma do molusco, logo não são confundidos com factores de variabilidade induzida (Gow *et al.*, 2004)

### 1.5.1. PCR

A reacção em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1988 veio possibilitar novas estratégias de análise de genes no âmbito da tecnologia de DNA recombinante. Com a PCR, consegue-se uma amplificação fácil, muito rápida e selectiva de fragmentos de DNA específicos (Cooper & Hausman, 2007 e Videira, 2001).

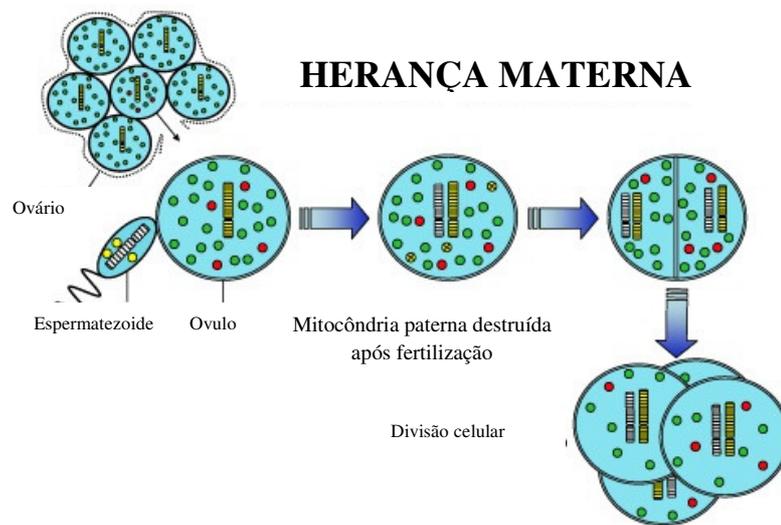
Posteriormente, as técnicas de PCR têm tido um desenvolvimento notável. Os melhoramentos introduzidos resultam no uso de novas polimerases mais fiáveis, introduzindo menos erros no DNA amplificado (Cooper & Hausman, 2007 e Videira, 2001).

### 1.5.2. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer genótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. A sequência de nucleótidos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas (Serrano & Garcia-Lobo, 1992). No entanto, nas últimas décadas, o desenvolvimento tecnológico tem dado passos muito importantes e a aplicação de novas técnicas moleculares ao estudo das espécies de moluscos com importância em saúde humana e animal tem permitido caracterizar os hospedeiros intermediários na perspectiva de aprofundar o conhecimento sobre a relação entre molusco e o parasita. Das diversas técnicas que têm vindo a ser desenvolvidas e utilizadas no estudo da variabilidade genética das populações de moluscos de água doce com importância médica, destacamos as seguintes.

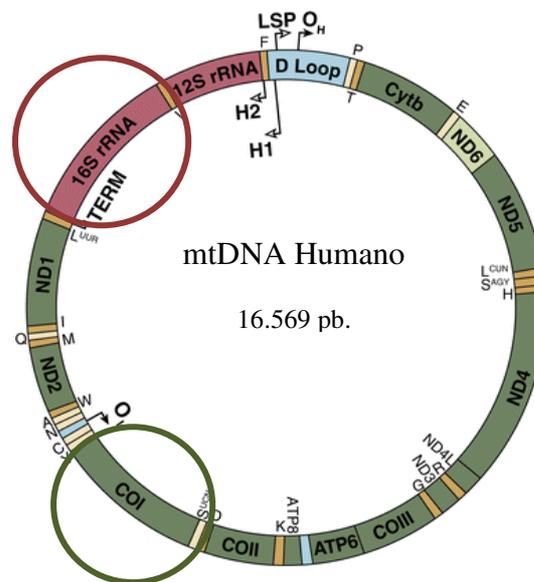
#### 1.5.2.1. DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) foi descoberto em 1960 e desde então, tem sido amplamente usado como uma importante ferramenta na análise genética das populações de moluscos e é útil para a discriminação de microrganismos geneticamente semelhantes devido à sua rápida diferenciação na evolução, o mtDNA evolui 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear, pois não existem mecanismos de reparo nesta molécula. O genoma mitocondrial é gerado maternalmente, não sofre, desta forma, recombinação, esta herança materna possibilita que esta molécula seja usada como um importante marcador molecular com o objectivo de traçar a história evolutiva de uma determinada espécie bem como a filogenia entre as populações existentes, independente de terem sofrido efeitos de adaptação e/ou selecção (Cooper & Hausman, 2007; Videira, 2001) (**Figura 8**).



**Figura 8** – DNA mitocondrial como herança materna (Imagem adaptada de [www.tarafdar.wordpress.com/](http://www.tarafdar.wordpress.com/)).

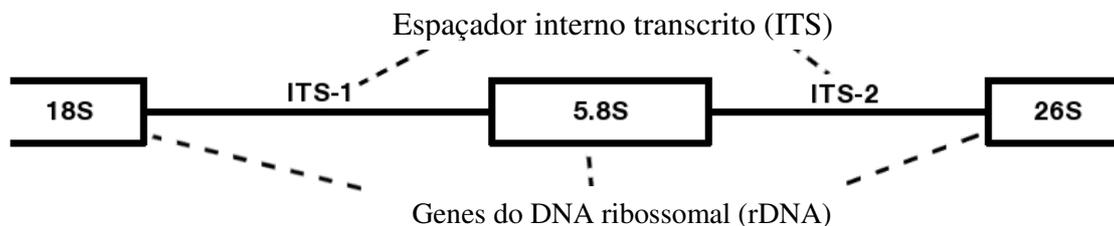
A análise sequencial dos genes COI e 16S tem permitido ir mais longe no conhecimento da variabilidade morfológica, assim como, nas relações entre espécies de diferentes grupos (Stothard *et al*,2002) (**Figura 9**).



**Figura 9** – Esquema do genoma do mtDNA e dos genes COI e 16S (Imagem adaptada de [www.nature.com/.../v414/n6865/full/414807a.html](http://www.nature.com/.../v414/n6865/full/414807a.html)).

### 1.5.2.2. DNA ribossomal

A região do espaçador ITS1 tem apresentado o maior comprimento (303-404 pares de bases) e maior variação na sequência de nucleotídeos que o espaçador ITS2 (80-89 pares de bases), sugerindo que a sequência do espaçador ITS1 pode ser usada para identificação de espécies. Regiões espaçadoras evoluem rapidamente e de forma diferenciada entre populações e podem ser usadas para diferenciar espécies ou populações de uma mesma espécie. Estas regiões vêm sendo sequenciadas em diversos organismos. Os operões de DNA ribossomal nos quais estão contidas as regiões ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S (Figura 10), têm sido utilizados em estudos taxonômicos envolvendo espécies de diferentes regiões geográficas as quais permitem a construção de filogenias (Vidigal *et al*, 2004), em estudos de variabilidade genética entre espécies muito próximas (Stothard *et al*, 1996) e na identificação de moluscos com importância médica e veterinária (Rollinson & Kane, 1991).



**Figura 10** – Esquema das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 (Imagem adaptada de [www.phytophthora-id.org/Protocol.htm](http://www.phytophthora-id.org/Protocol.htm)).

### 1.5.3. PCR - RFLP

A análise de polimorfismos usando enzimas de restrição (RFLP) pode ser aplicada a DNA ribossómico (rDNA) ou a outras regiões genómicas. O DNA é digerido por enzimas de restrição dando origem a fragmentos que podem ser separados por electroforese em gel de agarose, de acordo com o seu tamanho e visualizados por coloração com brometo de etídio (Videira, 2001).

A sensibilidade e a fiabilidade são características essenciais deste método já que envolve a detecção de alterações muito pequenas, em geral ao nível do gene que representa uma parcela mínima de DNA no genoma (Videira, 2001).

Esta técnica por ser uma técnica simples e rápida, representa um importante avanço na diferenciação molecular de espécies dentro do mesmo género, ou de espécies de áreas geográficas distintas (Vidigal *et al*, 1998 e 2000).

## **CAPÍTULO 2- Objetivos**

## 2. OBJECTIVOS

A alta variabilidade morfológica e genética, o tamanho reduzido de alguns espécimes e a similaridade interespecífica dificulta e torna, muitas vezes, difícil a correcta identificação das espécies.

Face a esta situação, técnicas moleculares começaram a ser utilizadas como ferramentas adicionais à identificação morfológica e anatómica para esclarecimento da correcta identificação.

No que refere á família Planorbidae, onde estão incluídas várias subfamílias, o recurso a estudos moleculares torna-se, em geral, absolutamente necessário, considerando que nelas se encontram hospedeiros intermediários de parasitas de humanos e animais, concretamente, na subfamília Helisomatinae, o género *Helisoma*. Este género, com provável origem na América do Norte, foi introduzido noutros Continentes. Assim, *Helisoma* sp. foi recentemente, colhido, na natureza, em colecções de água doce de Portugal Continental (Algarve e Coimbra), da Madeira e de Cabo Verde.

O objectivo geral da presente investigação foi fazer um estudo comparativo das populações de *Helisoma* de habitats portugueses e cabo verdianos, baseado num estudo molecular utilizando marcadores moleculares, nomeadamente o gene COI do DNA mitocondrial (mtDNA) e o gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) e a região interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal, e recorrendo á técnica PCR-RFLP, direccionada para a região ITS para a identificação de polimorfismos das amostras.

O objectivo específico foi procurar estabelecer a relação filogenética entre populações portuguesas e cabo verdianas de *Helisoma* e outros planorbídeos hospedeiros intermediários de tremátodes.

## **CAPÍTULO 3 – Material e Métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO DE MOLUSCOS

Os moluscos *Helisoma* sp. foram seleccionados aleatoriamente a partir de quatro colónias mantidas na Unidade de Helminologia e Malacologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UNL. Os moluscos que deram origem às colónias foram colhidos em Cabo Verde, Ilha da Madeira e em dois habitats de Portugal Continental, localizados em Coimbra e Algarve, respectivamente.

#### 3.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MOLUSCOS

A identificação morfológica dos moluscos foi baseada na comparação das características das conchas e anatomia dos órgãos reprodutivos e do tubo renal, de 15 exemplares, para cada um dos locais de colheita em estudo, com as características de espécies de *Helisoma* referidas por Malek & Cheng (1974) e Paraense (2003).

#### 3.3. DISSEÇÃO DE MOLUSCOS

Os moluscos foram previamente colocados numa solução anestésica (em sais de mentol), para relaxamento durante 4 a 6 horas e de seguida foram sacrificados através de choque térmico em água a 70°C. Um fragmento da região cefalopodal foi colocado em etanol a 70% e guardado a -70°C, até à análise molecular.

#### 3.4. EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO

A extracção genómica do DNA total foi feita de acordo com o protocolo descrito por Stothard *et al.* (1996), com as seguintes alterações: em tubos estéreis de 1,5 ml previamente identificados, colocou-se a zona cefalopodal do molusco, adicionou-se 700 µl de Tampão CTAB – (Cetyltrimethylammonium Bromide, Amnesco ®-C<sub>9</sub>H<sub>42</sub>NB<sub>r</sub>) que foi previamente aquecido na estufa a 65°C e por fim adicionou-se, nos mesmos tubos, 10 µL de Proteinase K. Com o auxílio de um homogeneizador, homogeneizou-se a mistura até todos os tecidos ficarem completamente dissolvidos no tampão. As amostras foram colocadas na estufa a 65°C, durante 90 minutos, com agitação de 20 em 20 minutos. Após os 90 minutos de incubação adicionaram-se 700 µl de Chloroform/Isoamylalchol (24:1), fez-se a agitação por inversão suave durante 2

minutos. Centrifugou-se rapidamente, para que houvesse separação da fase aquosa da fase orgânica. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur retirou-se a fase aquosa para novos tubos estéreis de 1,5 ml, adicionou-se 1 ml de etanol absoluto a 4°C e misturou-se por inversão. Centrifugou-se durante 15 minutos a 1600 rpm (Hermle Z 160H). Após a centrifugação o sobrenadante foi decantado e adicionaram-se 500 ml de etanol a 70%, para lavagem do “pellet” e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi decantado uma vez mais e retirado o excesso com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, os tubos foram colocados na estufa a 65°C num máximo de 10 minutos, para evaporação completa do etanol. Por fim, foram adicionados 50 µl de tampão TE (Tris EDTA, pH 7) e agitou-se o tubo até completa dissolução do “pellet”. Os produtos da extracção foram armazenados a -20°C.

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÓMICO

As amostras de DNA genómico dos moluscos foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0), contendo 8µl de Brometo de Etídio (0,5 µgml<sup>-1</sup>). A visualização de DNA fez-se no transluminador (AlphaImager ®HP, Alpha Innotech) com luz ultra-violeta (UV). A quantificação de DNA tem como finalidade verificar a integridade e qualidade das amostras. As amostras foram seleccionadas através das bandas obtidas num gel de agarose a 1%. Eliminaram-se todas as amostras que não apresentaram uma banda visível.

### 3.6. AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÓMICO

A amplificação do DNA genómico foi feita utilizando a PCR. As reacções de amplificação foram feitas através do Kit Illustra<sup>TM</sup>puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare).

O Kit Illustra<sup>TM</sup>puReTaq Ready-To-Go PCR “Beads” (GE Healthcare), é constituído por tubos de 0.2 ml que contém “Beads”, às quais foi adicionado, 2µl da amostra diluída, 1µl de Primer<sub>1</sub>, 1µl de Primer<sub>2</sub> e 21µl de H<sub>2</sub>O, para perfazer um volume total de 25µl.

Para as reacções de amplificação dos genes COI e 16S e da região ITS foram utilizados os oligonucleótidos descritos na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Sequências dos oligonucleótidos utilizados para a amplificação dos genes, COI, 16S e ITS.

Gene	Sequência do Oligonucleótido	Autores
COI 1 (Fwd)	5` - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3`	Folmer <i>et al.</i> , 1994
COI 2 (Rvs)	5` - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3`	
ITS 1 (Fwd)	5` - TGC TTA AGT TCA GCG GGT- 3`	Kane & Rollinson., 1994
ITS 2 (Rvs)	5` - TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A - 3`	
16S 1 (Fwd)	5` - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3`	Pip & Franck., 2008
16S 2 (Rvs)	5` - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T- 3`	

Para as mesmas reacções de amplificação foram aplicados os ciclos descritos na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Condições térmicas da PCR para os diferentes genes amplificados.

Gene	Etapas dos ciclos de amplificação	T°/h	N° Ciclos
<b>CO1</b>	Desnaturação inicial	95°C-5 min	1
	1ª Etapa	95°C-15 seg	37
	Extensão Interna	58°C-30 seg	
	2ª Etapa	72°C-90 seg	
	Extensão final	72°C-5 min	1
<b>16S</b>	Desnaturação inicial	95°C-5 min	1
	1ª Etapa	94°C-1 min	37
	Extensão Interna	50°C-1 min	
	2ª Etapa	72°C-2 min	
	Extensão final	72°C-5min	1
<b>ITS</b>	Desnaturação inicial	95°C-5 min	32
	1ª Etapa	95°C-45 seg	
	Extensão Interna	54°C-1 min	
	2ª Etapa	72°C-2 min	
	Extensão final	72°C-5min	1

### 3.7. APLICAÇÃO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA A ANÁLISE DE POLIMORFISMOS-PCR-RFLP.

Neste estudo utilizou-se apenas um tipo de enzima de restrição, fragmentando em locais específicos o DNA amplificado, da região ITS, conforme indica a seguinte **Tabela 7**:

**Tabela 7-** Enzima de restrição utilizada para o estudo da região ITS.

Enzima	Sequência	Local de clivagem
Alu I	5'-AGCT-3'	5'-AG↓CT-3'
	3'-TCGA-5'	3'-TC↓GA-5'

Num tubo esterilizado adicionaram-se 8,0 µl de produto amplificado, 0,1 µl da enzima, 1,0 µl do tampão (fornecido pela casa comercial), 1,0 µl de BSA (tampão) e 6,9 µl de água desionizada, perfazendo um volume final de 15 µl. Homogeneizou-se e fez-se uma centrifugação rápida. Incubou durante 4 horas a 37° C e, posteriormente, inactivou-se a actividade da enzima durante 20 minutos a 65°C.

Após a inactivação da enzima de restrição foi feita uma electroforese em gel de agarose a 2,5% em solução tampão TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,5 µgml<sup>-1</sup> de brometo de etídeo. A migração das moléculas de DNA foi avaliada por comparação com as de um marcador de tamanho molecular de 2000 pb (HyperLadder II, Bioline). As amostras foram preparadas com 5µl de produto da PCR submetido à acção da enzima de restrição ao qual foi adicionado 1µl de tampão (Azul de Bromofenol com glicerol). A migração foi feita a 100V, durante aproximadamente 60 minutos. Os fragmento de DNA foram visualizados após exposição a raios ultravioleta (Alphalmager®HP, Alpha Innotech).

### 3.8. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os produtos da PCR foram purificados usando colunas de purificação comercializadas pela Qiagen Inc (QIAquick PCR purification Kit protocol).

O processo de purificação das amostras foi feito segundo o protocolo descrito pela casa comercial, tendo-se obtido, como produto final, 50 µl de DNA concentrado e purificado. Os produtos da PCR amplificados e purificados foram enviados para serviços de sequenciação da empresa STAB VIDA (ITQB, Oeiras, Portugal).

As sequências nucleotídicas parciais obtidas, para os genes COI, 16S e ITS, foram analisadas através do programa Basic Local Alignment Search Tool” (Blast) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), permitindo desta forma a pesquisa de sequências semelhantes disponíveis nas bases de dados públicas, como a GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Os alinhamentos das sequências nucleotídicas dos produtos da PCR sequenciados foram efectuados usando o programa de alinhamento múltiplo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos manualmente.

### 3.9. ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS

As sequências obtidas, bem como as que se obtiveram em recurso ao GenBank foram alinhadas, com o apoio do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos manualmente, á posterior. Os estudos de interferência filogenética, foram realizados com o auxílio do programa Mega 3.1 (Kumar, *et al.* 2004), onde se calcularam as matrizes de distância genética, definidas pelo modelo dos dois parâmetros de Kimura e construídas as respectivas árvores pelo método de “neighbor joining” (junção de vizinhos), para cada um dos genes analisados. Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados por análise de “bootstrap” obtidos com 1000 réplicas aleatórias dos dados. A estimativa do número médio de diferença nucleotídica (K), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica (Hd) foram analisados de acordo com Nei (1987) em apoio do programa DNASP 4.10. (Rozas, *et al.*, 2003).

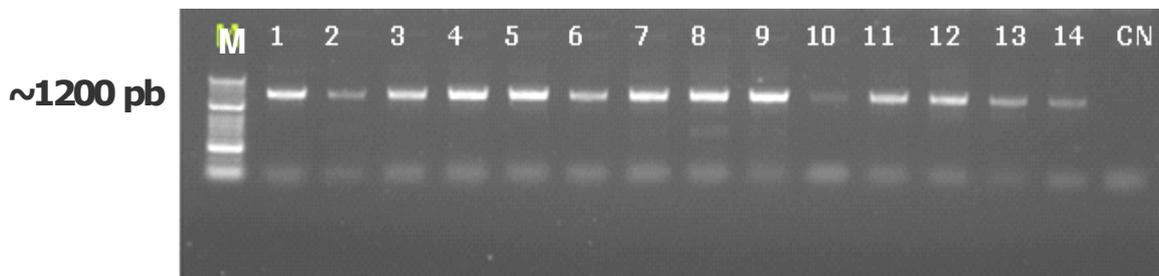
## **CAPÍTULO 4- Resultados**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Polimorfismos do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA)

#### 4.1.1. Diversidade Molecular

Os resultados, da análise de 30 exemplares de moluscos, de quatro áreas geográficas, (Algarve, n=8; Coimbra, n=8; Madeira, n=8 e Cabo Verde, n=6), mostraram em todas as amostras fragmentos com aproximadamente 1200 pb. A **Figura 11** mostra os produtos da PCR amplificados ao gene 16S para os moluscos das diferentes áreas.



**Figura 11** – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para o gene 16S. (1-14 moluscos das diferentes áreas geográficas).

As amostras para as quais a PCR ou a sequenciação não produziu resultados, foram retiradas do estudo. As médias das bases nucleotídicas apresentadas foram de 13,3 % para a citosina, 43,0 % para timina, 25,4% para a adenina e 18,4% para a guanina. A frequência A+T encontrada foi elevada, com 68,4%. A **Tabela 8** mostra a composição nucleotídica das amostras para cada área geográfica em estudo.

**Tabela 8** - Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o **gene 16S**.

	C%	T%	A%	G%
Algarve	14,71	41,54	26,47	17,28
Cabo Verde	10,29	45,17	25,00	19,54
Coimbra	14,71	41,18	26,47	17,65
Madeira	13,4	44,12	23,53	19,12
Média	13,3	43,0	25,4	18,4

#### 4.1.2. Distribuição e análise dos haplotipos

As sequências analisadas, ainda que parciais, apresentaram seis haplotipos distintos. O haplotipo 2 (**Hap2**) foi encontrado nos exemplares do Algarve e de Coimbra. Para além deste haplotipo, os exemplares de Algarve também apresentaram o haplotipo 6 (**Hap6**).

Os exemplares de Cabo Verde e Madeira apresentaram haplotipos distintos. O haplotipo 3 (**Hap3**) e o haplotipo 1 (**Hap1**) para Cabo Verde e o haplotipo 5 (**Hap5**) e o haplotipo 4 (**Hap4**) para a Madeira. As amostras mais monomórficas foram as de Coimbra por apresentarem apenas um haplotipo. A distribuição e frequência relativa dos haplotipos encontrados nas diferentes áreas geográficas analisadas estão descritas na **Tabela 9**.

**Tabela 9** - Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no **gene 16S** nos diferentes exemplares em estudo.

Algarve	Cabo Verde	Coimbra	Madeira
Hap2 (0,750)	Hap3 (0,875)		Hap5 (0,750)
		Hap2 (1,0)	
Hap6 (0,250)	Hap1 (0,125)		Hap4 (0,250)

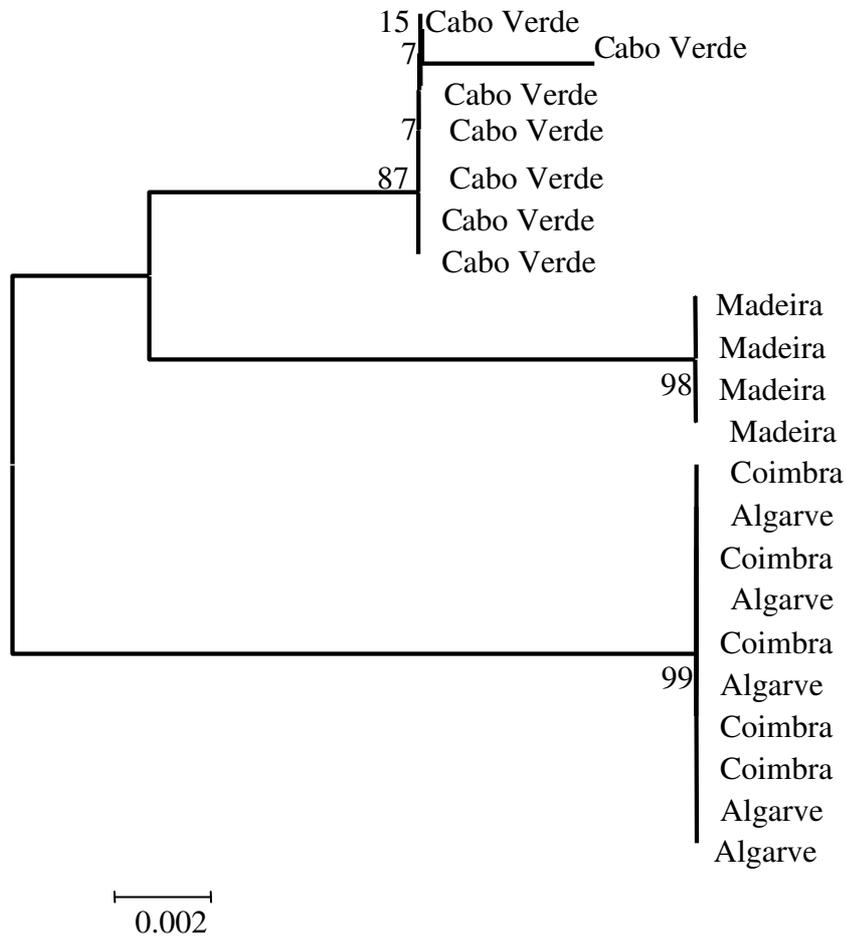
Na **Tabela 10** estão descritos os haplotipos encontrados nas diferentes áreas geográficas, o número médio de diferenças nucleótídicas (**K**), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica (**Hd**).

**Tabela 10.** – Índice de polimorfismos do **gene 16S**

	Haplotipos	<b>K</b>	$\pi$	<b>Hd</b>
<b>Algarve</b>	<b>Hap 2; Hap 6</b>	0,500	0,0014	0,500
<b>Cabo Verde</b>	<b>Hap3; Hap 1</b>	0,571	0,0016	0,2857
<b>Coimbra</b>	<b>Hap 2</b>	—	—	—
<b>Madeira</b>	<b>Hap 5; Hap 4</b>	1,000	0,0028	0,500
<b>Total</b>	<b>6 Haplotipos</b>	5,721	0,0159	0,7578

O cálculo da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para os exemplares das diferentes áreas geográficas em análise apresentou um baixo índice de polimorfismo  $\pi=0,0159$ . A diversidade haplotípica (**Hd**) foi de 0,7578 no seu conjunto, tendo Cabo Verde a menor diversidade haplotípica,  $Hd=0,2875$ .

Com base nas sequências parciais obtidas para o gene 16S do RNA ribossomal foi construída uma árvore pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros (**Figura 12**). A árvore obtida apresenta a formação de três ramos distintos. O primeiro ramo é formado pelos exemplares de Coimbra e Algarve, demonstrando uma relação de proximidade entre elas, apesar da sua distância geográfica. O segundo ramo é formado pelos exemplares da Madeira, suportado por um valor de “bootstrap” de 99%. Por fim, no terceiro ramo estão representadas os exemplares de Cabo Verde com um valor de “bootstrap” de 100%.



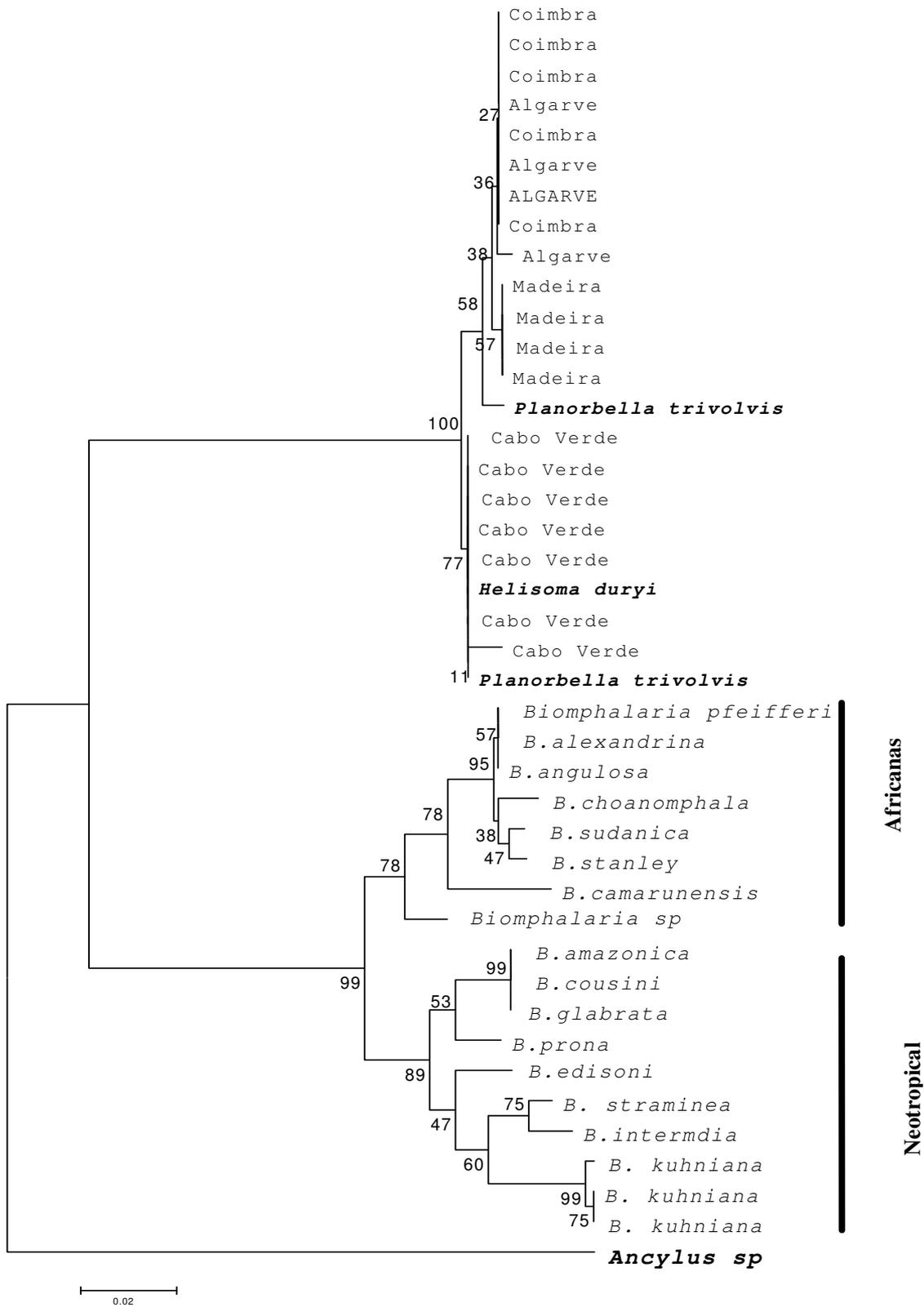
**Figura 12-** Relação entre as populações de moluscos, pela análise das sequências parciais do **gene 16S** através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confianças, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

### 4.1.3. Análise filogenética

A análise filogenética das sequências parciais dos exemplares em estudo obtidas para o gene 16S do RNA ribossomal (rRNA), foi realizada em conjunto com as sequências homólogas disponíveis no GenBank, através da construção de árvores pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros.

A análise demonstrou a formação de três ramos distintos (**Figura 13**). O primeiro ramo é formado pelo conjunto das espécies pertencentes ao gênero *Helisoma*, representativo das diferentes áreas geográficas em estudo. Associado a este ramo encontram-se as espécies *Helisoma duryi* e *Planorbella trivolvis*, suportado por um valor de “bootstrap” de 100%, formando um grupo parafilético.

O segundo ramo engloba os moluscos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, agrupado segundo as origem das espécies, destacando-se as espécies do velho continente ou Africanas (*B. pfeifferi*, *B. angulosa*, *B. choanomphala*, *B. camarunensis*, *B. sudanica* e *B. alexandrina*) e as espécies Neotropicais ou do novo mundo (*B. glabrata*, *B. amazonica*, *B. cousini*, *B. prona*, *B. edisoni*, *B. straminea* e *B. kuhniiana*), suportados por um elevado valor de “bootstrap” (99%). *Ancylus sp* funciona como um grupo externo para a árvore filogenética.



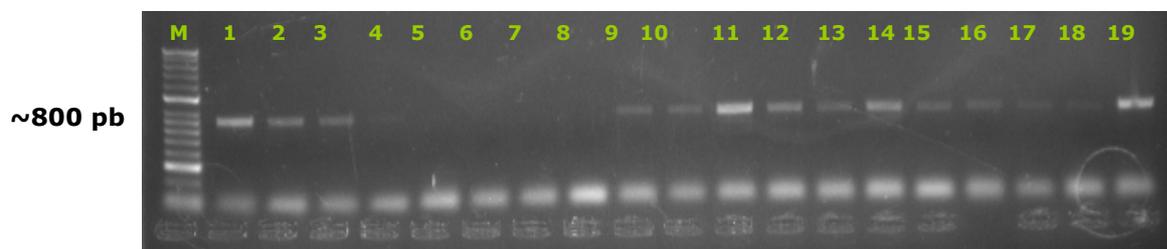
**Figura 13** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao género *Helisoma* das diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos,

hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros trematódes, inferidas pela análise das sequências parciais do **gene 16S** através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

## 4.2. Polimorfismos do gene COI do DNA mitocondrial (mtDNA)

### 4.2.1. Diversidade molecular

Os resultados, da análise de 30 exemplares de moluscos, de quatro áreas geográficas, (Algarve, n=8; Coimbra, n=8; Madeira, n=8 e Cabo Verde, n=6), mostraram em todas as amostras fragmentos com aproximadamente 800 pb. A **Figura 14** mostra os produtos da PCR amplificados ao gene COI para os moluscos das diferentes áreas.



**Figura 14.** – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para o **gene COI**. (1-19 algumas das amostras estudadas para diferentes áreas geográficas).

As amostras para as quais a PCR ou a sequenciação não produziu resultados, foram retiradas do estudo. As médias das bases nucleótídicas apresentadas foram de 12,9 % para a citosina, 43,6 % para timina, 20,85 % para a adenina e 22,57 % para a guanina. A frequência A+T encontrada foi elevada, com 64,45 %. A **Tabela 11** mostra a composição nucleótídica das amostras para cada área geográfica em estudo.

**Tabela 11.** Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o **gene COI**.

	C%	T%	A%	G%
Algarve	17,77	38,94	27,93	15,36
Cabo Verde	12,30	44,04	19,54	24,12
Coimbra	12,50	44,53	17,97	25,00
Madeira	9,38	46,88	17,97	25,78
Média	12,99	43,60	20,85	22,57

#### 4.2.2. Distribuição e análise dos haplotipos

As sequências analisadas, ainda que parciais, apresentaram 9 (nove) haplotipos distintos. Os exemplares do Algarve apresentaram 4 haplotipos distintos (**Hap1**, **Hap7**, **Hap8** e **Hap9**), enquanto que os de Cabo Verde apresentaram 3 haplotipos (**Hap2**, **Hap4** e **Hap6**). Os exemplares de Coimbra e da Madeira mostraram-se monomórficos por apresentarem um único haplotipo, o haplotipo 3 (**Hap3**) e o haplotipo 5 (**Hap5**), respectivamente. A distribuição e frequência relativa dos haplotipos encontrados nas diferentes áreas geográficas analisadas estão descritas na **Tabela 12**.

**Tabela 12** - Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no **gene COI** nos diferentes exemplares em estudo.

	Algarve	Cabo Verde	Coimbra	Madeira
<b>Hap1</b>	0,25			
<b>Hap2</b>		0,5		
<b>Hap3</b>			1,00	
<b>Hap4</b>		0,25		
<b>Hap5</b>				1,00
<b>Hap6</b>		0,25		
<b>Hap7</b>	0,25			
<b>Hap8</b>	0,25			
<b>Hap9</b>	0,25			

Na **Tabela 13**, estão descritos os haplotipos encontrados nas diferentes áreas geográficas, o número médio de diferenças nucleotídicas (K), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica (Hd).

**Tabela 13.** – Índice de polimorfismos do **gene COI**.

	Haplotipos	K	$\pi$	Hd
<b>Algarve</b>	Hap 1; Hap 7, Hap 8; Hap 9	6,450	0,124	1,000
<b>Cabo Verde</b>	Hap2; Hap 4, Hap 6	6,5	0,0125	0,83
<b>Coimbra</b>	Hap 3	—	—	—
<b>Madeira</b>	Hap 5;	—	—	—
<b>Total</b>	9 Haplotipos	32,77	0,0631	0,955

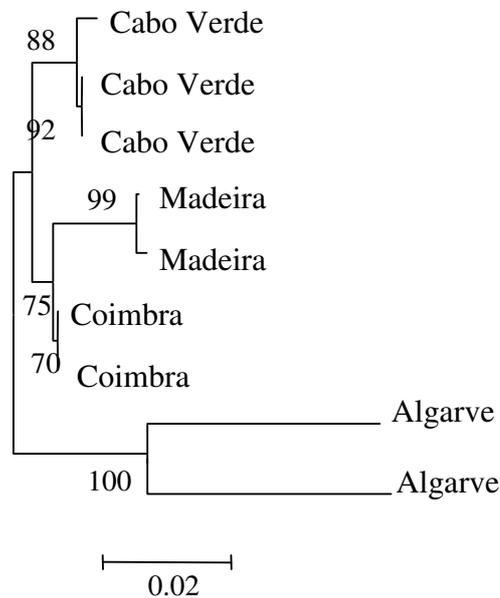
O cálculo da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para as amostras das diferentes áreas geográficas em uma análise apresentou um baixo índice de polimorfismo  $\pi=0,0631$ . A diversidade haplotípica (**Hd**) foi de 0,955 no seu conjunto, tendo Cabo Verde apresentado menor diversidade haplotípica Hd=0,83.

Após sequenciação, as amostras que se mostraram incongruentes foram retiradas do estudo. Como consequência o número de amostra ficou bastante reduzido. Contudo, com base nas sequências parciais obtidas foi construída uma árvore pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura.

A árvore obtida apresenta a formação de três ramos distintos. O primeiro ramo é formado pelos exemplares de Cabo Verde, demonstrando uma relação de proximidade entre eles. O segundo

ramo está dividido em dois sub-ramos formados pelos exemplares da Madeira suportado por um valor de “bootstrap” de 99% e pelos exemplares de Coimbra com um valor de “bootstrap” de 75%.

Por fim, no terceiro ramo estão representadas as populações de Algarve com um valor de “bootstrap” de 100%. Aqui, ao contrário dos resultados obtidos para o gene 16S, os resultados obtidos para o gene COI mostram que as populações do Algarve e Coimbra apresentam-se geneticamente mais distantes (**Figura 15**).



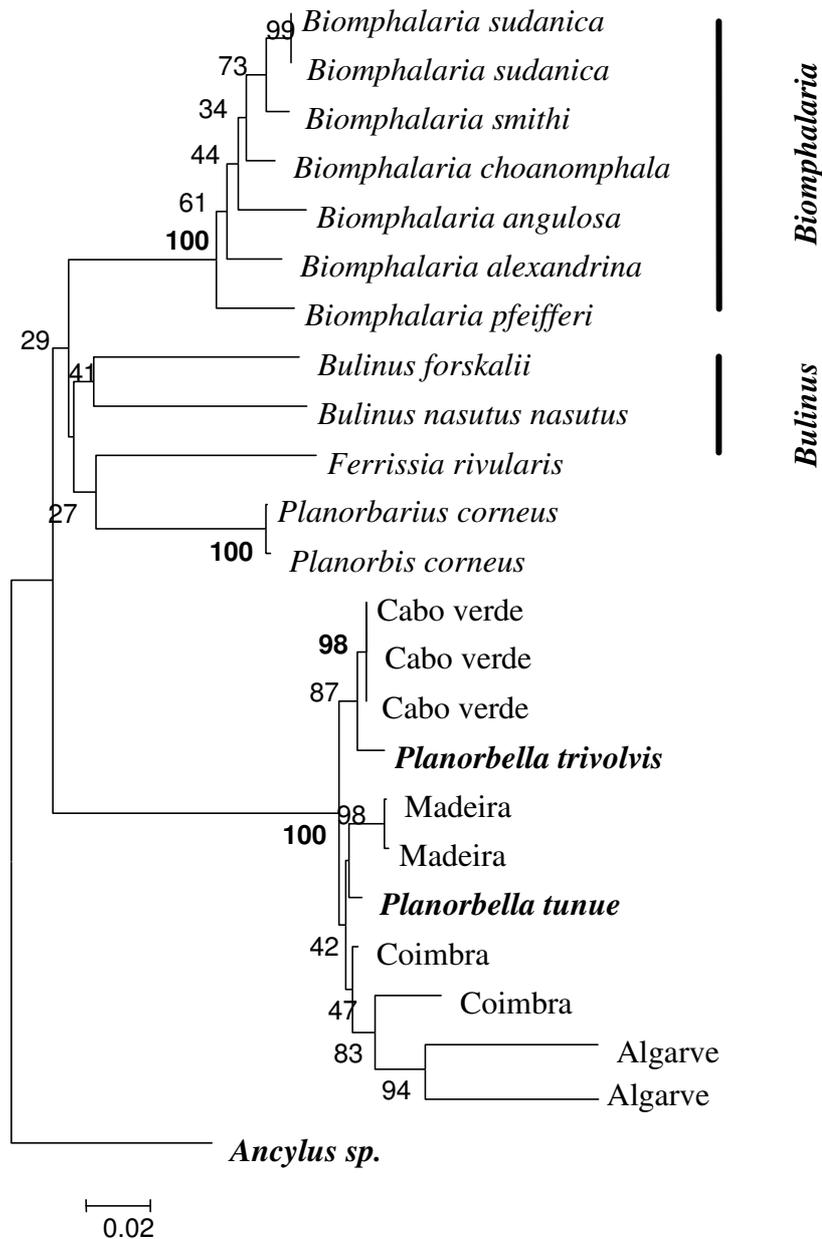
**Figura 15** - Relação entre as populações de moluscos, pela análise das sequências parciais do gene COI através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confianças, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

#### 4.2.3. Análise filogenética

A análise filogenética das sequências parciais das amostras em estudo obtidas para o gene COI do DNA mitocondrial (mtDNA), foi realizada em conjunto com as sequências homólogas disponíveis no GenBank, através da construção de árvores pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura.

A análise demonstrou a formação de dois ramos distintos (**Figura 16**). O primeiro ramo está dividido em dois sub-ramos. O primeiro é formado pelas espécies pertencentes ao género *Biomphalaria*, suportado por um valor de “bootstrap” de 100% e o segundo sub-ramo, formado pelas espécies pertencentes ao género *Bulinus*, ao qual também pertencem as espécies pertencentes ao género *Planorbis* (= *Planorbarius*) e uma outra espécie também ela hospedeira intermediária de *Schistosoma* sp., *Ferrissia rivularis*.

No segundo ramo está incluído o conjunto das espécies pertencentes ao género *Helisoma*, representativo das diferentes áreas. Associado a este ramo encontram-se as espécies *Planorbella trivolis* e *P. tunue*, suportado por um valor de “bootstrap” de 100%, formando um grupo parafilético. *Ancylus* sp funciona como um grupo externo para a árvore filogenética.



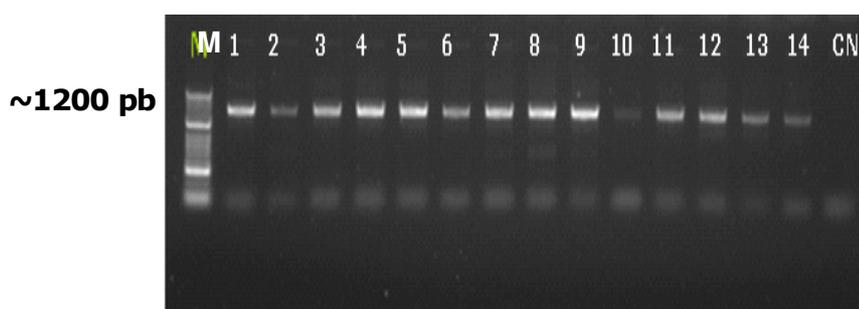
**Figura 16.** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao género *Helisoma* para as diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros trematódes, inferidas pela análise das sequências parciais do **gene COI** através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura-2 par. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

### 4.3. Polimorfismos da Região Interna Transcrita (ITS) do DNA ribossomal

#### 4.3.1. Diversidade molecular

Os resultados, da análise de 30 exemplares de moluscos, de quatro áreas geográficas, (Algarve, n=8; Coimbra, n=8; Madeira, n=8 e Cabo Verde, n=6), mostraram em todas as amostras fragmentos com aproximadamente 800 pb. A **Figura 17** mostra os produtos da PCR amplificados para a região ITS para os moluscos das diferentes áreas.

As amostras que não amplificaram foram retiradas do estudo. A composição nucleotídica das sequências foi de 29,35 % para citosina, 28,77 % para timina, 18,47 % para adenina e 23,41 % para guanina, com variação geográfica (**Tabela 14**). A frequência A+T encontrada foi elevada, com 47,24 %.



**Figura 17** – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos da PCR amplificados para a região ITS (1-14 - algumas das amostras estudadas para diferentes áreas geográficas).

**Tabela 14.** Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para a região ITS.

	C%	T%	A%	G%
Algarve	27,06	30,91	15,25	26,79
Cabo Verde	32,2	27,58	25,93	14,29
Coimbra	29,21	30,04	14,19	26,56
Madeira	28,94	26,56	18,5	26,01
Média	29,35	28,77	18,47	23,41

#### 4.3.2. Distribuição e análise dos haplotipos

As sequências analisadas, ainda que parciais, apresentaram 15 haplotipos distintos. Nos exemplares do Algarve foram identificados quatro haplotipos (**Hap1, Hap3, Hap7 e Hap14**) e nos exemplares de Coimbra identificaram-se seis haplotipos (**Hap2, Hap4, Hap5, Hap6, Hap8 e Hap15**).

Na Madeira e Cabo Verde foram identificados três haplotipos, **Hap11, Hap12 e Hap13** e **Hap8, Hap9 e Hap10**, respectivamente.

O haplotipo 8 (**Hap8**) foi o único haplotipo comum às amostras de Cabo Verde e Coimbra. A distribuição e frequência relativa dos haplótios encontrados nas diferentes áreas geográficas analisadas estão descritas na **Tabela 15**.

**Tabela 15** - Distribuição e frequências relativas dos haplótios identificados na região ITS nas diferentes áreas em estudo.

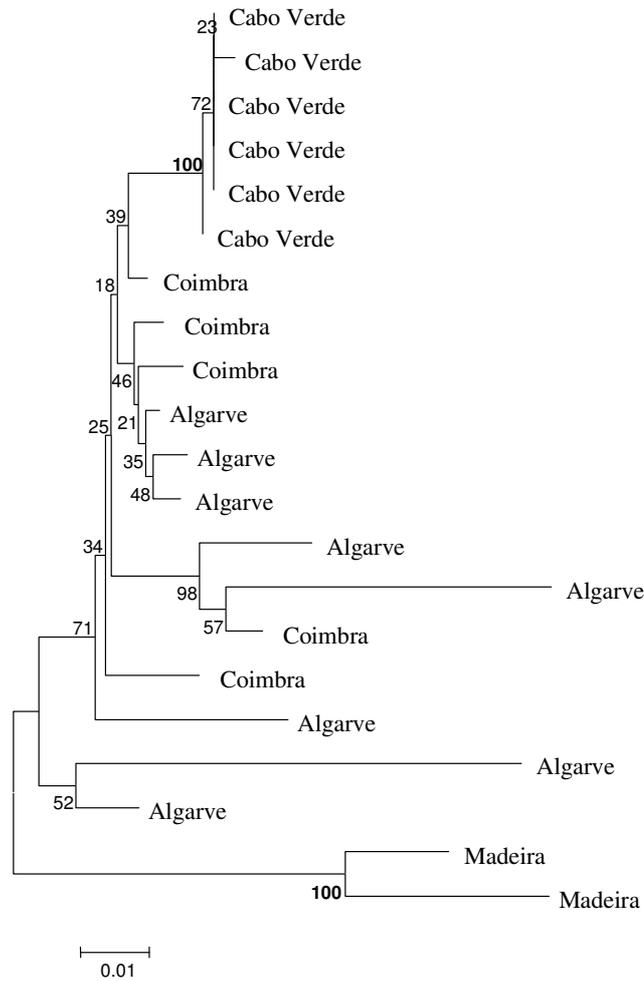
	Algarve	Cabo Verde	Coimbra	Madeira
<b>Hap1</b>	0,25			
<b>Hap2</b>			0,167	
<b>Hap3</b>	0,25			
<b>Hap4</b>			0,167	
<b>Hap5</b>			0,167	
<b>Hap6</b>			0,167	
<b>Hap7</b>	0,25			
<b>Hap8</b>		0,6	0,167	
<b>Hap9</b>		0,2		
<b>Hap10</b>		0,2		
<b>Hap11</b>				0,333
<b>Hap12</b>				0,333
<b>Hap13</b>				0,333
<b>Hap14</b>	0,25			
<b>Hap15</b>			0,167	

Na **Tabela 16**, estão descritos os haplótipos encontrados nas diferentes áreas geográficas, o número médio de diferenças nucleotídicas (K), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica (Hd). A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) na amostra total foi baixa ( $\pi=0,054$ ), sendo um grau de magnitude mais baixa para cada população individualmente. A Madeira apresentou o maior  $\pi$ , cerca do dobro do Algarve e Cabo Verde. A diversidade haplotípica (Hd) foi de 0,96 no seu conjunto, sendo Cabo Verde a população com menor diversidade haplotípica Hd=0,700.

**Tabela 16** – Índice de polimorfismos da região ITS

	Haplotipos	K	$\pi$	Hd
<b>Algarve</b>	Hap1; Hap3, Hap7; Hap14	26,833	0,038	1,000
<b>Cabo Verde</b>	Hap8; Hap9, Hap10	1,200	0,0017	0,700
<b>Coimbra</b>	Hap2; Hap4, Hap5; Hap6; Hap8; Hap15	15,130	0,0219	1,000
<b>Madeira</b>	Hap11; Hap12, Hap13	89,66	0,146	1,000
<b>Total</b>	15 Haplotipos	37,3	0,054	0,96

As sequências parciais obtidas para a região ITS, foram usadas para produzir uma árvore filogenética pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas através do modelo de dois parâmetros de Kimura. A árvore obtida, indica que os exemplares de Cabo Verde formam um único ramo mostrando uma baixa diversidade genética entre eles, enquanto que os exemplares da Madeira apresentam uma maior distância genética relativamente aos outros exemplares. As amostras do Algarve e de Coimbra apresentam uma distância genética mais baixa. (**Figura 18**).



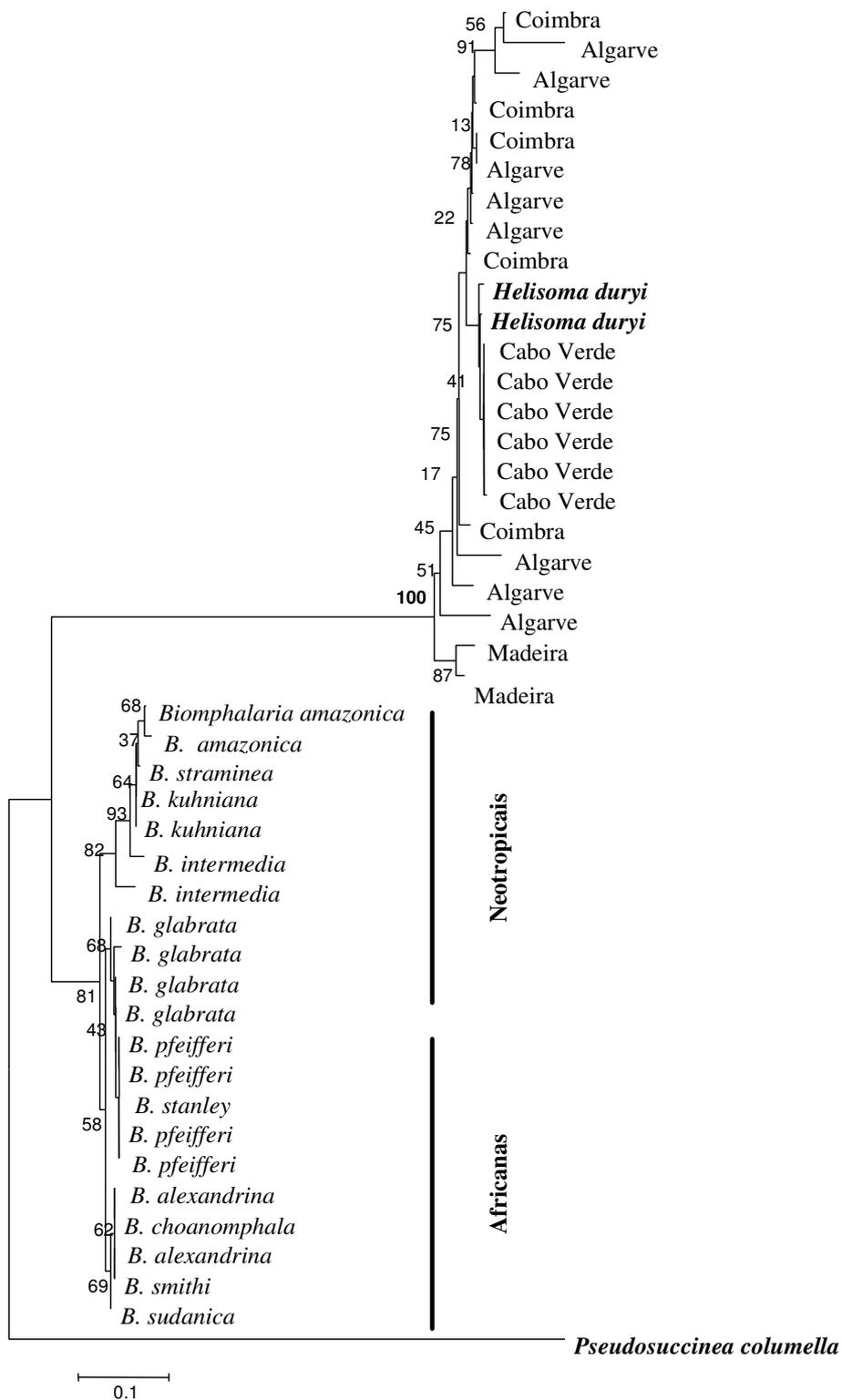
**Figura 18** - Análise filogenética das amostras de moluscos com base em sequências parciais da região ITS. Método de agrupamento de “neighbor joining”, com base nas distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, em percentagem, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

### 4.3.3. Análise filogenética

Obtiveram-se as sequências de DNA mais semelhantes às existentes no GenBank, através de uma pesquisa por BLAST. As espécies com sequências mais semelhantes foram dos gêneros *Helisoma*, *Planorbella* e *Biomphalaria*. Obteve-se uma sequência da espécie *Pseudosuccinea collumela* como grupo externo, para encontrar a raiz da árvore filogenética destas sequências produzida pelo método de junção de vizinhos (“neighbor joining”), tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros.

As sequências de espécies do gênero *Biomphalaria* formaram um grupo distinto e robusto, enquanto que as sequências obtidas neste estudo integraram um segundo grupo, também robusto com sequências da espécie *Helisoma duryi* (**Figura 19**), suportado por um valor de “bootstrap” de 100%.

O grupo do gênero *Biomphalaria*, é constituído por dois sub-grupos segundo as origem das espécies: um do velho continente ou Africanas (*B. pfeifferi*, *B. angulosa*, *B. choanomphala*, *B. camarunensis*, *B. sudanica* e *B. alexandrina*), e o outro com as espécies Neotropicais ou do novo mundo (*B. glabrata*, *B. amazonica*, *B. cousini*, *B. prona*, *B. edisoni*, *B. straminea* e *B. kuhniiana*), suportados por elevados valores de “bootstrap” (81%).

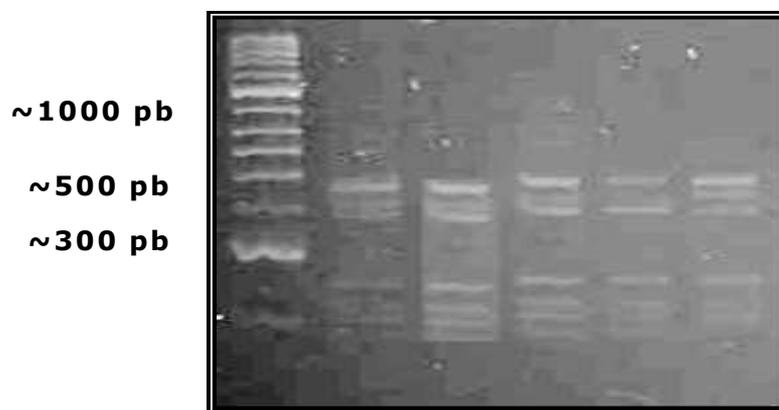


**Figura 19.** – Relação filogenética entre as várias populações de moluscos pertencentes ao género *Helisoma* para as diferentes áreas geografias em estudo e outras espécies de moluscos, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp e de outros trematódes, inferidas pela análise

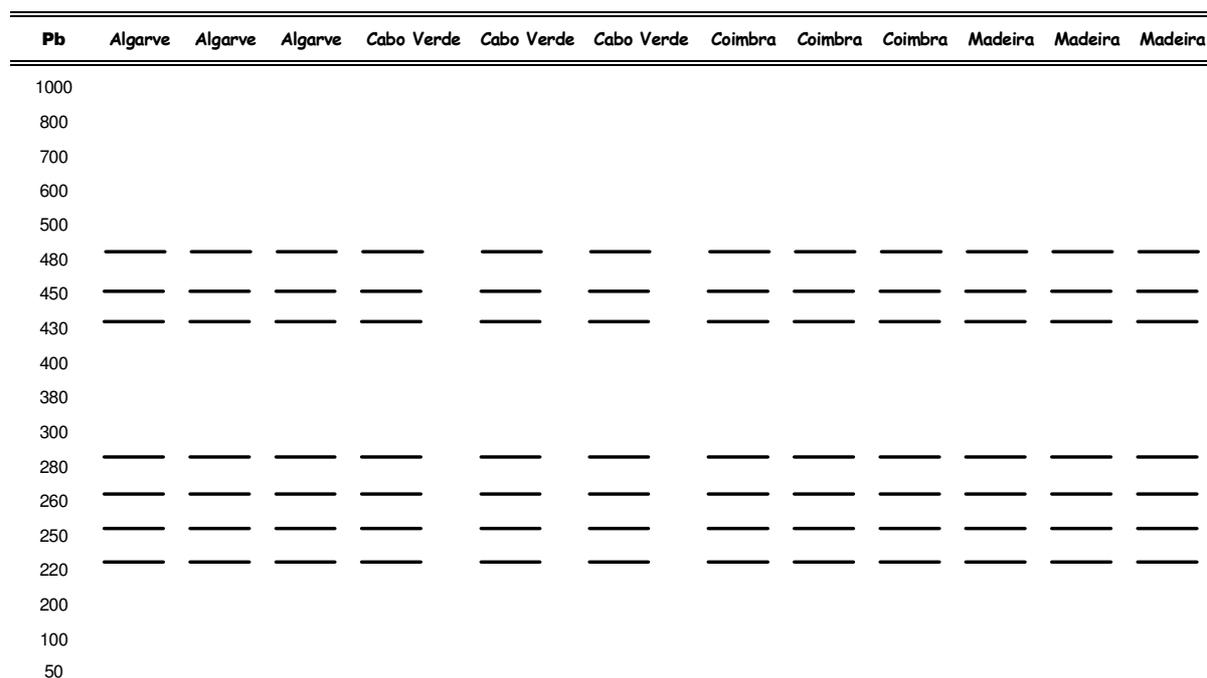
das sequências parciais da região ITS através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura-2 parâmetros. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

#### 4.4. Aplicação de enzimas de restrição à Região ITS

Após a aplicação de enzima *Alu I* foram obtidos padrões de digestão semelhantes em todas as amostras em estudo, que variaram entre 1000 e 300 pb. Na **Figura 20** pode-se observar o gel de agarose a 3% com algumas das amostras. Na **Figura 21** temos uma representação esquemática dos vários padrões.



**Figura 20** - Produtos de ITS após aplicação por PCR-RFLP seguido de digestão com *Alu* em gel de agarose a 3%.



**Figura 21** -. Diagrama representativo dos perfis obtidos por PCR-RFLP após digestão dos produtos amplificados da região ITS utilizando a enzima *Alu I*.

Os perfis das bandas visualizados, após electroforese em gel de agarose a 3%, que foram obtidos a partir da PCR\_RFLP demonstraram que as populações de moluscos das diferentes áreas geográficas não apresentaram diferenças entre si.

## **CAPÍTULO 5- Discussão e Conclusões**

## 5. DISCUSSÃO

Os moluscos de água doce desempenham um papel fundamental no ciclo de vida de tremátodes. Eles servem não só como fonte de alimento e um lugar de reprodução para estes parasitas, mas também como um meio de transporte, graças ao qual o parasita pode chegar ao seu próximo hospedeiro (Lockyer *et al.* 2004). A singularidade da relação entre estes organismos, deriva de que a maioria das 18.000 espécies conhecidas de tremátodes têm os moluscos como o seu primeiro hospedeiro intermediário obrigatório (Littlewood & Bray, 2001).

As pesquisas que têm vindo a ser desenvolvidas ao longo dos tempos por malacologistas e parasitologistas têm possibilitado um melhor conhecimento sobre a relação tremátode-molusco, a sua especificidade e a resposta do seu sistema de defesa ou a manipulação do parasita, e por outro lado permitindo que a evolução dos dois grupos de seres vivos possa ser melhor compreendida (Zbikowska & Nowak, 2009).

Com o presente trabalho pretendeu-se iniciar a caracterização molecular de gastrópodes de água doce introduzidos em diferentes áreas geográficas: Portugal Continental, Madeira e de Cabo Verde e cujo papel como hospedeiros intermediários de tremátodes tem sido pouco explorado.

Com base nas características morfológicas e anatómicas concluiu-se que os exemplares em estudo pertencem ao género *Helisoma* Swainson, 1840. O primeiro registo em Portugal deste género de moluscos foi feito nos anos oitenta do século passado, por Grácio (1981), que pôs a hipótese da sua introdução ser recente.

O género *Helisoma*, cuja distribuição geográfica primitiva está associada à região Neoártica (América do Norte), tem sido descrito em outras regiões do globo, em que as suas espécies foram introduzidas por aquaristas, nomeadamente no Brasil (Paraense, 1975, 1976 e 2003), nas Caraíbas (Pointier, 2001) e no continente africano (Brown, 1994). Mais recentemente, foi descrito o aparecimento da espécie *Helisoma duryi*, a sul do Delta do Nilo (Lofty *et al.*, 2005).

A espécie, *Helisoma trivolvis* Say, 1817, descrita como espécie refractária natural à infecção por *S. mansoni* (Ayvazian & Mallet 1986 *cit* Reeves *et al.*, 2008), mas hospedeiro intermediário de echinostomatídeos, é usada em laboratório como hospedeiro de nemátodes do género *Angiostrongylus* (Malek, 1980 e Ponder & Fried, 2004). Por outro lado, a espécie *H. duryi*

Wetherby, 1879 mostrou ser, em condições laboratoriais, um competidor biológico da *Biomphalaria pfefferi*, (Fransden, 1979).

O presente trabalho permitiu apresentar as primeiras sequências, ainda que parciais, para os genes COI e 16S do ADN mitocondrial, assim como para a região ITS do ADN ribossomal, de moluscos provenientes de várias áreas geográficas Portugal Continental, Madeira e Cabo Verde e, paralelamente, estudar as suas relações filogenéticas com outras espécies pertencentes à mesma família (Planorbidae).

Para os dois genes mitocondriais (16S e COI) em estudo, foi observada uma proporção maior para o par Timina - Adenina (T+A), com 68,4% e 64,55%, respectivamente, enquanto que para o par Guanina – Citosina (G+C) as percentagens foram de 38,7% e 45,66%, respectivamente. Esta parece ser uma característica dos genes mitocondriais de algumas espécies de invertebrados (Davis *et al*, 1996 cit por Stothard *et al*, 2002).

Por outro lado, para a região ITS foi encontrada uma maior proporção para o par Guanina – Citocina (T+C) do que para o par Timina – Adenina, com 52,76% e 47,24 %, respectivamente.

Neste estudo foram identificados seis haplotipos para o gene 16S, nove haplotipos para o gene COI e 15 haplotipos para a região ITS. Os moluscos provenientes da região do Algarve foram os que mostraram ser mais polimórficos para o gene COI e ITS, com três e quatro haplotipos, respectivamente. Por outro lado, os exemplares de Coimbra apresentaram apenas um haplotipo para o gene COI e 16S, respectivamente. O gene 16S foi o que apresentou o menor número de haplotipos, num total de seis para todas as amostras de cada uma das populações em estudo, mostrando ser assim, mais conservado do que os outros dois genes.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos em outros estudos sobre variabilidade genética entre populações de *B. glabrata*, onde foi verificado um grande polimorfismo entre as populações mantidas em condições laboratoriais, sugerindo que uma manutenção prolongada das espécies em laboratório pode favorecer o aparecimento de polimorfismos (Mulvey & Vrijenhoek, 1981).

A diversidade haplotípica é um índice que reflecte a probabilidade de dois haplotipos escolhidos ao acaso numa população serem diferentes, enquanto que a diversidade nucleotídica reflecte a probabilidade de dois nucleótidos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes numa população (Nei & Li, 1979). Nenhum dos genes apresentou uma elevada diversidade nucleotídica.

A média da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) encontrada para o gene 16S foi 0,0159, para o gene COI foi 0,0631 e para a região ITS foi 0,054.

Observou-se um haplotipo comum para o gene 16S, o haplotipo dois (Hap 2) que foi encontrado nos exemplares do Algarve, de Coimbra e da Madeira. Para a região ITS, o haplotipo oito (Hap 8) foi comum nos exemplares de Cabo Verde e de Coimbra. Para o gene COI não foi observado nenhum gene comum entre as populações estudadas. Esta característica poderá estar relacionada com o facto do gene 16S ser mais conservado e apresentar uma menor diversidade nucleotídica. Já o gene COI apresentou-se mais variável, o que pode ser explicado por acumulação de mutações sem a influência de recombinação ou conversão génica.

A estrutura populacional dos moluscos Planorbidae caracteriza-se por uma alta variabilidade genética interpopulacional e baixa variabilidade intrapopulacional, devido à ausência ou baixo fluxo génico entre as populações (Jarne & Dalay, 1991). O tipo de reprodução característico deste planorbídeos, a autofecundação, leva a um aumento da homozigotia, e portanto a menor diversidade, a não ser quando as condições ambientais são desfavoráveis (Paraense, 1955 *cit por* Campos *et al*, 2002). Neste caso, os moluscos de água doce hermafroditas constituem um modelo biológico relevante no estudo evolutivo do sistema reprodutivo, devido ao facto de na mesma espécie poderem ocorrer dois tipos de reprodução: autofecundação e fecundação cruzada (Angers *et al*, 2003 e Charbonnel *et al*, 2002 e 2005).

Nas árvores filogenéticas construídas com base nas distâncias genéticas calculadas para o gene 16S, os exemplares de Cabo Verde e Madeira formaram dois grupos robustos, com um suporte estatístico bastante alto (87% e 98%), e um terceiro grupo formado pelos exemplares de Coimbra e Algarve, com um suporte estatístico de 99%, estes bastante homogéneos apesar da distância geográfica entre eles. Para os restantes dois genes, COI e ITS, formaram-se os mesmos grupos, com um alto apoio de bootstrap, mostrando a solidez dos resultados.

Nas últimas décadas, a análise de sequências de ADN dos marcadores moleculares 16S e COI, tem permitido resolver algumas questões relacionadas com as relações filogenéticas entre os moluscos e a sua evolução (Remigio & Herbert, 2003 e Albrecht *et al*, 2006).

Os genes 16S e COI do ADN mitocondrial, assim como, a região ITS do ARN ribossomal analisados no presente estudo, parecem, por isso, ser úteis para descobrir as relações filogenéticas e sistemática dos moluscos em estudo, pertencentes ao género *Helisoma* e outras espécies de outros

gêneros e áreas geográficas distintas, os quais desempenham um importante papel na transmissão de *Schistosoma* sp. e de outros tremátodes.

Apesar destas regiões genômicas serem apropriadas para estudos filogenéticos, não foi possível determinar com exactidão a espécie a que pertencem os moluscos aqui estudados, o que se ficou a dever ao reduzido número de sequências homólogas, disponíveis na base de dados para o género *Helisoma*. Apenas se pôde observar que as amostras em estudo, apresentam um elevado grau de homologia (“bootstrap” de 100%) com as espécies *Helisoma duryi* e *Planorbella trivolvis*, formando um único ramo.

As espécies do género *Biomphalaria* formaram dois grupos distintos, o grupo africano e o grupo neotropical, o que está de acordo com outros estudos realizados para o mesmo marcador genético (Dejong *et al*, 2001, Morgan *et al*, 2002 e Jørgensen *et al*, 2004). Resultados idênticos foram observados quer para o gene COI, quer para a região ITS, em que a formação de grupos distintos, mostra uma elevada homologia entre as amostras em estudo e espécies pertencentes ao género *Helisoma*, com um valor estatístico significativo de 100%, quer para o gene 16S quer para a região ITS.

A técnica de PCR-RFLP tem vindo a ser amplamente utilizada no estudo de moluscos pertencentes ao género *Biomphalaria*, quer para a identificação de subespécies (Caldeira *et al*, 2000), quer na identificação de espécies (Vidigal *et al*, 1998, 2002, 2004 e Carvalho *et al*, 2001). Esta técnica também tem sido utilizada na diferenciação de moluscos pertencentes ao género *Bulinus* (Stothard *et al*, 1996 e 1997) e para distinguir subespécies dentro do género *Oncomelania huppens* (Hape & Macmanus, 1994).

Contudo, neste estudo, não houve diferenciação entre as amostras para as diferentes áreas geográficas. Provavelmente, estes resultados estarão relacionados com a enzima aplicada na digestão enzimática. Estudos anteriores que visavam a diferenciação intraespecífica, verificaram que após a digestão com *AluI*, tinham sido produzidos polimorfismos intraespecíficos, mas restrições interespecíficas indicando que esta enzima não é suficiente para a diferenciação entre espécies (Vidigal *et al*, 2002). Os nossos resultados parecem corroborar os resultados obtidos por estes autores

Como conclusões gerais temos:

- 1.- Os moluscos em estudo foram identificados como pertencentes ao género *Helisoma* baseado nas suas características morfológicas;
- 2.- Devido ao número insuficiente de amostras e de registos bibliográficos não foi possível proceder-se à identificação a nível de espécie dos moluscos;
- 3.- O presente estudo contribuiu para a caracterização molecular de moluscos pertencentes ao género *Helisoma* colhidos em Portugal Continental, Madeira e Cabo Verde;
- 4.- Os genes 16S, COI e a região ITS sugerem isolamento entre as populações de Cabo Verde e da Madeira;
- 5.- As amostras de Coimbra e Algarve apesar da distância geográfica que separa cada uma das populações, apresentaram-se como um único grupo para os três genes em análise;
- 6.- Apesar do número insuficiente de sequências homólogas disponíveis na base de dados para o género *Helisoma*, os genes em estudo, permitiram a sua reconstrução filogenética, contribuindo assim para um melhor esclarecimento das relações filogenéticas deste género com outras espécies homólogas, pertencentes à mesma família;
- 7.- A técnica de PCR-RFLP é uma técnica simples e robusta. Em futuros estudos deverá ser usado um grupo mais alargado de enzimas para tentar identificar variação intraespecífica e intrapopulacional;
- 8.- Em futuros estudos será necessário obter não só um maior número de exemplares, como também alargar a pesquisa malacológica a outras áreas geográficas;
- 9.- Em futuros trabalhos que envolvam este género, a aplicação de outros marcadores moleculares e a utilização de “primers” desenhados especificamente para cada um dos genes alvo, irá permitir um melhor conhecimento deste género e esclarecer qual a sua posição na vasta família Planorbidae.

## **Referências Bibliográficas**

ABOUL-ELA, I. A. & KHALIL, M.T. 1987. The chronic toxicity of three pollutants upon the freshwater snail *Helisoma trivolvis*. *Proceedings of the Zoological Society A. R. Egypt*, **13**:17-29.

ARTHUR, J.W.; WEST, C.W.; ALLEN, K.N. & HEDTKE, S.F. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **38**:324-331.

ANGERS, B., CHARBONNEL, N., GALTIER, N. & JARNE, P., 2003. The influence of demography, population structure and diversity in the selfing freshwater snail *Biomphalaria*. *Genet. Res.*, **81** (3): 193-204.

ALBRECHT, C., KUHN, K. & STREIT, B., 2006. A molecular phylogeny of Planorboidea (Gastropoda:Pulmonata); insights from enhanced taxon sampling. *Zoologia Scripta*, **36** (1): 27-39.

AYVAZIAN, S. G. AND J. C. MALLET. 1986. Resistance of *Helisoma trivolvis* from the Dominican Republic to infection by the tremátode *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* **72**: 785-786

AZEVEDO, J. F. & MEDEIROS, L. C. M., 1954. A identificação do *Planorbarius metidjensis*, Forbes, do Algarve pela morfologia dos órgãos genitais e rádula, sua comparação com os mesmos elementos de *Planorbis corneus*. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*., **XI** (2): 231-240.

AZEVEDO, J.F., SILVA, J.B., COITO, A.M., COELHO, M.F. & COLAÇO, A., 1948. O foco português de schistosomiasis. *Anais. do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **5**:175-222.

BETTENCOURT, A. & BORGES, I., 1922. Le *Planorbis metidjensis*, hôte intermédiaire du *Schistosoma haematobium* au Portugal. Confirmation expérimentale. *Arq. Inst. Bact. Câmara Pestana*. Tomo **IV**: 133-135.

BROWN, D., 1994. *Freshwater snails of Africa and their Medical Importance*. 2nd Edition, Taylor & Francis, London, 456 págs.

CAMARGO, J.A. & A. ALONSO. 2007. Contaminação por nitrogênio inorgânico em los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, **16**: 1-13.

CALDEIRA RL, VIDIGAL THDA, MATINELLA L, SIMPSON AJG, CARVALHO OS 2000. Identification of Planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **9** (1): 171-177.

CAMPOS, Y.R., CARVALHO, O. S., GOVEIA, C. O. & ROMANHA, A. J., 2002. Genetic variability of the main intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda:Planorbidae) assessed by SSR-PCR, *Acta Tropica* **83** (1): 19-27.

CARVALHO, O. S., CALDEIRA, R. L., SIMPSON, A.J.G. & VIDIGAL, T.H.D.A., 2001. Genetic variability and molecular identification of brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca:Planorbidae). *Parasitology*, **123** (Suppl.1):197-207

CHARBONNEL, N., RASATAVONJIZAY, R., SELLIN, E., BREMONS,P. & JARNE, P., 2005. The influence of genetic factors and population dynamics on the matting system of the hermaphroditic freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*. *Oikos*, **108** (2): 283-296.

COLE, A. G.; MASHKOURNIA, A.; PARRIES, S. C. & GOLBERG, J. 2002. Regulation of early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis*. *Journal of Experimental Biology*, **205**: 3143-3152.

COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E., 2007. A *Célula Uma Abordagem Molecular*, 3ª edição "Artmed": 112-117.

DAVIS, G. M., WILKE, T., SPOLSKY, C., QIU, C. P., QIU, D.C., XIA, M. M., ZHANG, Y. & ROSEMBERG, G., 1998. Cytochrome oxidase 1-based phylogenetic relationships among Pomatiopsidae, Hydrobidae; Rissoidae and truncatellidae (Gastropoda:Caenogastropoda:Rissoacea). *Malacologia*, **40**: 251-266.

DEJONG, R.J., MORGAN, J.A.T., PARAENSE, W.L., POINTIER, J.P., AMARISTIA, M., AUEK-KUMI, P.F.K., BABIKER, A., BARBOSA, C.S., BRÉMOND, P., CANENSE, A.P., PEREIRA DE SOUZA, C., DOMINGUEZ, C., FILE, S., GUTIERREZ, A., INCANI, R.N., KAWANO, T., KAZIBWE, F., KPIKPI, J., LWAMBO, N.J.S., MIMPFUODI, R., NJIOKOU, F., PODA, J.N., SENE, M., MKOJI, G. & LOKER, E.S., 2001. 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.

FRANÇA, C, 1923. Observation sur la bilhariose a *Shistosoma haematobium* IV – Sur hôte invertebré du *Shistosoma* au Portugal et considerations sur les Planorbides. *J. Sci. Math. Phys. Nat.* Lisboa, **4**: 163-180

FRANDBSEN, F., 1979. Discussion of the relationships between *Schistosoma* and their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatibility and evaluation of schistosome taxonomy. *Parasitol Research* **58**: 275-296.

FRANDBSEN, F. & MADSEN, H., 1979. A review of *Helisoma duryi* in biological control. *Acta Tropica*, **36**: 67-84.

FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit-1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and biotechnology*, **3** (5):294-299.

GRÁCIO, M.A.A., 1981. A importância da malacologia em parasitologia médica com breve nota sobre os Gastropoda de água doce em Portugal. *Sep. Jornal da Soc. Ciências Médicas*, **CXLV** (2): 119-140.

GRÁCIO, M.A.A., 1982. A malacologia e a medicina tropical sua importância real e potencial em Portugal e distribuição geográfica dos gastropodas de água doce em alguns dos seus destritos. *Sep. de "O Médico"*, **102**: 828-836.

GRÁCIO, M.A.A., 1983. Distribution and habitats of six species of freshwater pulmonate snails in Algarve, Southern Portugal. *Malacological Review*, **16** (1/2): 17-23.

GOLBERG, J.; DORAN, S.; SHARTAU, R.; PON, J.; ALI, D.; TAM, R. & KUANG, S. 2008. Integrative biology of an embryonic respiratory behaviour in pond snails: the 'embryo stir-bar hypothesis'. *Journal of Experimental Biology*, **211**: 1729-1736.

GOW, J.L., NOBLE, L.R., ROLLINSON, D., MIMPFOUNDI, R. & JONES, C.S., 2004. Breeding system and demography shape population genetic structure across ecological and climatic zones in the African freshwater snail *Bulinus forskalli* (Gastropoda:Pulmonata) intermediate host for schistosomes, *Molecular Ecology*, **13** (11): 3561-3573.

HOPE M, & MCMANUS, D.P., 1994. Genetic variations in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Tropica*, **57**(1): 75-82.

IBIKOUNLÉ, M., MASSOUGBODJI, A., SAKITI, N. G., POINTIER J. P., & MONÉ, H. 2007. Anatomic characters for easy identification between *Biomphalaria pfeifferi*, *Helisoma duryi* and *Indoplanorbis exustus* during field surveys. *Journal of Cell and Animal Biology*, **2**: 112-117.

JARNE, P. & DELAY, B., 1991. Population genetics of freshwater snails. *Trends in Ecology & Evolution*, **6** (12): 383-386.

JIMÉNEZ, C., SPIJKER, S., DE SCHIPPER, S., LODDER, J.C., JANSE, C.K., GERAERTS, W.P.M.; MINNEM, J.V.; SYED, N.I.; BURLINGAME, A.L.; SMIT, A.B., & LI, K. 2006. Peptidomics of a single identified neuron reveals diversity of multiple neuropeptides with convergent actions on cellular excitability. *Journal of Neuroscience*, **26**: 518- 529.

JÓRGENSEN, A., KRISTENSEN, K. & STOTHARD, R., 2004. An investigation of the “Ancyloplanorbidae” (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**:778-787.

KNAAP, W.P.W. & LOKER, E.S., 1990. Immune mechanisms in Trematode-Snail Interactions. *Parasitology Today*, 6 (6): 175-182

KANE, A. & ROLLINSON, D., 1994. Reptitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Mol. Biol. Parasit.*, **63** (1): 153-156.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. & ALMEIDA, L. 1985. Karyotype and nucleolar organizer regions of *Helisoma duryi* (Wetherby, 1897). *Revista Brasileira de Genética*, **8**: 285-290.

KECHEMIR N. & COMBES, C., 1988. Up to what point are cercariogenesis and sporocystogenesis reversible in schistosomes *J. Helminthology*, **62** (3) 261-264.

KLOOS, H. & DAVIS, R., 2002. The Paleoepidemiology of Schistosomiasis in Ancient Egypt. *Human Ecology Review*, **9** (1): 14-25.

LITTLEWOOD, D.T.J. & BRAY, R.A., 2001. *Interrelationships of Platyhelminthes*. CRC, New York, 365 pag.

LOCKYER, A.E., JONES, C.S., NOBLE, L.R. & ROLLINSON, D., 2004. Trematodes and snails: an intimate association. *Canadian Journal of Zoology*, **82** (2): 251.

LOFTY, W.M., DEJONG, R.J., ABDEL KADER, A. & LOKER, E.S., 2005. A molecular survey of *Biomphalaria* in Egypt: is *B. glabrata* present? *Am J Trop Med Hyg*, **73**: 131-139.

KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, N., 2004 MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**:150-163.

MADSEN, H., 1983. Distribution of *Helisoma duryi*, na introduced competitor for intermediate host of schistosomiasis, in na irrigation scheme in northern Tanzania. *Acta Tropica*, **40**: 298-306.

MALEK, E. A.. & CHENG, T. C., 1974. *Medical and Economic Malacology*. Academic PRESS, New York: pag.383.

MALEK, E.A., 1980. *Snail-transmitted parasitic diseases*. Volume I, CRC Press: pag. 334.

MEDEIROS, L. & SIMOES, M., 1985. Contribuição para o estudo dos Gastropoda de água doce de Portugal. II- Morfologia e revisão sistemática de *Planorbarius metidjensis* (Forbes, 1838). *Garcia de Orta, Ser.Zool.*, **12** (1-2): 23-30.

MORGAN, J.A.T., DEJONG, R.J., JUNG, Y., KHALLAAYOUNE, K., KOCK, S., MKOJI, G.M., & LOKER, E.S., 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution, of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenet. Evol.*, **25**(3): 477-488.

MULVEY, M. & VRIJENHOEK, C.R., 1981. Genetic variation, among laboratory strains of the planorbid snails *Biomphalaria glabrata*. *Biochemical Genet.*, **19** (1): 169-182.

NEI, M. & LI, W. S., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. of Nat. Acad. Of Sciences of USA*, **76**:5269-5273.

NOBRE, A., 1941. Fauna malacológica de Portugal-moluscos terrestres e fluviais. *Mem. Estudos do Museu Zool. Univ. Coimbra*. **124**: 278 págs.

PARAENSE, W. L., 1955. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53 (.2):277-284.

PARAENSE, W.L., 1975. Estado actual da sistemática dos planorbídios brasileiros. *Arq Mus Nac Rio de Janeiro* 55: 105-128.

PARAENSE, W. L., 1976. A natural population of *Helisoma duryi* in Brazil. *Malacologia*, 15: 369-376.

PARAENSE, W. 2003. A Birds Eye Survey of Central American Planorbid Molluscs, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Canadian Journal of Zoology* **98**(1): 51-67,

PIP, E. & FRANCK, J.P.C., 2008. Molecular phylogenetics of Central Canadian Physidae (Pulmonata: Basommatophora), *Canadian Journal of Zoology*, **86**: 10-16.

POINTIER, J. 2001. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French West Indies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 67-74.

PONDER, E. L. & B. FRIED. 2004. Effects of snail size and diet on encystment of *Echinostoma caproni* cercariae in juvenile *Helisoma trivolvis* (Colorado strain) and observations on the survival of infected snails. *Journal of Parasitology* **90**: 422-424.

RAMAJO-MARTIN, V. & SIMON-VICENTE, F., 1988. Variaciones estacionales de *Planorbarius metidjensis* en un arroyo de corriente temporal e infeccion de los moluscos por *Schistosoma bovis*. *Ver. Iber. Parasitol.*, **48** (4): 379-386.

REMIGIO, E. A. & HERBER, P.D., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Mol. Phylog. and Evolution* , 29: 641-647.

- REEVES, W. K., DILLON, R T, & . DASCH G. A, 2008. Freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) from the Commonwealth of Dominica with a discussion of their roles in the transmission of parasites, *Amer. Malac. Bull.* **24**: 59-63
- ROLLINSON, D. & KANE, R., 1991. Restriction enzyme of DNA from species of *Bulinus* (Basommatophora:Planorbidae) using a cloned Ribosomal RNA gene probe. *J. Moll. Studies*, **57** (1): 93-98,
- ROZAS, J, SANCHEZ-DELBARRIO, J.C., MESSEGUER, X. & ROZAS, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphismanalyses by the coalescent and other methods *.Bioinformatics*, **19** (1): 2496-2497.
- SERRANO, J. L.& GARCIA-LOBO, J. M., 1992. *Manual de genética molecular*. Editorial Sintesis, A.A., Madrid, 277 págs.
- SOUTHGATE, V. R., WRIGHT, C. A., LAAZIRI, H. M. & KNOWLES, R. J., 1984. Is a *Planorbarius metidjensis* compatible with *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. *Bull. Soc. Path. Ext.*, **77** (3): 499-506.
- STOTHARD, J.R., HUGHES, S. & ROLLINSON, D., 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snails hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae). *Acta Tropica*, **61** (1):19-29.
- STOTHARD, J.R., MGENI, A. F., ALAWI, K. S., SAVIOLI, L. & ROLLINSON, D., 1997. Observation on shell morphology, enzymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *Bulinus africanus* group snails (Gastropoda:Planorbidae) in Zanzibar. *J. Moll. Studies.*, **63** (4): 489-503.
- STOTHARD, J. R., LLEWELLYN-.HUGHES, J., GRIFFIN, C. E., HUBBARD, S.J., KRISTENSEN, T. K. & ROLLINSON, D., 2002 . Identification of snails within the *Bulinus* group from East Africa by Multiplex SNaPshot TM analysis of single nucleotide polymorfisms within the Cytochrome Oxidase Subunit I. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (suppl.):31-36.

TCHOUNWOU, P.B.; ENGLANDE, A.J. & MALEK, EA. 1991. Toxicity evaluation of Bayluscide and malathion to three developmental stages of freshwater snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**: 351- 358.

THOMPSON J. D, HIGGINS D. G. & GIBSON T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **11** (22): 4673-4680.

TOUASSEM, R. & JOURDANE, J., 1986. Étude de la compatibilité de *Schistosoma bovis* du Soudan et D'espagne vis-a-vis de *Bulinus truncatus* de Tunisie et *Planorbarius metidjensis* du Maroc. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **61** (1): 43-54.

VAVOULIS, D.; STRAUB, V.; KEMENES, I.; KEMENES, G.; FENG, J. & BENJAMIN, P. 2007. Dynamic control of a central pattern generator circuit: a computational model of the snail feeding network. *European. Journal of Neuroscience*, **25**: 2805-2818.

VIDEIRA, A., 2001. *Engenharia Genética, Princípios e Aplicações.*, **IX**: 94-96

VIDIGAL, T.HDA, SPATZ, L., NUNES, D.N., SIMPSON, A.J.G., CARVALHO, O.S. & DIAS NETO, E., 1998. *Biomphalaria* spp: identification of intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by Polymerase Chain reaction Amplification and Restriction Enzyme Digestion of the Ribosomal RNA Gene Intergenic Spacer. *Experimental Parasitology*, **89** (1): 180-187.

VIDIGAL, T.H.D.A., CALDEIRA, R.L., SIMPSON, A.J.G., & CARVALHO, O.S., 2000. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **95** (1): 57-66.

VIDIGAL, T.HDA., MONTRESSOR, L.C., SIMPSON, A.J.C., & CARVALHO, O.M., 2002. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase I used for differentiation Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (1): 47-52

VIDIGAL, T.HDA., SPATZ, L., KISSINGER, J., REDONDO, R.AF., PIRES, E.CR., SIMPSON, A.JG. & CARVALHO, O.S., 2004. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer sequences of Ribosoma DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca:Planorbidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (2):153-158.

YACOUBI, B.; ZEKHININI, A., MOUKRIN, A., & RONDELAUD, D., 1999. *Schistosoma haematobium*: comparative studies on the characteristics of infection in three populations of *Planorbarius metidjensis* from Agadir , province in South Marocco. *Parasitology Research*, **85** (3): 239-242.

ZEKHNINI, A., YACOUBI, B., MOUKRIN, A. & RONDELAUD, D., 1997. *Schistosoma haematobium*: comparative studies on prevalence and cercarial shedding according to the shell diameter of *Planorbarius metidjensis* at miracidial exposure. *Parasitology Research*, **83** (3): 303-305.

ZBIKOWSKA, E. & NOWAL, A., 2009. One hundred years of research on the natural infection of freshwater snails by tremátode larvae in Europe. *Parasitol. Res* **105** (1):301-311.