

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudos ecológicos e moleculares dos hospedeiros
intermediários *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus*
truncatus de Portugal



Ribeira de Boina-Algarve

Maria Manuela Palmeiro Calado
Lisboa 2008

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Estudos ecológicos e moleculares dos hospedeiros
intermediários *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus*
truncatus de Portugal

Maria Manuela Palmeiro Calado

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor no
Ramo das Ciências Biomédicas, Especialidade de
Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Lisboa 2008

ORIENTADORA

Professora Doutora Maria Amélia Grácio
Prof^a Catedrática da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas

CO-ORIENTADOR

DR. David Rollinson
Museu de História Natural de Londres

COMISSÃO TUTORIAL

Professora Doutora Maria Amélia Grácio
Prof^a Catedrática da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas

DR. David Rollinson
Museu de História Natural de Londres

Professor Doutor Francisco Antunes
Prof. Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa

*“De facto não fracassei ao tentar cerca de 10.000 vezes, desenvolver um acumulador.
Simplesmente, encontrei 10.000 maneiras que não funcionam.”*

Thomas A. Edison.

Dedico

À Sara
Ao João
Ao Fernando

A meus pais

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Directora da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço por me ter ensinado a conhecer e a descobrir esta grandiosa área do saber que é a Malacologia. Agradeço-lhe também, a orientação da tese e todo o empenho que pôs, desde a primeira hora até à sua concretização. O meu reconhecimento também pela leitura crítica e rigorosa do manuscrito e pelas condições que me proporcionou para a preparação do mesmo.

Ao Dr. David Rollinson, meu co-orientador, o meu agradecimento pela disponibilidade que sempre me mostrou aquando das minhas deslocações ao Museu de História Natural de Londres, no âmbito da minha tese e nas orientações definidas para o plano de trabalhos.

Ao Richard Kane vai o meu agradecimento muito especial pelo tempo que disponibilizou durante os trabalhos de laboratório aquando das minhas deslocações ao Museu de História Natural de Londres.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira, da Unidade de Virologia o meu agradecimento muito especial pelo empenho e prontidão que demonstrou na tentativa de solucionar o que parecia não ter solução.

Ao Professor Doutor Celso Cunha, Director da Unidade de Biologia Molecular um agradecimento muito especial pela sua disponibilidade nos esclarecimentos das dúvidas que foram surgindo no decurso deste trabalho e também pelas facilidades logísticas e de equipamento que me foram cedidas para a realização de uma parte prática deste trabalho.

Também quero agradecer ao Professor Doutor Pedro Cravo a sua disponibilidade no esclarecimento de algumas dúvidas que surgiram durante a análise de dados.

Ao Dr. João Pinto e à Dr.^a Sofia Cortes um agradecimento pelo tempo perdido na explicação sobre o funcionamento dos programas de análise de dados.

Ao Professor Doutor António Grácio, Director da Unidade de Entomologia Médica, um agradecimento por ter disponibilizado os meios técnicos que permitiram a obtenção de algumas das fotografias apresentadas neste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, da Unidade de Entomologia Médica, o meu agradecimento pelas explicações prestadas na análise de alguns dos dados apresentados nesta tese.

Agradecimentos

À Professora Doutora Luzia Gonçalves, da Unidade de Epidemiologia e Bioestatística do IHMT, pelo valioso contributo que deu na análise estatística dos dados apresentados nesta tese.

À Dr.^a Ana Paula Martins, responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica, do Hospital de Santa Cruz e à sua equipa técnica o meu agradecimento pelo apoio técnico e logístico disponibilizado na obtenção dos cortes histológicos.

À Mestre Helga Guimarães, um especial obrigado, pela colaboração prestada durante a realização deste trabalho.

À Doutora Susana Baptista um obrigado pelo apoio prestado na análise dos dados, disponibilizando os seus conhecimentos na área dos Sistemas de Informação Geográfica.

Às minhas colegas de Unidade, Professora Doutora Silvana Belo, Investigadora Alcione Trinca o meu obrigado especial pelo apoio dado nos momentos de abatimento e de menor fulgor, dando animo para seguir em frente.

À Técnica principal Isabel Clemente, pela ajuda proporcionada sempre que foi o caso e de grande estima.

Ao Mestre Pedro Ferreira, um agradecimento pelo apoio técnico na execução das fotografias.

Ao Sr. Luís Marto, um obrigado pelo apoio técnico prestado na execução das fotografias.

Ao casal Cabrita Gonçalves, um agradecimento muito especial, por todo o apoio prestado durante as deslocações ao Algarve para a realização do trabalho de campo.

Por último e não menos importante, uma palavra muito especial aos meus filhos, Sara e João pelas horas que não passamos juntos, e a Fernando, pela força e confiança que sempre me demonstrou. A meus pais, que sem eles nada disto era possível o meu muito Obrigado.

E todos os que de uma forma directa ou indirecta contribuíram para que este trabalho fosse uma realidade o meu muito obrigada.

APOIOS FINANCEIROS:

- do Projecto POCTI/ESP/42532/2001, financiado pela fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – Responsável científico: Prof^a Doutora Maria Amélia Grácio.
- da Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UPMM/IHMT) – Unidade de Financiamento plurianual da FCT.
- do “Natural History Museum de Londres” – estágios por concurso internacional, no Centro de Referência da OMS para a identificação e caracterização de moluscos hospedeiros intermediários de agentes patogénicos - “Wolfson Wellcome Biomedical Laboratories” - Responsável Doutor David Rollinson.



Índice Geral

Lista de Abreviaturas	xii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
Resumo	1
Summary	4
Objectivos	7
Capítulo 1- Introdução Geral	
1. Breves dados históricos sobre os moluscos	11
2. Moluscos hospedeiros intermediários com importância em Medicina	12
2.1. Generalidades sobre a classe Gastropoda	12
2.2. Taxonomia da classe Gastropoda	13
3. Considerações gerais sobre <i>Planorbarius metidjensis</i> (Forbes, 1838) e <i>Bulinus truncatus</i> (Audouin, 1827) de Portugal	14
3.1. Classificação taxonómica de <i>Planorbarius metidjensis</i>	14
3.2. Características morfológicas de <i>P. metidjensis</i>	14
3.2.1. Estrutura da concha	14
3.2.2. Características da rádula	16
3.3. Importância de <i>Planorbarius metidjensis</i> em Medicina	17
3.4. Considerações gerais sobre <i>Bulinus truncatus</i>	17
3.4.1. Classificação taxonómica de <i>B. truncatus</i>	17
3.4.2. Distribuição geográfica e características gerais	18
3.4.3. Importância de <i>Bulinus truncatus</i> em Medicina	20
4. Distribuição geográfica de <i>P. metidjensis</i> e <i>B. truncatus</i>	20
4.1. No mundo	20
4.2. Em Portugal	20
5. A schistosomose	21
5.1. A schistosomose no mundo	21
5.2. A schistosomose em Portugal: breve retrospectiva histórica	21
6. Ciclo de transmissão de <i>Schistosoma</i> spp	23
7. Relação Parasita/Molusco	25

7.1. Interação <i>Schistosoma</i> spp/Molusco.....	25
7.2. Breves referências à teoria da co-evolução	26
7.3. Compatibilidade Parasita-Molusco.....	28
7.4. A especificidade do hospedeiro e a infecção	29
7.5. Sobrevivência e longevidade dos moluscos	31
8. Estratégias moleculares aplicadas ao estudo de moluscos.....	32
8.1. Caracterização genética	33
8.2. Marcadores moleculares	33
8.2.1. ADN mitocondrial	34
8.2.2. RAPD (Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN)	35
8.2.3. Operões do ARN ribossomal	36
Capítulo 2. Distribuição geográfica e caracterização dos habitats de	
<i>Planorbarius metidjensis</i> de Portugal	
2.1. Introdução	38
2.2. Material e Métodos	39
2.3. Resultados	41
2.3.1. Distribuição geográfica e identificação dos habitats	41
2.3.2. Caracterização dos habitats	45
2.3.2.1. Natureza do habitat	45
2.3.2.2. Tipos físicos dos habitats	48
2.3.2.3. Carácter do habitat	50
2.3.3. Aspectos bio-ecológicos dos habitats	51
2.4. Discussão e conclusões	56
Capítulo 3. Características morfométricas e a sua variação na população de	
moluscos de água doce <i>Planorbarius metidjensis</i> de Portugal	
3.1. Introdução	61
3.2. Matéria e métodos	62
3.3. Resultados	64
3.3.1. Caracterização e variabilidade das populações de <i>Planorbarius</i> <i>metidjensis</i> com base nas características morfométricas da concha	64
3.3.2. Dinâmica da população de <i>Planorbarius metidjensis</i>	74
3.3.2.1. População de moluscos estudada	74
3.3.2.2. Período de observações	75
3.3.2.3. O desenvolvimento dos moluscos	78
3.4. – Discussão e conclusões	85

Capítulo 4 – Infecção experimental de *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus truncatus* por *Schistosoma* spp

4.1. Introdução	90
4.2. Material e Métodos.....	91
4.3. Resultados.....	93
4.3.1. Infecção natural.....	93
4.3.2. Infecção experimental	95
4.3.2.1. Infecção experimental com <i>S. haematobium</i>	95
4.3.2.2. Infecção experimental com <i>S. mansoni</i>	96
4.4. Discussão e conclusões.....	99

Capítulo 5. Caracterização molecular de *Planorbarius metidjensis* de Portugal

5.1. Introdução	104
5.2. Material e Métodos	105
5.3. Resultados.....	111
5.3.1. Polimorfismos do gene COI do ADN mitocondrial.....	111
5.3.1.1. Diversidade molecular	111
5.3.1.2. Distribuição e análise dos haplotipos.....	112
5.3.1.3. Diferenciação genética.....	114
5.3.2. Polimorfismo do gene do ARN ribossomal (rDNA) 16S.....	115
5.3.2.1. Diversidade molecular.....	115
5.3.2.2. Distribuição e análise dos haplotipos.....	117
5.3.2.3. Diferenciação genética.....	119
5.3.4. Variabilidade entre as populações de <i>Planorbarius metidjensis</i>	120
5.3.4.1. Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN (RAPD)	120
5.3.4.2. Caracterização da diversidade genética.....	121
5.3.4.3. Identidade e distância genéticas entre as populações de <i>P. metidjensis</i>	124
5.3.4.4. Correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica.....	127
5.4. Análise filogenética	127
5.5. Discussão e conclusões.....	132

Capítulo 6. Contribuição para a caracterização molecular de *Bulinus truncatus* de Portugal

6.1. Introdução.....	141
6.2. Material e Métodos.....	142
6.3. Resultados	148
6.3.1. Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN (RAPD)	148
6.3.1.1. Variabilidade genética entre as populações de <i>B. truncatus</i>	148
6.3.1.2. Similaridade genética intrapopulacional.....	149
6.3.1.3. Caracterização da variabilidade genética.....	151
6.3.2. Diversidade molecular de <i>Bulinus truncatus</i>	152
6.3.2.1. Polimorfismos do gene COI do ADN mitocondrial.....	152
6.3.2.2. Variabilidade nucleotídica.....	152
6.3.2.3. Distribuição e análise dos haplotipos.....	153
6.3.3. Polimorfismo da Região Interna Transcrita (ITS) do ADN ribossomal.....	157
6.3.3.1. Variabilidade nucleotídica.....	157
6.3.3.2. Distribuição e análise dos haplotipos.....	158
6.3.4. Análise filogenética.....	162
6.4. Discussão e conclusões.....	166
Conclusões Finais	173
Referências Bibliográficas	176
Anexos.....	193

Lista de Abreviaturas

l	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribossomal
C	Citosina
COI	Cytochrome Oxidase subunit 1 (Oxídase Citocrómica subunidade 1)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
G	Guanina
GPS	Global Position System
HI	Hospedeiro intermediário
ITS	Internal transcribed spacer (Região Interna Transcrita)
μ	Micro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Poplymerase Chain reaction (Reacção de Polimerização em Cadeia)
rADN	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
rDNA	“ribosomal Deoxyribonucleic acid” (Ácido Desoxirribonucleico ribossomal)
RAPD	Randon Amplified Polymerase DNA (Ampliação Aleatória de Polimorfismos de ADN)
SNP	“Single nucleotide polymorphic” (Polimorfismo de nucleótido simples)
T	Timina
TAE	Tampão Tris, ácido Acético e EDTA
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UPGMA	Método da média aritmética não ponderada

Índice das Figuras

Figura 1.1. -	Concha de <i>Planorbarius metidjensis</i>	15
Figura 1.2. -	Rádula de <i>P. metidjensis</i> .	16
Figura 1.3. -	<i>Bulinus truncatus</i> .	19
Figura 1.4. -	Ciclo de transmissão de <i>Schistosoma</i> spp	24
Figura 2.1. -	Distribuição geográfica dos habitats de <i>P. metidjensis</i> .	41
Figura 2.2. -	Número de habitats identificados e a sua distribuição nos diferentes distritos.	42
Figura 2.3. -	Número de moluscos colhidos em cada um dos nos nove distritos estudados	43
Figura 2.4. -	Natureza dos habitats. A - Ribeira de Valverde (tipo natural). B - Ribeira do Escoural – (tipo misto); C - Tanque (tipo antrópico) Monte Novo.	46
Figura 2.5. -	Número e percentagem de habitats estudados e sua natureza.	47
Figura 2.6. -	Número de moluscos colectados e natureza dos habitats.	47
Figura 2.7. -	Tipo físico dos habitats. A – Ribeira (Ribeira de Valverde); B - Pequeno caudal de água (Alqueva); C – Charco (Alcáçovas); D –Poça (Souselas); E - Tanque (Grândola); F – Canal de irrigação (Binanciate).	49
Figura 2.8. -	Carácter dos diferentes habitats. A – habitat de carácter temporário; B – Habitat de carácter permanente	50
Figura 2.9. -	Distribuição dos moluscos segundo o carácter e nº de habitats.	51
Figura 2.10. -	Número de habitats e os diferentes tipos de substrato.	54
Figura 2.11. -	Habitats e número de moluscos colhidos com base na exposição solar,	55
Figura 2.12. -	Variação do número de moluscos com a precipitação durante os quatro trimestres (Dados obtidos no Instituto do Ambiente (1961-1990).	56
Figura 3.1. -	Concha de <i>P. metidjensis</i> com alguns dos parâmetros morfométricos	63
Figura 3.2. -	Variabilidade das dimensões da concha de <i>P. metidjensis</i> nos diferentes distritos entre cada um dos parâmetros estudados	67
Figura 3.3. -	Variabilidade das dimensões da concha de <i>P. metidjensis</i> na relação entre cada um dos parâmetros estudados.	67
Figura 3.4. -	Dendrograma* de dissimilaridade pelo método da distância média entre grupos, baseado na distância Euclidiana entre variação dos parâmetros morfométricos segundo os distritos.	69
Figura 3.5. -	Dendrograma da variação dos parâmetros morfométricos das regiões, pelo método da distância média entre grupos, baseado na distância Euclidiana.	71
Figura 3.6. -	Dendrograma da variação dos parâmetros morfométricos segundo o tipo de habitats, pelo método da distância média entre grupos baseado na distância Euclidiana.	73
Figura 3.7. -	Total de moluscos colhidos por distrito durante 2001 a 2005.	75
Figura 3.8. -	Número de moluscos colhidos por habitat nos anos de 2001 a 2005 (n=1557).	75
Figura 3.9. -	Distribuição do diâmetro maior (A) e do diâmetro menor (B) das conchas de <i>P. metidjensis</i> por classes, nos habitats estudados.	79
Figura 3.10. -	Variação dos diâmetros menor (Dm) e maior (DM) em função do trimestre.	81
Figura 3.11. -	Variação dos diâmetros menor (Dm) e maior (DM) nos diferentes habitats. 1-Rib. Boia; 2-Rib. Escoural; 3-Rib. Seco-Estói; 4- Rib. Valverde	81
Figura 3.12. -	Amplitude da variação do diâmetro maior (DM) da concha de <i>P. metidjensis</i> nos quatro habitats estudados durante o trimestre	82
Figura 3.13. -	Correlação entre o diâmetro maior e o diâmetro menor da concha de <i>P. metidjensis</i> nos quatro habitats estudados.	83
Figura 3.14. -	Dendrograma da distância euclidiana obtido pelo método da média entre grupos para os quatro habitats	84
Figura 4.1.	Infecção natural de <i>P. metidjensis</i>	93
Figura 4.2. -	Xifidiocercária obtida através da infecção natural de <i>P. metidjensis</i> A – Estilete B – Ventosa oral C – Ventosa ventral D – Cauda (Ampliaçãoo 100X).	94
Figura 4.3. -	Cortes Histológicos do tentáculo e bordo do manto de <i>P. metidjensis</i> (100X).	95
Figura 4.4. -	<i>P. metidjensis</i> infectados com 8 miracídeos de <i>S. mansoni</i> .	97
Figura 4.5. -	Cortes histológicos da zona cefolopodal de <i>P. metidjensis</i> infectados com <i>S.</i>	

	<i>mansoni</i> . (Ampliação 100X).	98
Figura 5.1. -	Visualização do gel de agarose a 1dos produtos de PCR do gene COI para os 13 habitats estudados. M- marcador molecular	111
Figura 5.2. -	Dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostrando as relações entre os nove haplotipos do gene COI. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1000 replicações usando o modelo “Kimura 2 parâmetros”.	114
Figura 5.3. -	Dendrograma obtido com base no Coeficiente de divergência génica de Nei, G_{st} (1973).	115
Figura 5.4. -	Visualização do gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene 16S.	116
Figura 5.5. -	Dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostrando as relações entre os nove haplotipos do gene COI. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1000 replicações usando o modelo “Kimura 2 parâmetro	118
Figura 5.6 -	Dendrograma obtido com base no Coeficiente de divergência génica de Nei, G_{st} (1973) para os distritos em análise.	119
Figura 5.7 -	Gel de agarose a 1% mostrando os perfis de RAPD de <i>P. metidjensis</i> de diferentes habitats usando os oligonucleótidos 1 (P1) M – marcador molecular; 1- Sabugal. 2- Rebolosa; 3- Cassurões; 4- Ribeira de Eiras; 5- Ribeira de Souselas; 6- Santiago do Cacém; 7- Sesimbra; 8- Vale de Lobos (Sintra); 9- Alvito; 10- Mourão; 11-Ribeira do Pincho; 12- Penilhos; 13- Ribeira de Monchique; 14- Portalegre; 15-Ribeira de Estói; 16- Ribeira de Boina; 17- Ribeira de Valverde; 18- Ribeira de Escoural.;19-Rib. S. Paulo.	120
Figura 5.8. -	Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) entre os habitats de <i>P. metidjensis</i>	125
Figura 5.9. -	Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) para os distritos de <i>P. metidjensis</i> em análise.	126
Figura 5.10. -	Representação gráfica da correlação (<i>r</i>) entre as distâncias geográficas (Km) e a similaridade genética de Jaccard	127
Figura 5.11. -	Relação filogenética entre as várias populações de <i>Planorbarius metidjensis</i> de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de <i>Schistosoma spp</i> 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 de dois parâmetros de Kimura. Os números que se sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.	129
Figura 5.12. -	Relação filogenética entre as várias populações <i>P. metidjensis</i> de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de <i>Schistosoma sp</i> , inferidas pela análise das sequências parciais do gene 16S através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.	131
Figura 6.1. -	Gel de agarose a 1% mostrando os perfis de RAPD de <i>B. truncatus</i> de diferentes habitats usando os oligonucleótidos 1 (P1) e o 2 (P2). M - marcador de massa molecular; 1- Silves; 2-Arade; 3-Estói; 4- Pontinha; 5-Vale Judeu; 6-Coimbra; 7-controlo.	148
Figura 6.2. -	Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de Jaccard para os perfis de RAPD usando os dois oligonucleótidos para os seis habitats de <i>B. truncatus</i> .	152
Figura 6.3. -	Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene COI. 1-Estoi; 2- Pontinha; 3-Silves; 4- Arade; 5-Vale Judeu; 6 - Coimbra; M- marcador de massa molecular.	152
Figura 6.4.	Dendrograma, calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os nove haplotipos do gene COI. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.	155
Figura 6.5 -	Dendrograma, calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os cinco habitats e os haplotipos do gene COI encontrados em cada um deles. Os números apresentados	

	nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.	156
Figura 6.6 -	Gel de agarose 1% dos produtos de PCR da região ITS.1-Estoi; 2- Pontinha; 3- Silves; 4- Arade;5-Vale Judeu; 6 – Coimbra; M- marcador de massa molecular.	157
Figura 6.7. -	Dendrograma, calculado a partir do método UPGMA, (da média aritmética não ponderada) mostrando as relações filogenéticas entre os cinco habitats e os haplotipos da região ITS encontrados em cada um deles. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.	160
Figura 6.8. -	Dendrograma, calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os cinco habitats e os haplotipos do gene COI encontrados em cada um deles. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.	161
Figura 6.9. -	Relação filogenética entre as várias populações de <i>Bulinus truncatus</i> de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de <i>Schistosoma spp</i> e outros trematódes, inferidas pela análise das sequências parciais da região através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. As amostras dos moluscos de Portugal estão assinaladas a negrito.	163
Figura 6.10. -	Relação filogenética entre as várias populações de <i>Bulinus truncatus</i> de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de <i>Schistosoma spp</i> e outros trematódes, inferidas pela análise das sequências parciais da região ITS através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. As amostras dos moluscos de Portugal estão assinaladas a negrito.	165

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Classificação Taxonomica dos moluscos pertencentes à Classe Gastropoda. (Adaptado de Malek & Cheng, 1974 & Grácio, 1981).	13
Tabela 2.1	Habitats e média de moluscos colhidos por observação nos diferentes habitats.	43
Tabela 2.2	Distribuição dos moluscos por trimestre e por ano.	45
Tabela 2.3	Distribuição e número de <i>P. metidjensis</i> colhidos, segundo o tipo físico dos habitats e o número total de observações.	48
Tabela 2.4	Caracterização dos habitats com base nos factores ambientais estudados	52
Tabela 3.1	Características morfométricas da concha de <i>Planorbarius metidjensis</i> nos diferentes distritos de Portugal.	65
Tabela 3.2	Matriz de dissimilaridade baseada na distância euclidiana para os nove distritos estudados.	69
Tabela 3.3.	Matriz de dissimilaridade baseada na distância euclidianas para os nove distritos estudados.	70
Tabela 3.4.	Características morfométricas da concha de <i>P. metidjensis</i> , para os diferentes tipos físicos dos habitats.	72
Tabela 3.5.	Matriz de dissimilaridade da distância euclidiana para os diferentes tipos físicos dos habitats.	73
Tabela 3.6.	Total de moluscos colhidos por ano e trimestre.	76
Tabela 3.7.	Distribuição total dos moluscos por trimestre (A) e ano (B) nos quatro habitats estudados.	77
Tabela 3.8.	Distribuição dos moluscos colhidos pelas diferentes classes dos diâmetros maior (A) e menor (B) durante os quatro trimestres estudados.	80
Tabela 3.9.	Matriz de dissimilaridade da distância euclidiana para os quatro habitats em análise.	84
Tabela 5.1	Distribuição geográfica e tipo de habitats de <i>P. metidjensis</i> , utilizados nas diferentes análises moleculares.	105
Tabela 5.2.	Oligonucleótidos utilizados na amplificação dos dois genes.	106
Tabela 5.3.	Percentagem das bases nucleótídicas encontradas nos habitats dos 5 distritos analisados. (nº de habitats analisados).	112
Tabelas 5.4.	Distribuição e frequências relativas dos haplotipos nos diferentes distritos estudados.	112
Tabelas 5.5.	Índices de polimorfismos do gene COI nos diferentes distritos analisados (nº de habitats estudados).	113
Tabela 5.6.	Percentagem das bases nucleotídicas encontradas nos habitats dos 5 distritos analisados. (nº de habitats analisados).	116
Tabelas 5.7.	Distribuição e frequências relativas dos haplotipos nos diferentes distritos estudados para o gene 16S.	117
Tabela 5.8.	Índices de polimorfismos do gene 16S nos diferentes distritos analisados (-) - nº de habitats analisados.	118
Tabela 5.9	Índices de diversidade genética para os habitats de <i>P. metidjensis</i> estudados.	122
Quadro.5.10.	Índices de diversidade genética para os nove distritos estudados.	123
Tabela 5.11.	Índices de diversidade genética para os dois tipos físicos dos habitats em estudo.	124
Tabela 6.1	Populações de <i>Bulinus truncatus</i> estudadas. (n = número de amostras).	142
Tabela 6.2 -	Oligonucleótidos utilizados na amplificação e sequenciação.	145
Tabela 6.3	Matriz de similaridade estimada pelo “Coeficiente de Jaccard” para os habitats de <i>B. truncatus</i> estudados, baseada nas bandas obtidas para os dois oligonucleótidos (P1 e P2).	149
Tabela 6.4.	Índice de Shannon e diversidade genética nos seis habitats de <i>B. truncatus</i> .	150
Tabela 6.5.	Diversidade genética de Nei (1987) para os seis habitats de <i>B. truncatus</i> .	151

Tabela 6.6.	Distribuição da porcentagem dos nucleotídeos encontradas nos diferentes habitats estudados. (n = amostra/área).	153
Tabela 6.7.	Número e frequência relativa dos haplotipos identificados do gene COI nos diferentes habitats. () - frequência relativa dos haplotipos.	153
Tabela 6.8.	Índice de polimorfismos do gene COI nos diferentes habitats de <i>B. truncatus</i> analisados.	154
Tabela 6.9.	Matriz da distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplotipos do gene COI de <i>B. truncatus</i> .	155
Tabela 6.10.	Porcentagem de bases nucleotídicas da região ITS encontradas nos diferentes distritos estudados. (n = amostra/área).	158
Tabela 6.11.	Número e frequência relativa dos haplotipos identificados da região ITS nos diferentes habitats. () - frequência relativa dos haplotipos.	158
Tabela 6.12.	Índice de polimorfismos da região ITS nos diferentes habitats de <i>B. truncatus</i> analisados.	159
Tabela 6.13	Matriz da distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplotipos da região ITS de <i>B. truncatus</i> .	160

Resumo

Planorbarius metidjensis e *Bulinus truncatus*, identificados como hospedeiros intermediários de *Schistosoma haematobium* e *S. bovis*, foram o objecto do nosso estudo.

Este trabalho está dividido em seis capítulos que de certo modo, se encontram relacionados entre si. No **Capítulo 1**, faz-se uma abordagem geral sobre estas duas espécies de moluscos com importância em medicina, com breves considerações sobre a sua classificação, características morfológicas e distribuição no mundo e em Portugal. Do mesmo modo, a revisão de literatura realça aspectos importantes relacionados com interacção do molusco, hospedeiro intermediário e o tremátode parasita e a aplicação das novas técnicas moleculares nesta área.

No intuito de rever a distribuição geográfica destas duas espécies de moluscos em Portugal continental, foi realizado um levantamento malacológico em vários distritos, cujos resultados são apresentados no **Capítulo 2**. Os distritos em estudo foram Beja, Coimbra, Évora, Faro, Guarda, Lisboa, Portalegre, Setúbal e Viseu, tendo sido colhidos 3219 exemplares de *P. metidjensis*, enquanto para *B. truncatus* não foi encontrado nenhum exemplar. Por isso, a segunda parte do trabalho decorreu com exemplares de *B. truncatus*, mantidos há várias gerações no Laboratório de Malacologia da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas, e tendo origem em exemplares colhidos pela Prof^a Doutora Maria Amélia Grácio, Directora da Unidade. Ainda neste capítulo e com base nos dados recolhidos, foi feita a caracterização dos habitats segundo o seu tipo físico, natureza e aspectos bioecológicos.

No **Capítulo 3**, destaca-se a variabilidade encontrada nas características morfométricas da concha de *P. metidjensis* nos diferentes distritos, o que permitiu evidenciar dois grupos distintos. O primeiro engloba as regiões do Alentejo, Algarve e Estremadura e o segundo, as regiões das Beiras e Sado. O tipo físico dos habitats e as características das conchas dos moluscos colhidos parecem ser os factores explicativos

Resumo

para esta similaridade. Neste capítulo também é feita uma abordagem sobre a dinâmica populacional de quatro habitats seleccionados com base nas características físicas de cada um deles (dois do distrito de Évora e dois do distrito de Faro).

No **Capítulo 4**, estudam-se os moluscos em relação a uma eventual infecção natural por tremátodes, bem como, a sua susceptibilidade à infecção por *Schistosoma haematobium* (estirpe de Angola) e *S. mansoni* (estirpe do Brasil). No total de 3219 *P. metidjensis* examinados, 1456 (45,2%) eliminaram xifideocercárias. Quanto à susceptibilidade de *P. metidjensis* a *S. haematobium*, os resultados vieram, mais uma vez, confirmar a não susceptibilidade desta espécie de moluscos à estirpe angolana de *S. haematobium*. Em relação a *S. mansoni*, alguns exemplares de *P. metidjensis* desenvolveram infecção até à fase de esporocisto, apesar de não chegarem a eliminar cercarias. Estes resultados não se verificaram nos moluscos *B. truncatus*.

No **Capítulo 5**, é feito pela primeira vez, um estudo molecular de *P. metidjensis*. Neste estudo foram usados exemplares de *P. metidjensis* de diferentes habitats e agrupados em cinco distritos, para analisar a sua posição sistemática e relação filogenética com outras espécies homólogas cujas sequências se encontram no GenBak. Nesta análise foram usadas as sequências parciais dos genes mitocondriais COI e 16S, tendo-se identificado um total de nove haplotipos para o gene COI e quatro para o gene 16S. Estes resultados mostraram que o maior número de haplotipos foi encontrado no distrito de Coimbra, para ambos os genes, significando que os habitats deste distrito foram mais polimórficos que os restantes.

Com base nos resultados obtidos para os genes COI e 16S, *P. metidjensis* de Portugal apresentaram uma elevada homologia (81%) com outras espécies de *Planorbarius* spp, bem como, com espécies de *Biomphalaria* spp das regiões Neotropical e Africana, hospedeiros intermediários de *S. mansoni* e de outros tremátodes. Para avaliar qual o grau de diversidade genética de *P. metidjensis* foram usados marcadores de RAPD nos moluscos colhidos em 19 habitats (de nove distritos). Os resultados evidenciaram não só uma elevada variabilidade genética, determinada pelo Índice de *Shannon* ($H_o=0,4981$),

Resumo

como também, uma alta diferenciação genética ($G_{st}=0,238$) inter e intrapopulacional (de acordo com os pressupostos de Wright, 1978).

À semelhança do capítulo anterior, no **Capítulo 6**, faz-se pela primeira vez uma caracterização molecular de *B. truncatus* de Portugal. Como já foi referido anteriormente, não foi possível colher exemplares desta espécie durante o trabalho de campo, por isso este estudo realizou-se com as populações mantidas no laboratório. Os resultados do estudo, em que se aplicou a técnica de RAPD, evidenciaram uma elevada diferenciação genética entre as populações ($G_{st}=0,28$), assim como, uma elevada variabilidade genética intrapopulacional determinada pelo Índice Shannon ($0,5294 \pm 0,1787$) a qual parece estar relacionada com o baixo número de migrantes. Foram também utilizados como marcadores moleculares o gene COI do ADN mitocondrial e ITS (Região Interna Transcrita) do ADN ribossomal para análise da posição sistemática e relação filogenética com outras espécies homólogas (hospedeiras intermediárias de *Schistosoma* spp) cujas sequências se encontram no GenBank, as quais evidenciaram homologia muito elevada com as espécies *B. truncatus* (Sudão) e *B. tropicus*. Além disso, foi identificado um total de sete haplotipos para a região ITS e nove para o gene COI, sendo a população de moluscos de Estói a que apresentou três haplotipos, enquanto as restantes populações apresentaram quatro haplotipos distintos. Os resultados globais para F_{st} foram muito baixos, sugerindo tratar-se de uma mesma população.

Summary

The object of our study were *Planorbarius metidjensis* and *Bulinus truncatus*, identified as the intermediate hosts of *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. This work is divided into six chapters that are to an extent related with one another.

Chapter 1 are general considerations regarding these two species of mollusc with importance in medicine, including brief considerations about its classification, morphological characteristics and distribution worldwide and in Portugal. The literature review also highlights important aspects related to the interaction between mollusc, intermediate host and parasitic trematode, and the application of new molecular techniques to the area. With the purpose of reviewing the geographic distribution of these two species of molluscs in continental Portugal, we present results of a malacologic survey of various districts, namely Beja, Coimbra, Évora, Faro, Guarda, Lisboa, Portalegre, Setúbal and Viseu in to **Chapter 2**. We collected a total of 3219 specimens of *P. metidjensis*, but no *B. truncatus* were found. For this reason, the second part of the work used specimens of *B. truncatus* kept for several generations in the Malacology Laboratory of the Medical Helminthology and Malacology Unit, derived from specimens originally collected by Prof^a Doutora Maria Amélia Grácio, Director of the Unit. This chapter also characterizes, based on the collected data, the habitats according to physical, natural and bioecological aspects.

Chapter 3 focuses on the variability in morphometric characteristics of the shell of *P. metidjensis* in the different districts, which allowed us to revealed two distinct groups. The first in the regions of Alentejo, Algarve and Estremadura and the second in the regions of the Beiras and Sado. The physical characteristic of the habitats and the collected mollusc's shells seems to be the factors explaining this similarity. This chapter also refers the population dynamics of four habitats selected for their physical characteristics (two from the district of Évora, two from the district of Faro).

Summary

Chapter 4 is the study of the molluscs in relation to a possible natural infection by trematodes, as well as their susceptibility to infection by *Schistosoma haematobium* (strain from Angola) and *S. mansoni* (strain from Brazil). Out of a total of 3219 specimens of *P. metidjensis* examined, 1456 (45,2%) eliminated xiphidocercariae. With regard to the susceptibility of *P. metidjensis* to *S. haematobium*, the results confirm, once again, the non susceptibility of this species of mollusc to the Angolan strain of *S. haematobium*. Concerning, *S. mansoni*, some specimens of *P. metidjensis* developed infection to the stage of sporocyte, but did not eliminate cercariae. These results did not take place in the mollusc *B. truncatus*

In **Chapter 5**, we report the first molecular study of *P. metidjensis*. In this study we used several specimens of *P. metidjensis* from different habitats, grouped in five districts, to analyse their systematic position and phylogenetic relation with other homologous species, whose sequences were available in GenBank. We used partial sequences of the mitochondrial COI and 16S genes, having found nine haplotypes of COI and four of 16S. These results show a greater number of haplotypes in the Coimbra district, for both genes, implying greater polymorphism in the habitats of this district. Based on the results with the COI and 16S genes, *P. metidjensis* from Portugal presents a high homology (81%) with other species of *Planorbarius* spp, as species *Biomphalaria* spp from the Neotropical and African regions, intermediate hosts of *S. mansoni* and other trematodes.

To evaluate the degree of genetic diversity of *P. metidjensis*, RAPD markers were collected from molluscs of 19 habitats (out of nine districts). Results suggest not only a high genetic variability, determined by the Shannon Index ($H_o=0,4981$), but also high inter- and intra-population genetic differentiation ($G_{st}=0,229$) (Wright, 1978).

The **Chapter 6** reports the first molecular characterization of *B. truncatus*. As referred to earlier, we were not able to collect specimens of this species from the field, having studied lab-maintained populations. The results of this study, with the

Summary

application of RAPD techniques, revealed a high genetic differentiation among populations ($G_{st}=0,28$), as well as a high intrapopulation genetic diversity determined through Shannon's index ($0,5294 \pm 0,1787$), which seems to be related to a low number of migrants. The mitochondrial COI and the ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) were used for analyzing the systematic position and phylogenetic relation with homologous species (intermediate hosts of *Schistosoma* spp) whose sequences are available in GenBank. These revealed very high homology with the *B. truncatus* (Sudan) and *B. tropicus* (Zambia). Furthermore, a total of seven ITS haplotypes and nine COI haplotypes were identified. The mollusc population of Estói possessed three haplotypes, while the remaining populations presented four distinct haplotypes. The global results for F_{st} were very low, suggesting a single population.

Objectivos

O conhecimento sobre os moluscos de água doce que desempenham um importante papel como hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp, tem avançado a passos largos, nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento da biologia molecular.

Em Portugal os moluscos das espécies *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus truncatus* estão referenciados como sendo potenciais hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp (Azevedo *et al*, 1948, Malek & Cheng, 1974 e Brown, 1994).

Efectivamente, *P. metidjensis* foi a espécie encontrada naturalmente infectada com *S. haematobium* na região do Algarve, nos anos vinte do século XX, e em condições laboratoriais mostrou-se susceptível a *S. mansoni* (Barbosa *et al*, 1961) e a *S. bovis* (Silva *et al*, 1974). Com uma distribuição geográfica limitada ao Norte de África e à Península Ibérica, mas com ampla distribuição em Portugal continental, esta espécie tem sido muito pouco estudada. O último levantamento malacológico respeitante a Gastropoda de água doce foi realizado há mais de duas décadas (Grácio, 1981 e 1983).

A espécie, *Bulinus truncatus*, ao contrário de *P. metidjensis*, tem registada uma distribuição geográfica mais restrita, limitada à região de Coimbra e ao Algarve. Não tem sido encontrada naturalmente infectada, mas em condições laboratoriais tem-se mostrado uma espécie susceptível a várias estirpes de *Schistosoma haematobium* de diferentes origens geográficas (Simões & Azevedo, 1974 e Simões & Medeiros, 1980).

Face a esta situação, o presente estudo teve, por um lado, como objectivo geral contribuir para um aumento do conhecimento dos moluscos de água doce pertencentes às espécies *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus truncatus* de Portugal continental, quer a nível ecológico quer a nível molecular e, por outro lado, como objectivos específicos:

1. Caracterizar a distribuição geográfica daqueles moluscos em Portugal tendo por base o levantamento malacológico em diferentes distritos de Portugal continental;

Objectivos

2. Caracterizar os seus habitats de modo a que seja possível estabelecer uma relação entre a sua distribuição geográfica, os habitats e as características morfológicas dos moluscos;

3. Avaliar o comportamento destas duas espécies de moluscos fase à infecção experimental com *Schistosoma* spp;

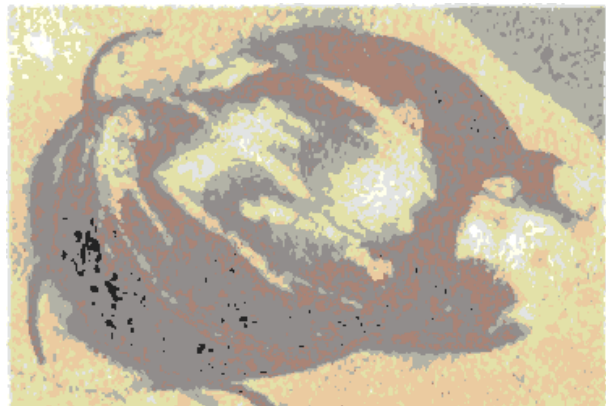
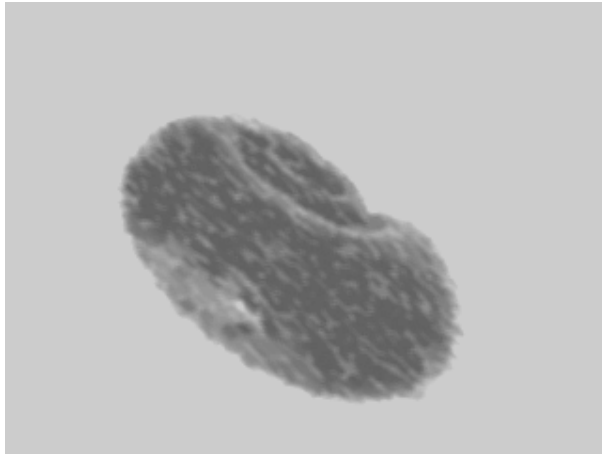
4. Caracterizar as espécies *P. metidjensis* e *B. truncatus*, com o apoio a marcadores moleculares, nomeadamente, os genes mitocondriais COI (Cytochrome Oxidase subunit I) e 16S rRNA e a Região Interna Transcrita (ITS) do ADNr, que possam estabelecer relações filogenéticas entre estas espécies de moluscos dentro da mesma família e estimar a variabilidade genética das populações. Por fim, com o recurso a marcadores RAPD, determinar a diversidade e diferenciação genética dos moluscos colhidos em diferentes áreas geográficas.

Alguns dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho, foram apresentados nas seguintes reuniões científicas:

1. Calado, M.M., Rollinson, D., & Grácio, M.A.A., 2003. Caracterização molecular de *Planorbarius metidjensis* (Gastropoda:Planorbidae) de Portugal: resultados preliminares. *Acta Parasitológica Portuguesa*; vol.10 (11): 11-12 (VII Congresso Português de Parasitologia que se realizou em Lisboa de 9 a 11 de Abril de 2003).
2. Calado, M.M. & Grácio, M.A., 2005. Estudo das características morfométricas e dos habitats de *Planorbarius metidjensis* (Gastropoda:Planorbidae) no distrito de Faro (Algarve). *Portugala*, nº 5: 16-17. (Congresso Português de Malacologia que se realizou em Faro nos dias 16 e 17 de Abril de 2005).

Objectivos

3. Calado, M.M. & Grácio, M.A., 2005. Estudo das características morfométricas e dos habitats de *Planorbarius metidjensis* (Gastropoda:Planorbidae) na região do Algarve. *Acta Parasitológica Portuguesa*; vol.**12** (1-2): 19-20. (IX Congresso Ibérico de Parasitologia que se realizou em Coimbra de 25 a 28 de Outubro de 2005).
4. M.M.Calado e M.A.A.Grácio, 2006. Caracterização molecular de *Planorbarius metidjensis* (Gastropoda:Planorbidae) com base nas sequencias parciais da região COI do DNA mitocondrial. *Acta Parasitológica Portuguesa* **13** (1/2): 66-67. (X Congresso Português de Parasitologia que se realizou em Lisboa, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, nos dias 23 e 24 de Novembro de 2006).
5. M.M. Calado & M.A.A. Grácio, 2007. Avaliação da variabilidade genética de *Planorbarius metidjensis* (Gastropoda:Planorbidae) usando marcadores RAPD. X Congresso Ibérico de Parasitologia que se realizou em Madrid de 15 a 20 de Julho de 2007.



Capítulo 1

Introdução geral

1. Breves dados históricos sobre os moluscos

Os moluscos pertencem ao Phylo Mollusca que pelo estudo dos fósseis, teriam surgido na terra no período Câmbrico, portanto há cerca de 600 milhões de anos. O número actual de espécies de moluscos não é conhecida mas pensa-se que ela esteja muito próxima do 150.000, em que cerca de 80.000 dessas espécies pertencem à Classe Gastropoda (Malek & Cheng, 1974).

As primeiras referências a parasitas, em que estivessem envolvidos moluscos foram feitas nos papiros de Eberes (1500 anos A.C) (Grácio, 1981; Kloos & David, 2002), levando a suspeitar que talvez correspondessem à infecção pelo *Schistosoma haematobium*. Esta suposição foi no entanto confirmada pela descoberta em 1910, por Ruffer, então professor de patologia na Escola Médica do Cairo, de ovos calcinados de *S. haematobium* nos rins de duas múmias egípcias pertencentes à 2ª dinastia (1000 a 1250 anos A.C) (Malek, 1980; Grácio, 1981).

Mas, apesar de nestes tempos tão remotos os moluscos desempenharem um papel importante em saúde pública é só no século XVIII, com Swammerdan (1737), que se vem a conhecer o verdadeiro papel que os moluscos desempenham como hospedeiros intermediários de parasitas. A partir dessa altura os biólogos começam a manifestar o seu interesse pela Malacologia Médica, interesse esse que aumentou ainda mais quando no princípio do século XIX Bilharz descobriu o *Schistosoma* causador da bilharziose vesical (1851) e com o conhecimento de que aquele parasita necessitava no seu ciclo de vida de um hospedeiro intermediário que é um molusco de água doce (Grácio, 1981).

A Malacologia, dado que estava ligada a doenças de carácter menos “agudo”, só muito lentamente se foi impondo, sendo que só nos últimos anos, começou a ser reconhecida como uma importante área de Biologia Aplicada e da Parasitologia (Malek & Cheng, 1974; Grácio, 1981).

2. Moluscos hospedeiros intermediários com importância em Medicina

2.1. Generalidades sobre a classe Gastropoda

O Filo Mollusca engloba uma numerosa variedade de formas, mas só vamos considerar neste capítulo, aqueles que de algum modo têm maior interesse em Medicina: os **Gastropoda**.

Os gastrópodes constituem a classe Gastropoda que inclui três subclasses (Grácio, 1981) das quais apenas nos vamos debruçar sobre a subclasse Pulmonata.

Os moluscos pulmonados com papel de hospedeiros intermediários são, principalmente, caracóis terrestres e de água doce. Outros, contudo, são marinhos e de águas salobras. Não possuem brânquias, e uma parte da cavidade do manto funciona como um pulmão, daí a designação de pulmonados. A concha, quando presente, possui a forma de uma rosca simples e regular. Os moluscos pulmonados são hermafroditas, normalmente ovíparos mas algumas vezes ovovíparos (Malek & Cheng, 1974 e Malek, 1980).

A subclasse Pulmonata está dividida em três ordens: Basommatophora, Stylommatophora e Systollommatophora. Destas três ordens apenas analisaremos a ordem *Basommatophora*.

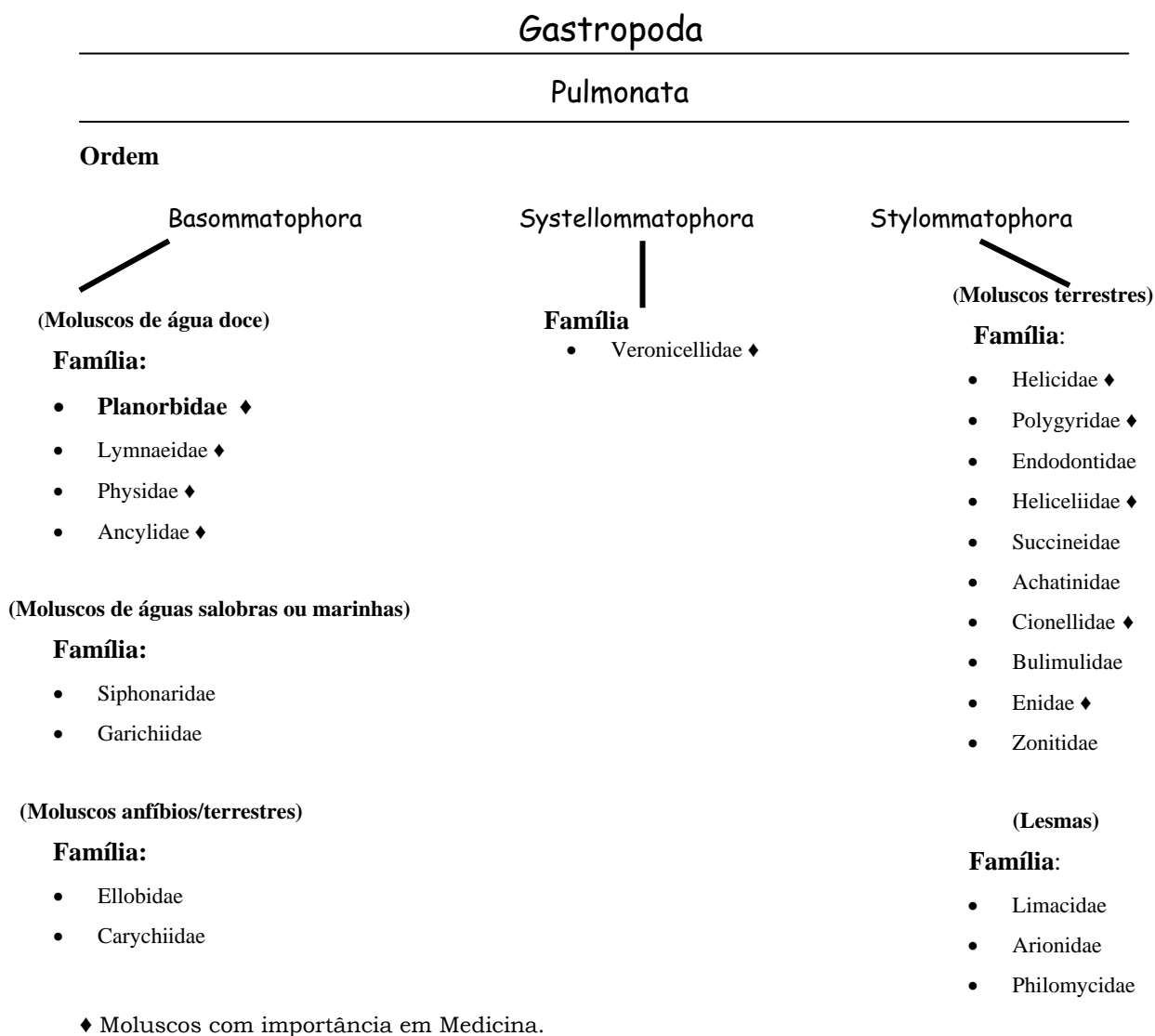
Os membros desta ordem são na sua maioria moluscos de água doce. Possuem um par de tentáculos contrácteis em que os olhos se situam na base. A concha pode ser discóidal, cónica ou pateliforme. Os aparelhos genitais masculino e feminino abrem separadamente para o exterior, mas as duas aberturas estão localizadas muito perto uma da outra (Malek & Cheng, 1974).

2.2. Taxonomia da classe *Gastropoda*

Dentro das três subclasses que constituem a classe *Gastropoda* apenas faremos referência à taxonomia da subclasse *Pulmonata*, considerando que nesta subclasse estão incluídos os moluscos alvo do nosso estudo.

Tabela 1.1. – Classificação Taxonômica dos moluscos pertencentes à Classe *Gastropoda*.

(Adaptado de Malek & Cheng, 1974 e Grácio, 1981).



3. Considerações gerais sobre *Planorbarius metidjensis* (Forbes, 1838) e *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) de Portugal

3.1. - Classificação taxonómica de *Planorbarius metidjensis*

Classe: Gastropoda

Subclasse: Pulmonata.

Ordem: Basommatophora

Família: Planorbidae

Subfamília: Planorbinae

Género: *Planorbarius*

3.2. - Características morfológicas de *P. metidjensis*

3.2.1. - Estrutura da concha

P. metidjensis, molusco de água doce, apresenta uma concha discóide, frágil, espira formada por três a quatro voltas arredondadas, com estrias transversais e longitudinais, sendo as estrias longitudinais muito 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. De cor, geralmente, amarela pálida, pode por vezes apresentar-se esbranquiçada e translúcida e a epiderme um pouco espessa e castanha escura (Medeiros & Simões, 1985) Os diâmetros oscilam entre 13mm-17mm (diâmetro maior) e 6mm a 10mm (diâmetro menor). Segundo Augusto Nobre (1941) foram encontrados exemplares com 18mm de diâmetro maior e 10 mm de diâmetro menor.

Na Figura 1.1 (A-C) está representada a concha de *P. metidjensis* em microscopia electrónica de varrimento.

Capítulo 1

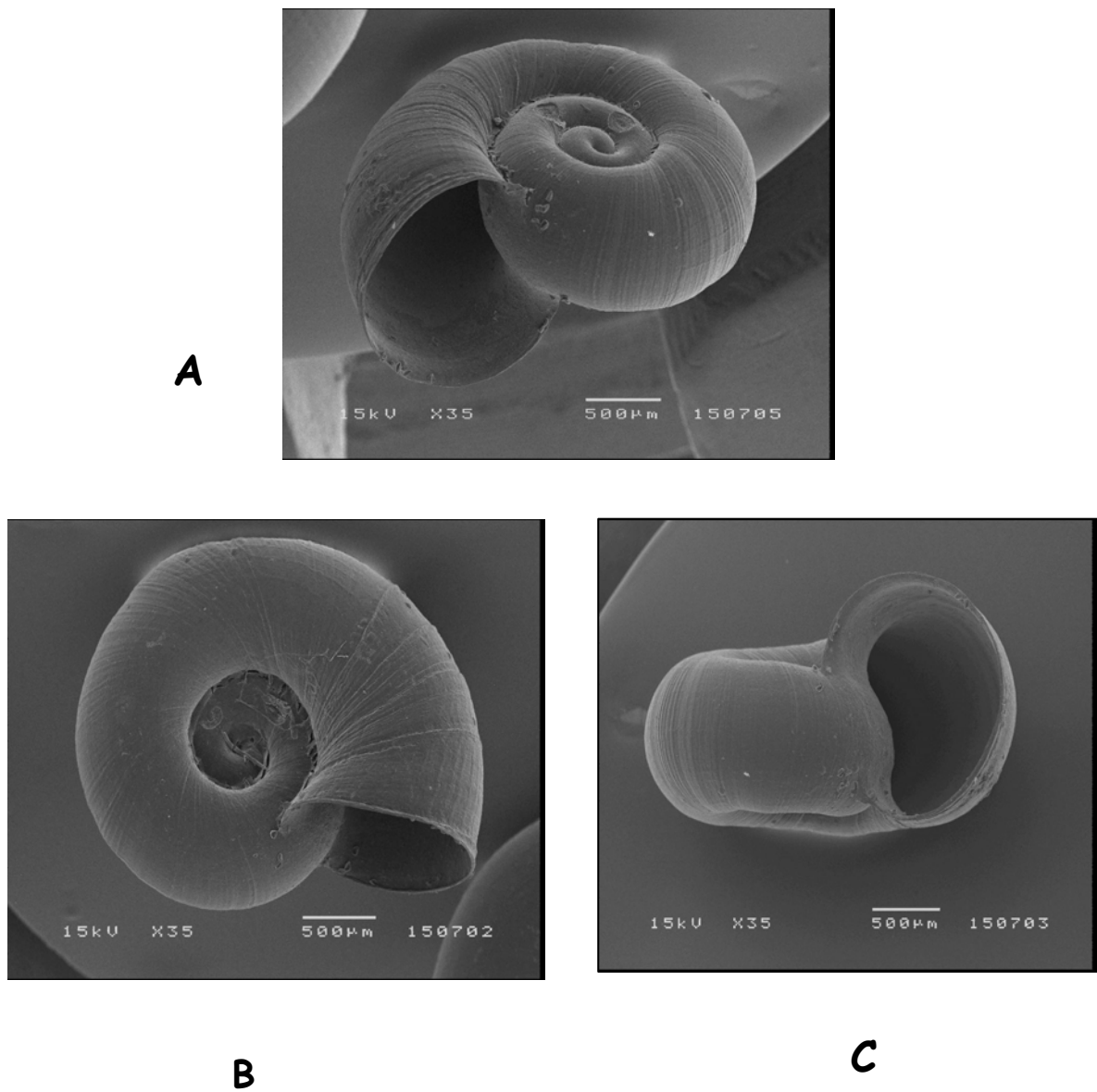


Figura 1.1 – Concha de *Planorbarius metidjensis*.

A – Face inferior quase plana.

B – Face superior profundamente umbilicada.

C – Abertura muito grande, arredondada e levemente oblíqua.

(Fotografias da autora)

3.2.2. - Características da rádula.

A rádula de *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 superfície superior está coberta por pequeníssimos dentes, dispostos em inúmeras fiadas transversais (Figura 1.2). Cada fiada transversal é composta por um dente central de contorno trapezoidal, provido de duas cúspides triangulares com vértices aguçados. De um e outro lado do dente central (Figura 1.2 - 1) dispõem-se os dentes laterais (Figura 1.2 - 2), em número de nove, provido de três cúspides aguçadas nas extremidades, uma cúspide central, o mesocone, mais largo que as duas cúspide laterais, o ectocone e o endocone. Aos dentes laterais seguem-se os dentes intermédios, em número de quatro cuja configuração é idêntica à dos anteriormente descritos mas mais alongados e providos de um mesocone (Azevedo *et al*, 1954).

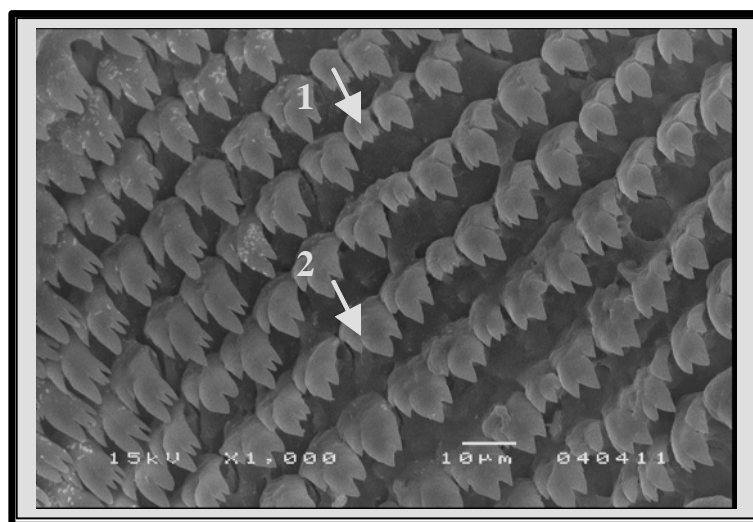


Figura 1.2 – Rádula de *P. metidjensis* (Forbes, 1838).

(Fotografias da autora, tiradas em microscopia electrónica de varrimento)

3.3. Importância de *Planorbarius metidjensis* em Medicina

P. metidjensis, desempenha um importante papel como hospedeiro intermediário de *Schistosoma haematobium* no Norte de África (Yacoubi *et al*, 1999), como único hospedeiro intermediário de *S. bovis* em Salamanca (Ramajo-Martin, 1988), no Sudão (com alguns casos descritos, Touassem & Jourdane, 1986) e, provavelmente, foi hospedeiro natural de *S. haematobium* no Algarve (Bettencourt *et al*, 1922 e Azevedo *et al*, 1948). Não havendo, nos últimos anos relatos de infecção natural destes moluscos, vários trabalhos experimentais têm sido realizados com o objectivo de estudar a susceptibilidade do molusco ao parasita (Kechemir & Combes, 1988, Southgate *et al*, 1984 e Zekhnini, *et al*, 1997).

3.4. Considerações gerais sobre *Bulinus truncatus*

3.4.1. - Classificação taxonómica de *B. truncatus*

Classe Gastropoda

Subclasse: Pulmonata

Ordem: Basommatophora

Família: Planorbidae

Subfamília: Bulininae

Género: *Bulinus*

Durante algum tempo, a caracterização de *B. truncatus* de Portugal não esteve perfeitamente definida, havendo que considerar duas hipóteses: ou a de se tratar de uma estirpe regional própria do país ou de se enquadrar no grupo de *Bulinus* da área mediterrânica (Cristo, 1967).

Ao longo dos tempos a identificação das espécies dentro deste grupo tem sido bastante difícil, pois nem a morfologia da concha, nem a anatomia das partes moles dos diversos exemplares ofereciam uma boa base de classificação específica (Brown, 1994).

Capítulo 1

Por vezes este grupo incluía um grande número de formas diferentes, sendo algumas consideradas espécies distintas, outras subespécies e outras, ainda, estirpes locais (Mandahl-Barth, 1957 e 1965). Com o desenvolvimento de técnicas enzimáticas e, posteriormente, da biologia molecular tem vindo a ser possível reagrupar as espécies nos respectivos grupos.

3.4.2. - Distribuição geográfica e características gerais

O género *Bulinus* (Müller, 1781) tem uma ampla distribuição geográfica, que engloba o Continente Africano, Médio Oriente e uma parte do Continente Europeu. Morfologicamente, apresenta uma concha sinistral, com contorno oval ou quase cilíndrica no alto, e com forma de torre. A altura oscila entre 4 a 20 mm, mas no geral, os exemplares comuns são pequenos, apenas com 5mm de altura, (Brown, 1994).

As espiras são geralmente de igual modo arredondadas. A abertura é grande e larga em caracóis com uma espira baixa e relativamente pequena em exemplares com uma espira alta. A margem da columela é estreita, mais ou menos torcida ou truncada. A escultura consiste em fiadas (filas) arranjadas em espiral de pequenas impressões transversais, ou então a concha pode apresentar nervuras. O modo geral de arranjo dos dentes da rádula é semelhante a todos os membros dos Planorbidae. Na maioria das espécies, 4 a 7 dentes são cuspidos. Os dentes laterais e marginais mostram, contudo, grandes variações a nível individual.

A pseudobrânquia está dobrada profundamente (o que os torna diferentes dos Planorbinae). A genitália também é diferente. O ovotestis (glândula hermafrodita) inclui um pequeno número de folículos e a glândula prostática é compacta e apresenta uma forma de leque. A verga está recolhida e enrolada no interior do saco vérgico. Quando se encontra revirada para fora é bastante comprida e com forma de uma massa. O prepúcio é mais ou menos semelhante ao dos planorbidae. A vagina e o canal do receptáculo seminal são curtos (Cristo, 1967 e Brown, 1994).

Capítulo 1

Morfológicamente, o *B. truncatus* (Figura.1.3) apresenta uma concha globosa, com estriação regular, sinistrorsa. O vértice é aguçado e a espira alongada nas duas primeiras voltas. A columela é atenuada na base e o peristoma é direito, apenas ligeiramente dobrado junto à base da columela. São moluscos tetraploides ($2n=72$) e afálicos (Brown, 1994).

A grande variabilidade genética encontrada entre as populações de diferentes regiões geográficas e confirmada através de estudos enzimáticos veio confirmar a origem da tetraploidia, que caracteriza os *B. truncatus* (Biocca *et al.* 1979; Jelnes, 1979 e Wright & Rollinson, 1981). Os seus habitats podem encontrar-se em águas correntes ou paradas (durante a época seca), sendo um caso de sucesso na colonização de barragens e canais de irrigação. (Brown, 1994).

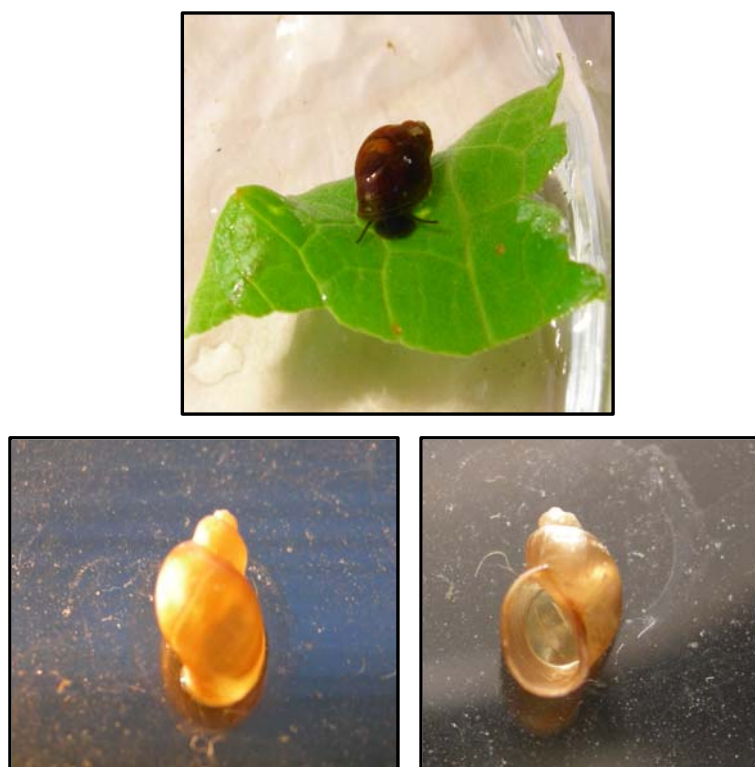


Figura 1.3. – *Bulinus truncatus* (ampliação 40x).

A- fase dorsal da concha; B - fase ventral da concha

3.4.3. - Importância de *Bulinus truncatus* em Medicina

Moluscos *B. truncatus* têm sido registados como hospedeiros intermediários (H.I) de *Schistosoma haematobium* no Irão, Iraque, Síria, Egipto, Sudão e na Costa Norte Africana. Para além deste parasita, esta espécie também está identificada como sendo hospedeiro intermediário de *S. bovis* e de tremátodes Amphisytomidae, do género *Paramphistomum*, os quais parasitam o gado bovino e caprino (Malek, 1980, Rollinson, *et al*, 1997 e Moné *et al*, 2000).

4. - Distribuição geográfica de *P. metidjensis* e *B. truncatus*

4.1. No mundo

Os moluscos *P. metidjensis* têm uma distribuição geográfica muito restrita, limitada a duas zonas: Mediterrâneo Norte até à Península Ibérica e Mediterrâneo Sul até Marrocos e Argélia.

Por outro lado, os moluscos do complexo *B. truncatus/tropicus* ao qual pertencem os moluscos da espécie *B. truncatus* distribuem-se por três regiões geográficas distintas: Mediterrâneo Norte e Sul e parte do continente africano (Brown, 1994).

4.2. Em Portugal

Segundo Augusto Nobre (1941), os moluscos *P. metidjensis* teriam uma ampla distribuição geográfica podendo encontrar-se praticamente ao longo de todo o país. Por seu lado, a espécie *B. truncatus* encontrava-se a norte de Portugal, mais concretamente, na

Capítulo 1

região de Monção, Rio Sousa, Porto, Matosinhos e Leça. Na zona centro, em Esmoriz, Ovar, Aveiro e arredores de Coimbra.

Mais tarde foram encontrados vários exemplares de *B. truncatus* na região do Algarve, estendendo-se assim, a sua distribuição de norte a sul de Portugal (Azevedo & Xavier, 1965 e Grácio, 1983).

5. - A schistosomose

5.1. - A schistosomose no mundo

A schistosomose ocupa o segundo lugar entre as doenças parasitárias mais graves (logo a seguir à malária), no que respeita ao número de pessoas infectadas e também à extensão das áreas (tropicais e subtropicais) em que a doença é endémica. Por outro lado, o carácter crónico da doença e o aumento progressivo e sustentável da morbilidade em indivíduos não tratados resulta numa diminuição da capacidade produtiva e sofrimento prolongado (Morel, 2000).

O impacto que a schistosomose tem em saúde pública e a sua magnitude são bem evidentes, tendo em conta os dados disponibilizados pela OMS em que mais de 600 milhões de pessoas, em 74 países, estão em risco, mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas, das quais 20 milhões com gravidade, cerca de 120 milhões apresentam sintomatologia ligeira e 80 milhões são assintomáticos (Gibodat, 2000).

5.2. A schistosomose em Portugal: breve retrospectiva histórica

A referência ao primeiro caso de schistosomose em Portugal remonta ao ano de 1921 na região do Algarve, mais concretamente num foco em Tavira (Basto, 1921, *cit*, Simões & Medeiros, 1980). Em 1923 foi assinalado o foco de Alportel e em 1925, o foco de Estói (Azevedo, *et al*, 1948). As características epidemiológicas dos focos de Alportel e de Estói eram bastante semelhantes, o que já não acontecia com o foco de Tavira que tinha

Capítulo 1

características muito específicas. Ainda em 1922, Bettencourt, *et al*, verificaram que o molusco transmissor em Portugal de *Schistosoma haematobium* era o *P. metidjensis* (= *Planorbis dufourii*). Estes autores confirmaram experimentalmente e no mesmo ano, a susceptibilidade de *P. metidjensis* a *S. haematobium*.

No foco de Tavira 46 mulheres que utilizavam a água da fonte termal da Atalaia para lavarem a roupa, assim como, um jovem rapaz que utilizava essa mesma fonte para tomar banho, foram encontrados infectados, enquanto nos outros dois focos foram registados indivíduos de ambos os sexos e com idades que oscilavam entre 12 e 25 anos. Isto levou a que fosse pensado que a infecção destes doentes tivesse ocorrido em muitos deles desde a infância, devido ao facto de estes utilizarem a água dos ribeiros da região para lavarem a roupa e tomarem banho. Nos anos que se seguiram, mais concretamente em 1933, 1935 e 1938 foram referenciados novos casos de doentes, registados em Minas de S. Domingos, Fuzeta e Caldas de Monchique (Azevedo, *et al*, 1948). O primeiro caso de schistosomose referenciado em Portugal despertou um grande interesse no mundo científico, por ser o primeiro foco europeu a ficar devidamente registado, pois sobre a sua ocorrência na Europa apenas havia vagas referências a Espanha e Grécia. Para tentar explicar o aparecimento deste foco foram emitidas várias hipóteses. Uma delas referia a estreita relação entre o sul de Portugal e o norte de África, onde existiam focos endémicos de schistosomose e para onde se estabeleceu uma notável corrente migratória do país, podendo assim a doença ter sido trazida por emigrantes portugueses daquela zona do continente africano.

Outra hipótese relacionava a antiguidade desta parasitose no Algarve com a presença dos árabes na Península por um largo período de tempo. As condições favoráveis à manutenção da doença, poderiam explicar que o parasita trazido pelos invasores, tanto mais que entre estes se encontravam naturais do Egipto, país mais remotamente conhecido como foco da schistosomose e um dos mais infectados fosse introduzido e se mantivesse em Portugal (Azevedo, *et al*, 1948).

Capítulo 1

Após longos anos de investigação nesta área, em 1960 a OMS declarou erradicada esta parasitose em Portugal (Azevedo *et al*, 1969).

6. Ciclo de transmissão de *Schistosoma* spp.

Após a fecundação as fêmeas libertam os ovos de *Schistosoma* spp, e que ocorre no sistema vascular dos hospedeiros vertebrados parasitados (Grácio, 2001) (Figura 1.4). Para que o ciclo, possa ter continuidade, os ovos deverão ser excretados dos hospedeiros definitivos (vertebrados) pela urina, no caso do *S. haematobium* (Figura 1.4 -1) ou pelas fezes, no caso de *S. mansoni* (Figura 1.4 - 2), *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*, e alcançar colecções de água doce. Já na água, do ovo vai eclodir o miracídio que é a primeira forma larvar aquática e de vida livre. O miracídio, bem sucedido, localiza e penetra o molusco cuja espécie deverá ser a espécie específica. Neste, o miracídio vai desenvolver-se até à fase de esporocisto, (segunda forma larvar). Dependendo da espécie, os esporocistos mãe desenvolvem-se usualmente nos tecidos do pé, ou seja, na zona de penetração do miracídio (Figura 1.4).

Nas semanas seguintes a primeira geração de esporocistos originam assexuadamente os esporocistos filhos no molusco (Ivanchenko, 1999). Os esporocistos filhos migram para o hepatopâncreas que é o principal local de reprodução assexuada (Thompson, 1997 e Seíça, 2002). A última geração de esporocistos irá gerar a terceira forma larvar, a cercária. Esta diferencia-se e é libertada do molusco. A cercária é aquática, de vida livre e tem a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado, penetrando rapidamente através da pele. As larvas acabadas de penetrar, designadas por schistosómulos, migram até ao seu habitat definitivo no sistema venoso do hospedeiro definitivo onde vai ocorrer a diferenciação até parasitas adultos, macho e fêmea (Ivanchenko, 1999).

O ciclo de vida caracteriza-se por profundas transformações morfológicas e de rápidas adaptações fisiológicas, necessárias às variações de temperatura com que o parasita

Capítulo 1

se depara nas trocas de hospedeiro e ambiente. São ainda pouco claros os mecanismos moleculares que determinam esses processos, tais como, a troca de sinais entre hospedeiros e parasitas, entre o ambiente e os parasitas e entre ambos os sexos dos parasitas (Valle, *et al*, 1999, *cit.* Seïça, 2002).

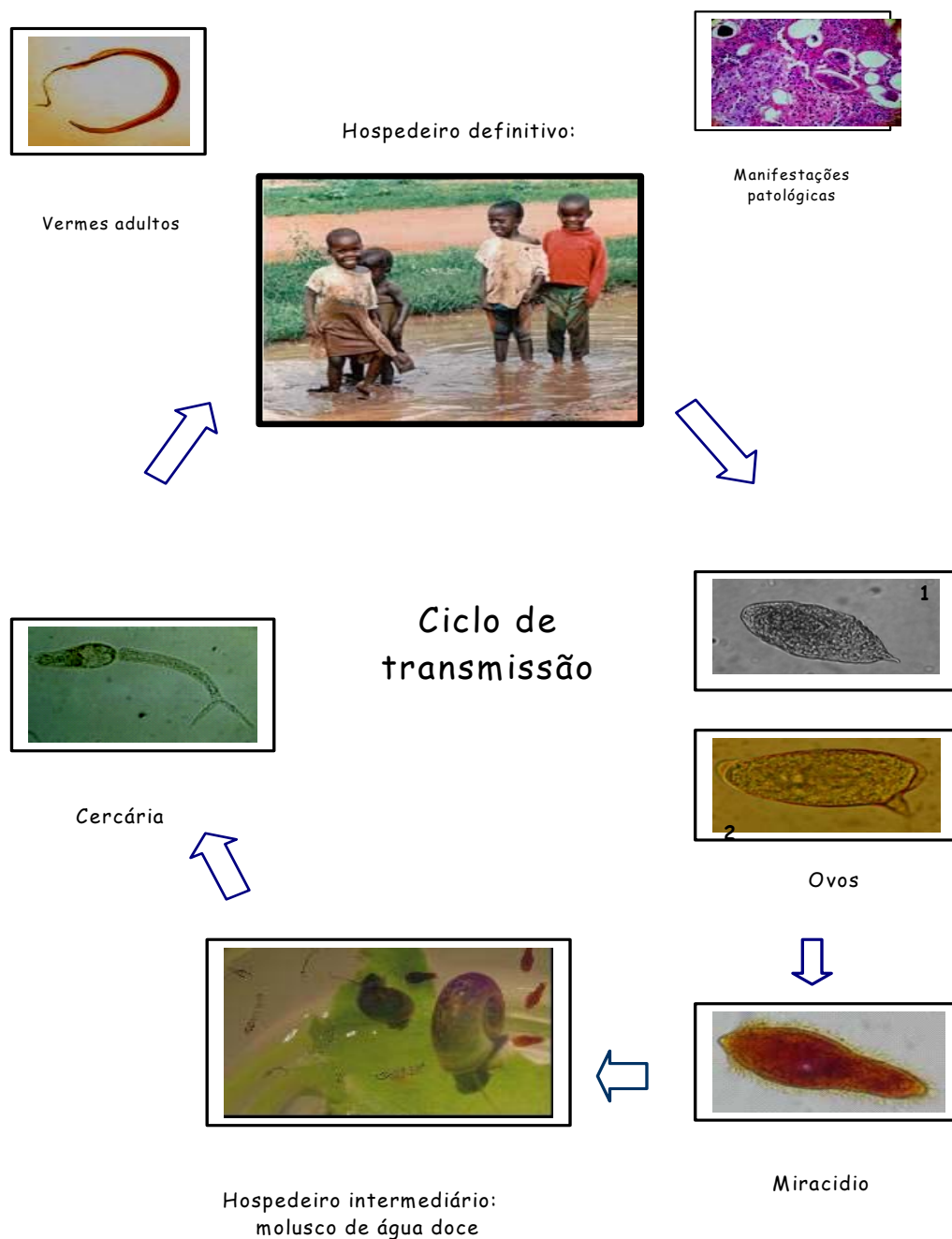


Figura 1.4. – Ciclo de transmissão de *Schistosoma* spp.

7. Relação Parasita/Molusco

7.1. - Interação *Schistosoma* spp/Molusco

Os trematódes digenéticos parasitas têm uma relação muito íntima com os seus hospedeiros intermediários - moluscos gastrópodes (Lockyer *et al.*, 2004).

No estudo das interações parasita - molusco o modelo experimental mais utilizado é *S. mansoni* e *Biomphalaria glabrata* (Théron *et al.*, 1997, Connors *et al.*, 1998; e Sire *et al.*, 2001). Para que haja sucesso na infecção do molusco pelo parasita é necessário que se verifique compatibilidade entre o hospedeiro e o parasita. Para tal, deverá existir concordância entre a capacidade do parasita para encontrar e penetrar o seu hospedeiro e o evitar ou suprimir a sua resposta imune. Ambos os mecanismos possuem bases genéticas complexas, apresentando por isso, variação entre as populações de parasitas e hospedeiros (Adema & Loker, 1997 e Lockyer *et al.*, 2004).

Uma das características da interação entre o tremátode e o molusco é o elevado grau de especificidade que estes apresentam (van der Knaap & Loker, 1990). *S. mansoni*, o tremátode mais estudado, parece estar estritamente relacionado com algumas espécies de moluscos do género *Biomphalaria*. *S. haematobium* parasita principalmente determinadas espécies de moluscos do género *Bulinus* (Adema *et al.*, 1997) e, com alguma excepção o *Planorbarius metidjensis* (Yacoubi, 1999) e *Ferrissia tenuis* (Malek, 1980).

A especificidade do tremátode em relação ao seu hospedeiro não pode ser apenas atribuída ao comportamento dos miracídios (Adema & Loker, 1997 e Lockyer *et al.*, 2004). Efectivamente, os miracídios podem penetrar os moluscos sem que, contudo, consigam prosseguir o seu desenvolvimento. Por isso, parte do desafio do estudo da biologia dos trematódes é o de compreender a sua dependência relativamente ao seu hospedeiro intermediário (Preston & Southgate, 1994).

As relações de antagonismo dinâmico, nas quais o parasita tem forte influência na fisiologia do seu hospedeiro, são altamente específicas e podem, ocasionalmente, demonstrar uma co-especiação.

Capítulo 1

A existência de uma co-evolução moluscos - tremátodes é cada vez mais evidente, tanto a nível celular como a nível de populações. A elucidação das relações entre os tremátodes e os gastrópodes poderá fornecer novas possibilidades de intervenção para reduzir o impacto destas doenças parasitárias na saúde humana (Lockyer *et al*, 2004).

7.2. - Breves referências à teoria da co-evolução.

A teoria da co-evolução defende a ocorrência de modificações genéticas reciprocamente adaptativas, em populações interactivas, podendo daí resultar a contínua selecção das mesmas (Woolhouse & Webster, 2000). Esta teoria é aplicável às interacções molusco-*Schistosoma* spp, uma vez que já se sabe que a susceptibilidade do hospedeiro e a capacidade infectante do parasita são geneticamente variáveis (Woolhouse, 1990). Porém, para que os polimorfismos destas características possam ser explicados por esta hipótese, ter-se-ia estabelecido entre eles uma selecção genética, facto que é muito difícil de demonstrar (Adema & Loker, 1997, Woolhouse & Webster, 2000 e Webster *et al*, 2001a,b).

A evidência mais vezes referenciada em favor da teoria da co-evolução é a adaptação local, que consiste numa maior compatibilidade de combinações hospedeiro-parasita simpátricos, relativamente às alopátricas (Southgate, 1997, Sire *et al*, 2001 e Webster *et al*, 2001), a qual tem sido proposta como “uma regra” ecológica por ser vista como sendo consistente com correlações genéticas entre susceptibilidade do hospedeiro e a capacidade infectante do parasita (Woolhouse & Webster, 2000).

Um dos pré-requisitos para a adaptação local é a diferenciação espacial nas populações hospedeiras. Assim, a probabilidade de ocorrência de adaptação local varia consoante os padrões de diferenciação espacial, sendo maior em locais heterogéneos, como por exemplo rios com diferentes características gerais (Webster, 2001).

Existem, no entanto, outras explicações possíveis para estes polimorfismos, em que uma delas, consiste na ocorrência de trocas genéticas e respectivas consequências que poderão ter particular importância em sistemas dispersos com pequenas populações locais e baixas

Capítulo 1

taxas migratórias (Woolhouse & Webster, 2000 e Webster *et al*, 2001a,b). De facto, a variabilidade regional dos padrões de contacto humano com a água e consequente contaminação dos rios com os excretas e dos factores ambientais que favorecem a infecção dos moluscos com miracídio de *Schistosoma* spp (Tchuenté *et al*, 1999 e Théron *et al*, 1997), é indicativa de que nas interacções molusco-parasita estas heterogeneidades co-evolutivas são prováveis. Rios pouco profundos, de carácter temporário podem também representar “pontos quentes co-evolutivos”, visto proporcionarem maior contacto humano e portanto mais pressão sobre o parasita, do que em rios permanentes (Webster & Davies, 2001).

Poderá também considerar-se a hipótese do “custo da resistência”, na qual se defende que o hospedeiro ao investir na resistência aos parasitas, irá sacrificar outras componentes da sua capacidade competitiva. Um exemplo deste caso, é encontrado em moluscos planorbídios que sendo resistentes à infecção por *Schistosoma* spp, têm também a fertilidade reduzida (Thompson, 1997, Woolhouse & Webster, 2000 e Lockeyer *et al*, 2004).

A teoria da co-evolução pressupõe que a frequência do genótipo do parasita segue a frequência do genótipo do hospedeiro, sendo os genótipos mais comuns do hospedeiro mais susceptíveis a parasitas simpátricos (Dabo *et al*, 1997). No entanto, existem excepções, em que as combinações alopátricas são mais compatíveis (Woolhouse & Webster, 2000 e Webster *et al*, 2001a,b). Para explicar este facto, Morand *et al* (1996) referiram que só após um determinado período de tempo de adaptação, é que a frequência da capacidade infectante nos parasitas acompanha a ocorrência dos alelos de resistência dos hospedeiros.

Dada a complexidade da dinâmica dos sistemas hospedeiros-parasitas e as condições relativamente instáveis que caracterizam muitos dos seus habitats, os genótipos mais comuns poderão variar tanto no tempo como no espaço (Woolhouse & Webster, 2000 e Lockeyer *et al*, 2004), Também, determinada espécie de molusco pode servir de

Capítulo 1

hospedeiro, em simultâneo, a várias espécies de tremátodes e de outros parasitas, ampliando assim, a resposta evolutiva (Adema & Loker, 1997 e Lockyer *et al*, 2004).

Com base apenas em padrões geográficos da susceptibilidade do hospedeiro e capacidade infectante do parasita como adaptação local torna-se difícil a investigação da problemática da co-evolução, uma vez que esta por si só não invalida outras hipóteses. (Woolhouse & Webster, 2000 e Lockyer *et al*, 2004).

A chave para um melhor conhecimento da dinâmica e caracterização genética de moluscos e de *Schistosoma* spp em diferentes contextos experimentais, será a avaliação com marcadores moleculares codominantes apropriados aos níveis de fluxo genético entre populações locais e a sua importância na manutenção de uma estabilidade dinâmica e diversidade genética regionais de forma a possibilitar a aplicação de métodos genéticos ao controlo da schistosomose (Bayne & Loker, 1987, Théron, *et al*, 1997, Sire, *et al*, 2001 e Webster *et al*, 2001).

7.3. - Compatibilidade Parasita-Molusco

O grau de compatibilidade entre o *Schistosoma* spp e o molusco, hospedeiro intermediário, é determinado pela influência relativa dos genes para a capacidade infectante do parasita e os genes de resistência do hospedeiro (Bayne & Loker, 1987). Por exemplo, o desenvolvimento de *S. mansoni* no molusco hospedeiro *B. glabrata* é influenciado pelo número de parasitas e pelas características genéticas do molusco (Lewis *et al*, 1997 e Seïça, 2002).

Em 1975, Richards expondo estirpes de *B. glabrata* a miracídios de *S. mansoni* com diferentes graus de infectividade, demonstrou que esta apresenta bases genéticas em que, pelo menos, um dos factores está ligado ao sexo.

Outro aspecto do controlo genético da capacidade infectante é o dos parasitas híbridos conseguirem infectar um maior leque de hospedeiros intermediários do que cada

Capítulo 1

uma das espécies parentais (Bayne & Loker, 1987), É o caso de *S. haematobium* e *S. intercalatum* dos Camarões que se desenvolvem apenas em *Bulinus rohlfsi* e *B. forskalii* respectivamente, mas os seus híbridos F₁ conseguem desenvolver-se em ambos os hospedeiros (Preston & Southgate, 1994). Neste caso, em particular a capacidade infectante do miracídio híbrido, face aos hospedeiros intermediários, favorecerá a quebra de barreiras entre estas duas espécies próximas e que, provavelmente, se diferenciaram originalmente devido a barreiras geográficas.

A ausência de uma verdadeira hibridação entre espécies de *Schistosoma* que utilizam diferentes géneros de moluscos como hospedeiros intermediários, reflecte a grande distância filogenética entre as espécies de parasitas, a qual, por sua vez, se deve à raridade com que ocorre mudança para um outro molusco que pertença a um outro género ou família. Quando esta alteração ocorre, as barreiras reprodutivas entre os dois grupos de espécies iniciais poderão ser fortalecidas pelo fracasso do miracídio híbrido infectar moluscos de qualquer uma das linhagens parentais, não devendo, contudo, ser excluídos outros mecanismos de isolamento (Adema & Loker, 1997 e Lockyer *et al*, 2004).

7.4. - A especificidade do hospedeiro e a infecção

Como já foi referido anteriormente, a especificidade é uma das características mais importantes na interacção tremátode-molusco. Assim, em ambientes aquáticos habitados por diferentes espécies de moluscos, cada espécie de hospedeiro é, normalmente, infectada com uma forma larvar de uma espécie de tremátode, apesar de grande variedade de miracídios que se encontra na água.

Os tremátodes mostram uma alta especificidade para os moluscos hospedeiros intermediários, (mais do que em relação aos seus hospedeiros definitivos), sendo só certas espécies compatíveis, isto é, o parasita reconhece, penetra e desenvolve-se dentro do molusco. A maior parte dos tremátodes pode desenvolver-se com sucesso numa simples família de moluscos ou em várias espécies (Lockyer *et al*, 2004).

Capítulo 1

Esta compatibilidade é a consequência directa das complexas interacções entre o molusco e o tremátode e pode ser considerada como um conjunto de efeitos fisiológicos e comportamentais (Lockyer *et al*, 2004).

Quer a susceptibilidade do molusco quer a capacidade infectante do parasita contribuem para uma relação altamente específica. Por exemplo, algumas estirpes de *S. mansoni* que se adaptaram a *B. tenagophila*, mas não conseguem infectar *B. glabrata* e vice-versa (Paraense & Correia, 1963, 1978 & Lockyer, *et al*, 2004.).

A resistência genética ou inata nos moluscos tem vindo a ser estudada usando estirpes de laboratório, nomeadamente linhas de *B. glabrata* geneticamente bem definidas e mantidas em laboratório durante vários anos (Lewis, *et al*, 2003) permitindo o controlo fenotípico e de outras variáveis (Webster & Davies, 2001). Estudos em que são usadas estirpes de laboratório para a determinação da susceptibilidade genética de moluscos, demonstraram que ela pode ser herdada (Richards *et al*, 1992). Assim, em moluscos juvenis aparecem genes múltiplos com pelo menos quatro genes interactivos cada um com alelos múltiplos (Richards & Merrit, 1972). Em estudos similares em moluscos adultos, foram identificados pelo menos dois genes dominantes que conferem a resistência, o gene R (Richards, 1975) e o gene Mr (Richards, 1984). Também outros métodos, tais como, RAPD (Random amplified polymorphic DNA) foram utilizados na pesquisa de marcadores associados à resistência em *B. glabrata* (Knight *et al*, 1999; Abdel-Hamid *et al*, 1999 e 2006). Embora, cada uma das relações individuais seja específica, algumas espécies de moluscos são susceptíveis a mais de uma espécie de parasita, o que implica que uma infecção múltipla possa ocorrer (Lie *et al.*, 1965 cit Lockyer *et al*, 2004).

A penetração do miracídio no hospedeiro “errado” pode, normalmente, resultar na eliminação do parasita incompatível. No caso, em que o parasita consiga sobreviver ao sistema de defesa interno do molusco, então a infecção pode persistir. Desde então, infecções em curso com anfiostomas ou echinostomas, vão interferir com o sistema de defesa interno do molusco hospedeiro, o que pode favorecer o hospedeiro a alterar desta maneira, a presença de outras espécies de digenea infectando o mesmo molusco hospedeiro.

Capítulo 1

O efeito supressivo de uma infecção parasitária pode permitir uma eventual adaptação de outros parasitas a um novo hospedeiro (Lockyer *et al*, 2004).

7.5. - Sobrevivência e longevidade dos moluscos.

O efeito da infecção de tremátodes na sobrevivência e longevidade dos moluscos tem consequências importantes, no que diz respeito, à prevalência do parasita e dinâmica da população hospedeira. Embora elevadas taxas de mortalidade caracterizem a infecção por tremátodes, alguns autores têm descrito casos excepcionais de longevidade de moluscos que se encontram parasitados, nomeadamente quando se encontram parasitados com alguma espécie de *Schistosoma*. Muitos factores poderão estar envolvidos na determinação da sobrevivência e longevidade, incluindo a intensidade da infecção, nutrição do hospedeiro e a compatibilidade entre estirpes de parasitas e hospedeiros que se encontram envolvidos (Thompson, 1997).

Também a perda da capacidade reprodutiva do molusco hospedeiro intermediário, normalmente denominada castração parasitária, é uma característica comum de muitas interacções tremátode-molusco (Thompson, 1997). Quando invadem o hepatopâncreas (glândula digestiva), os parasitas originam a ruptura da membrana que o envolve. O aparelho reprodutivo do molusco pode também ser directa ou indirectamente danificado pela acumulação de parasitas nos tecidos (Grácio, 1988).

Outros autores verificaram que a inibição de crescimento das gónadas em adultos de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* se iniciou durante o desenvolvimento do esporocistos mãe e, tanto a maturação de oócitos como a espermatogénese foram afectados aquando do desenvolvimento das cercárias. Existe ainda a hipótese de que o efeito da infecção sobre a reprodução do hospedeiro resulte de um efeito hormonal induzido pelo parasitismo (Crews & Yoshino, 1989).

8. Estratégias moleculares aplicadas ao estudo de moluscos.

A infecção do tremátode no molusco pode ser estudada ao nível da expressão génica. As alterações na expressão génica quer no *Schistosoma*, quer no molusco (H.I) pode ser investigada usando técnicas de expressão génica comparativas, cujo objectivo visa a identificação de novos genes que possam estar envolvidos na interacção entre o *Schistosoma* e o seu hospedeiro intermediário (Minchela *et al*, 1995 & Lockyer *et al*, 2004) ou ainda de marcadores relacionados com a identificação de marcadores genéticos associados à resistência do molusco em relação ao parasita (Larson *et al*, 1996; Knight *et al*, 1999; Abdel-Hamiz *et al*, 1999 e 2006)

O desenvolvimento do projecto “Sequenciação do Genoma da *Biomphalaria glabrata*”, permite ter esperanças num rápido progresso na identificação de uma estratégia chave que controle o desenvolvimento do tremátode no hospedeiro intermediário (Raghvan & Knight, 2006), assim como, numa identificação dos genes de resistência no molusco para um melhor conhecimento da epidemiologia da schistosomose (Knight *et al*, 1999 e 2000).

Uma vez, identificada a transcrição associada com a resistência, a fase seguinte envolverá o esclarecimento desta função, utilizando talvez a linha celular embrionária de *B. glabrata* (Yoshino *et al*, 1999), com a qual o desenvolvimento do tremátode intra-molusco pode ser estudado *in vitro*. Métodos apropriados de manipulação genética (criação de mutações com vista à aquisição ou perda de determinadas funções/capacidade), com base no estudo destas linhas celulares, começam agora a ser desenvolvidos, o que vai permitir uma maior investigação sobre o papel dos genes resistentes e a sua interacção com o tremátode,

Neste sentido o uso de “genes silenciosos” ou métodos de inactivação envolvendo a inibição da expressão dos genes, cujo objectivo seria o conhecimento da transcrição envolvendo a interacção molusco-tremátode, o que poderia aumentar o número de funções

Capítulo 1

celulares identificadas ou permitir o desenvolvimento de moluscos transgênicos resistentes aos trematódes (Lockyer *et al*, 2004). Além disso, o desenvolvimento destes moluscos levaria à determinação de mecanismos de resistência a fármacos, patogênia, variabilidade, etc., proporcionando meios para uma mais fácil identificação de novos alvos quimioterapêuticos e desenvolvimento de vacinas (Williams *et al*, 1999).

8.1. - Caracterização genética.

A caracterização das diferentes espécies de moluscos baseava-se apenas em dados fenotípicos (características morfológicas da concha e partes moles), os quais se mostraram insuficientes para distinguir espécies e subespécies (Malek & Cheng, 1974 e Brown, 1994). A caracterização genética dos moluscos é mais uma das alternativas para quantificar a sua diversidade. Actualmente, os marcadores genéticos são sem dúvida a principal ferramenta para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural, e com a sua utilização é possível também quantificar a variabilidade intrapopulacional ou até mesmo usar esta informação para se avaliar a distribuição desta entre as populações naturais (Grande *et al*, 2004). Entretanto, a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações está relacionada com alguns factores intrínsecos à espécie, como por exemplo, o tipo de reprodução, bem como alguns factores ambientais que possam influenciar ou direccionar de forma agregada esta distribuição (Gow *et al*, 2004).

8.2. - Marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer genótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de ADN. A sequência de nucleótidos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas (Serrano & Garcia Lobo, 1992).

Capítulo 1

Nos últimos anos, o desenvolvimento tecnológico na área dos marcadores moleculares tem dado passos de gigante, principalmente, com a tecnologia de ADN recombinante e a descoberta da amplificação de segmentos de ADN por via da Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR). Várias técnicas têm vindo a ser aferidas e as análises moleculares mostram-se acessíveis e eficientes e, aliadas ao desenvolvimento de novos métodos estatísticos permitem a manipulação de grande quantidade de dados. Os marcadores genéticos são “loci” que apresentam características detectáveis que podem diferir entre indivíduos, observando-se variação nas sequências de ADN, que podem ser reveladas mediante diferentes técnicas (Mcpherson et al, 1992).

A aplicação de técnicas moleculares no estudo das espécies de moluscos com importância em Medicina, principalmente dos géneros *Bulinus* e *Biomphalaria* (Rollinson, et al, 1998) têm servido, principalmente, para caracterizar e identificar os hospedeiros intermediários na perspectiva de aprofundar o conhecimento sobre a relação destas espécies e *Schistosoma* spp. 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:

8.2.1. ADN mitocondrial.

O ADN mitocondrial (mtDNA) foi descoberto em 1960 e desde então, tem sido usado como uma importante ferramenta na análise genética das populações de moluscos.

Uma característica importante do ADN mitocondrial, para além da simples organização da sua molécula e da herança materna é a sua alta taxa de evolução. O ADN mitocondrial evolui 10 vezes mais rapidamente que o ADN nuclear, pois não existem mecanismos de reparo nesta molécula (Serrano & Garcia Lobo, 1992).

O genoma mitocondrial é gerado maternalmente, não sofrendo portanto recombinação. A herança materna possibilita que esta molécula seja usada como um importante marcador molecular, com o objectivo de traçar a história evolutiva de uma

Capítulo 1

determinada espécie e determinar a filogenia entre as populações existentes, independentemente de terem sofrido efeitos de adaptação e/ou seleção.

A análise sequencial do gene COI (Cytochrome oxidase subunit I), tem permitido ir mais longe no conhecimento da variabilidade morfológica, assim como, nas relações filogenéticas entre espécies de diferentes grupos (Stothard *et al*, 1997, 2002b e Jørgensen *et al*, 2007).

8.2.2. - RAPD (Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN).

A técnica de RAPD (amplificação aleatória de polimorfismos de ADN) é uma das variantes da técnica de PCR, a qual vai amplificar regiões do ADN sem que haja a necessidade do conhecimento prévio das sequências do organismo em estudo, ou seja, não necessita de oligonucleótidos específicos (Williams *et al*, 1990). Os produtos polimórficos são gerados pela amplificação de fragmentos de ADN através de pequenos oligonucleótidos (“primers”) de sequências aleatórias e sob condições de baixa estrigência (Welsh & McClelland, 1990 e Williams *et al*, 1990).

Esta técnica tem sido usada na diferenciação de organismos nos mais variados estudos (Williams *et al*, 1993, cit Larson *et al*, 1996). Nos anos noventa do século XX, esta técnica foi aplicada aos estudos da diversidade genética dos moluscos pertencentes ao género *Bulinus* que tem um papel relevante como hospedeiros intermediários de *S. haematobium* (Langand, *et al*, 1993), e na detecção do polimorfismo intraespecífico e interespecífico das diversas espécies e estirpes de *Schistosoma* (Neto *et al*, 1993). Também Vidigal *et al* (1994, 1998), que aplicaram a técnica de RAPD no estudo dos moluscos da espécie *B. glabrata*, demonstraram que era possível distinguir populações oriundas de diferentes localizações do Brasil, evidenciando a diversidade genética entre elas.

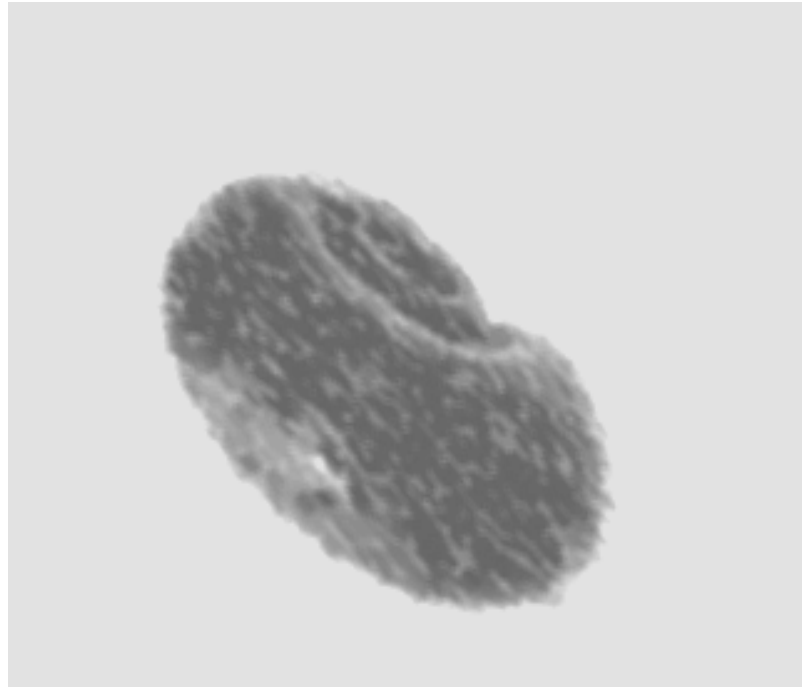
Capítulo 1

As principais limitações dos marcadores RAPD estão relacionadas com o baixo conteúdo de informação genética por “locus”. Apenas um alelo é detectado e os genótipos heterozigóticos não podem ser diferenciados dos homozigóticos, fazendo com que os resultados tenham pouca aplicabilidade em análises filogenéticas. Para que seja possível a obtenção de resultados robustos que permitam uma análise filogenética confiante, existe a necessidade de criar “primers” específicos que permitam sem qualquer incerteza uma identificação de espécies em que tal tem sido difícil (Jones *et al*, 1997).

8.2.3. Operões do ARN ribossomal

Os ribossomas são organelos citoplasmáticos que ocorrem em todos os seres vivos. A sua estrutura é formada através de grandes complexos de proteínas e ácidos ribonucleicos, formando subunidades.

Os operões de ARN ribossomal nos quais estão contidas as regiões ITS1 e ITS2 e o gene do ARNr 5.8S têm sido utilizados em estudos taxonómicos 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 (Sthotard *et al*, 1996) e na identificação de moluscos com importância médica e veterinária (Rollinson & Kane, 1991).



Capítulo 2

Distribuição geográfica e caracterização dos habitats de *Planorbarius metidjensis* de Portugal

2.1- Introdução.

O estudo da distribuição geográfica dos moluscos de água doce, hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp (agentes etiológicos da schistosomose) é indispensável, não só para a determinação de focos de transmissão, como também para avaliar o risco potencial da dispersão dos parasitas (Grácio, 1983).

A schistosomose é reconhecida como uma das mais importantes parasitoses que afectam os humanos e tem como principais agentes etiológicos, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. intercalum*. Quanto ao *S. bovis*, parasita de animais, pode também, eventualmente, parasitar os humanos.

Considerando que no início do século passado, foi detectada a existência de focos autóctones de schistosomose vesical em determinadas regiões do Algarve (Azevedo *et al*, 1948) e que dispomos apenas de inquéritos malacológicos feitos há já algumas décadas (Nobre, 1941 e Grácio, 1981, 1983), o presente estudo teve como objectivo contribuir para um conhecimento actualizado da distribuição geográfica de *Planorbarius metidjensis* e da sua bioecologia.

2.2. - Material e métodos

Os estudos realizados por Azevedo (1948) e Grácio, (1983) sobre a distribuição geográfica e caracterização dos habitats de *Planorbarius metidjensis* serviram de base para a planificação deste nosso trabalho.

Os inquéritos malacológicos foram realizados no período de 2001 a 2005 de norte a sul de Portugal e as colheitas executaram-se segundo o método de captura por indivíduo, em espaço e tempo determinado. Para o registo das coordenadas geográficas de cada um dos habitats foi utilizado o GPS (Global Position System).

Os exemplares de moluscos foram recolhidos manualmente com ou sem auxílio de pinças metálicas e, quando foi necessário devido à profundidade da água, também foi utilizada uma rede metálica. Os moluscos foram colocados em recipientes de PVC com tampa, nos quais foi introduzido um pouco da água do habitat. Estes recipientes foram transportados para o laboratório e aí, foi dado diferente destino aos moluscos; de acordo o plano de trabalho: identificação, manutenção e proliferação em laboratório, pesquisa sobre eventuais infecções naturais por tremátodes e estudos moleculares.

Para a identificação e caracterização dos habitats foi mantido o modelo de ficha de registos utilizado por Grácio, nos seus inquéritos malacológicos (**Anexo 1**).

Na classificação do tipo físico e carácter dos habitats identificados foram utilizados os critérios estabelecidos por Azevedo & Medeiros (1955). Assim, quanto ao tipo físico foram classificados em ribeiros (as), rios, pequenos caudais de água, tanques, charcos, poças e canais de irrigação e quanto ao carácter em permanentes e temporários.

No que se refere à natureza dos habitats, foram considerados três tipos: natural, antrópico e misto, consoante a intervenção ou não do homem.

Para a caracterização bio-ecológica dos habitats foram tidos em conta alguns dos factores que directamente influenciam a vida dos moluscos, nomeadamente o tipo de substrato, a vegetação na água e em volta do habitat, presença ou não de outros animais,

Capítulo 2

temperatura e pH da água. O pH e a temperatura da água foram medidos com um conjunto de medição de pH “OAKLON”.

Relativamente ao tipo de vegetação e substrato foram observados visualmente e classificados com base no protocolo estabelecido para a caracterização dos habitats (Anexo 1).

Na análise de dados, foi utilizado o Programa SPSS versão 12. Depois de efectuar uma análise exploratória e descritiva das principais variáveis em estudo, verificámos as condições de aplicabilidade de técnicas estatísticas paramétricas. Dado que os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias falharam frequentemente, optamos por técnicas não-paramétricas (Siegel & Castellan, 1988), nomeadamente, o teste Kruskal-Wallis para comparar, em termos medianos, as várias características morfométricas nos habitats em estudo. Foram também realizadas as Comparações Múltiplas para identificar qual e quais os pares que são responsáveis pela rejeição da hipótese nula (Morrison, 2002). Os testes de Mann-Whitney-Wilcoxon foram também utilizados para o estudo de grupos independentes e o coeficiente de correlação não-paramétrico de *Sperman* foi usado para a correlação entre pares de variáveis em estudo.

Para a elaboração do mapa da distribuição geográfica dos habitats com base nas coordenadas recolhidas pelo GPS foi utilizado o Sistema de Informação Geográfica com a aplicação do programa ArcWiew versão 3.0.

2.3. - Resultados

2.3.1.- Distribuição geográfica e identificação dos habitats

Foram identificados e caracterizados 38 habitats de *P. metidjensis* em 9 distritos de Portugal continental, nos quais se colheram 3219 moluscos (Figura 2.1).

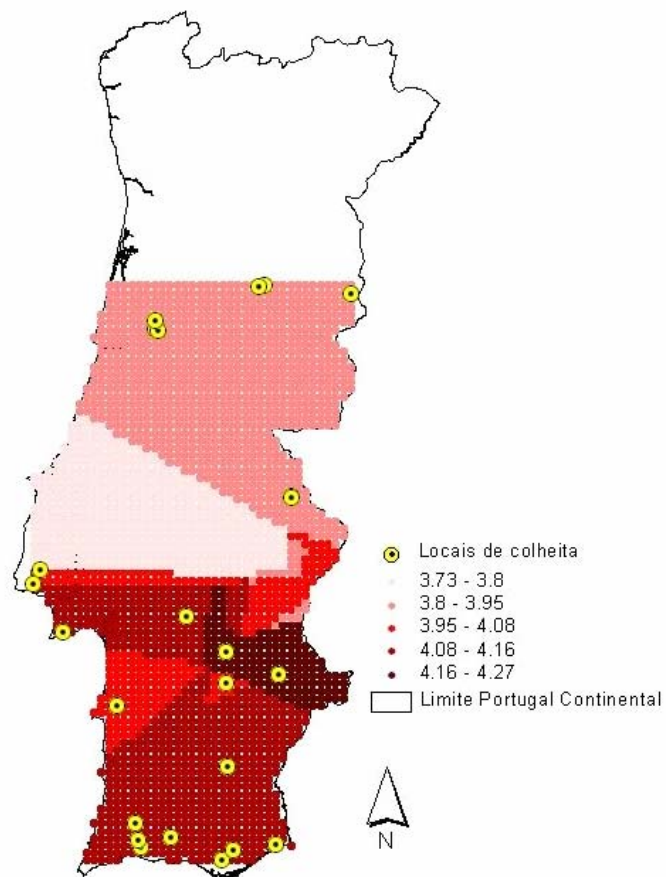


Figura 2.1. – Distribuição geográfica dos locais com habitats de *P. metidjensis*. (Foi utilizado o Programa ArcView versão3.0)

Capítulo 2

Na Figura 2.1. estão assinalados os locais onde registamos os habitats, não tendo sido possível diferenciar todos, dada a proximidade entre eles.

Dos 38 habitats estudados, 4 (10,52%) foram encontrados no distrito de Beja, 12 (31,58%) no distrito de Faro, 5 (13,16%) no distrito de Évora, 3 (7,9%) no distrito de Setúbal, 6 (15,8%) no distrito de Coimbra e 2 (5,26%) em cada um dos seguintes distritos: Portalegre, Guarda, Lisboa e Viseu (Figura 2.2).

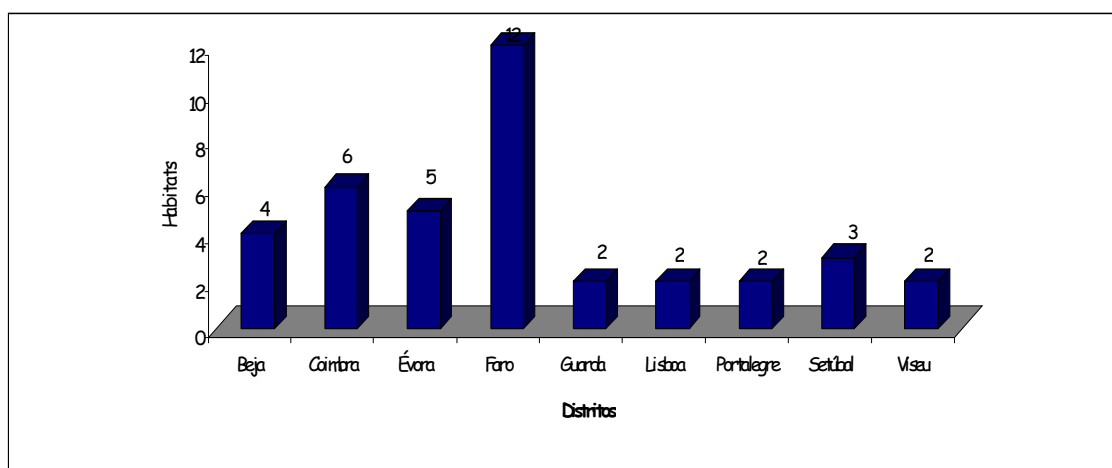


Figura 2.2 - Número de habitats identificados e a sua distribuição nos diferentes distritos.

Quanto à distribuição e número dos moluscos colhidos nos diferentes distritos, o distrito de **Faro** foi o que registou o maior número de moluscos, com um total de 1453 (45,1%), seguindo-se o de **Évora** com 597 (18,5%), o de **Coimbra** com 316 (9,8%), o de **Beja** com 245 (7,6%), o de **Viseu** com 184 (5,7%), o de **Setúbal** com 146 (4,5%), o de **Guarda** com 118 (3,7%), o de **Portalegre** com 110 (3,4%) e o de **Lisboa** com 50 (1,6%) (Figura 2.3).

Capítulo 2

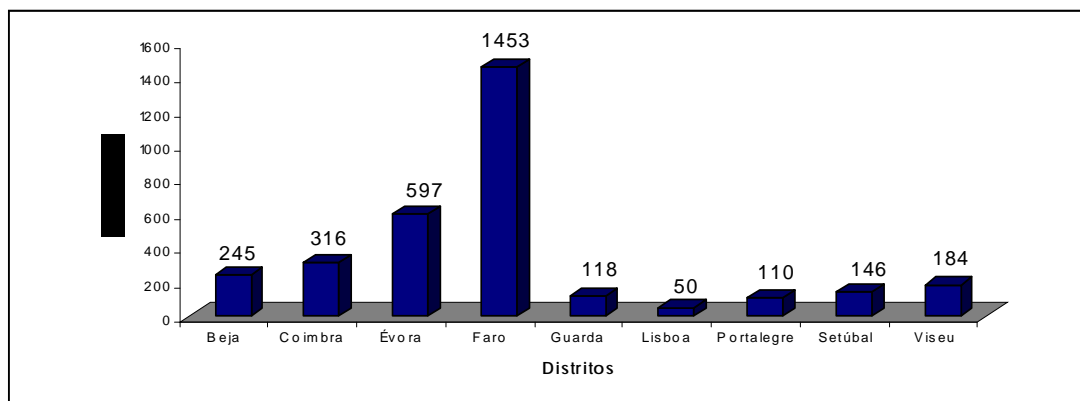


Figura 2.3. - Número de moluscos colhidos em cada um dos nove distritos estudados.

Na Tabela 2.1 estão registados o número e a média de moluscos colhidos nos diferentes habitats, verificando-se que, dos 38 habitats, 4 foram observados 17 vezes e neles colectados um total de 1557 moluscos (estes habitats foram seleccionados para o estudo da dinâmica de populações a desenvolver no capítulo seguinte).

Tabela 2.1 – Habitats e média de moluscos colhidos por observação nos diferentes habitats.

Distrito	Habitat	Nº de moluscos	Média dos moluscos colectados/obs.
Beja	Alqueva	25	25
Beja	Alvito	53	53
Beja	Penilhos (1)	86	43
Beja	Penilhos (2)	81	40,5
Coimbra	Rib. Eiras (1)	66	33
Coimbra	Rib. Eiras (2)	84	42
Coimbra	Rib. S. Paulo (1)	21	10,5
Coimbra	Rib. S. Paulo (2)	23	11,5
Coimbra	Rib. Souselas (1)	53	26,5
Coimbra	Rib. Souselas (2)	69	34,5
Évora	Mitra	8	8
Évora	Rib. Alcaçovas	37	37
Évora	Rib. Escoural	405	23,8
Évora	Rib. S.Lourenço (Mourão)	85	21,3
Évora	Rib. Valverde	62	31

Capítulo 2

Tabela 2.1 (cont.) – Habitats e média de moluscos colhidos por observação nos diferentes habitats.

Distrito	Habitat	Nº de moluscos	Média dos moluscos colectados/obs.
Faro	Binanciate (1)	61	30,5
Faro	Binanciate (2)	28	14
Faro	Pincho (1)	65	32,5
Faro	Pincho (2)	39	19,5
Faro	Pincho (3)	34	17
Faro	Porto de Lagos	15	15
Faro	Rib. Altura	36	36
Faro	Rib. Boina	822	48,4
Faro	Rib. Monchique	40	6,6
Faro	Rib. Seco (Estói)	268	15,8
Faro	Rib. S. B. Alportel	36	36
Faro	V. Lobo (Algarve)	9	9
Guarda	Rebolosa	90	90
Guarda	Rio Côa (Sabugal)	28	28
Lisboa	Rib. Caneças	6	6
Lisboa	V. Lobos (Sintra)	44	11
Portalegre	Esperança	57	53
Portalegre	Portalegre	53	57
Setúbal	Monte Novo (Grândola)	17	17
Setúbal	Rio da Figueira	98	12,3
Setúbal	Sesimbra	31	3,9
Viseu	Rib. Rebordal	18	18
Viseu	S. Cassurões	166	166

No ano de 2004 foram colhidos 1067 moluscos, seguidos dos anos de 2002 com 1003 e 2003 com 589. Em 2001 e 2005 foram colhidos 334 e 226 moluscos, respectivamente.

No que se refere aos períodos de recolha, no 2º trimestre foram colectados 1344 moluscos, seguidos do 1º trimestre com 799, do 4º trimestre com 571 e do 3º trimestre com 505 (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Distribuição dos moluscos por trimestre e por ano.

Ano	Trimestre				Total
	1º	2º	3º	4º	
2001	/	62	81	191	334
2002	383	448	112	60	1003
2003	162	102	192	133	589
2004	181	579	120	187	1067
2005	73	153	/	/	226
Total	799	1344	505	571	3219

2.3.2. - Caracterização dos habitats

2.3.2.1. - Natureza do habitat

Os habitats identificados foram classificados em três tipos, consoante ou não a intervenção humana. Assim, dos 38 habitats estudados, distinguiram-se três tipos; **tipo natural** (Figura 2.4 A) em que o escoamento da água é superficial em vale ou vertente sem que haja a intervenção humana; do **tipo antrópico** (Figura 2.4 C) quando o escoamento da água é feito em superfícies construídas pelo homem (ex: tanques, reservatórios) e do **tipo misto** (Figura 2.4 B) em que o escoamento da água é feito através de estruturas construídas pelo homem em associação com o escoamento no fundo de vale.



Figura 2.4 – Natureza dos habitats. A - Ribeira de Valverde (tipo natural). B- Ribeira do Escoural – (tipo misto); C - Tanque (tipo antrópico) Monte Novo.

Dos 38 habitats estudados, 18 (48%) foram do tipo natural e deles foram colhidos 1708 exemplares (53,0%). Os restantes habitats, 13 (34%) foram do tipo misto com 923 (28,7%) de moluscos colhidos e 7 (18%) foram do tipo antrópico com 588 (18,3%) de moluscos. (Figuras 2.5 e 2.6).

Capítulo 2

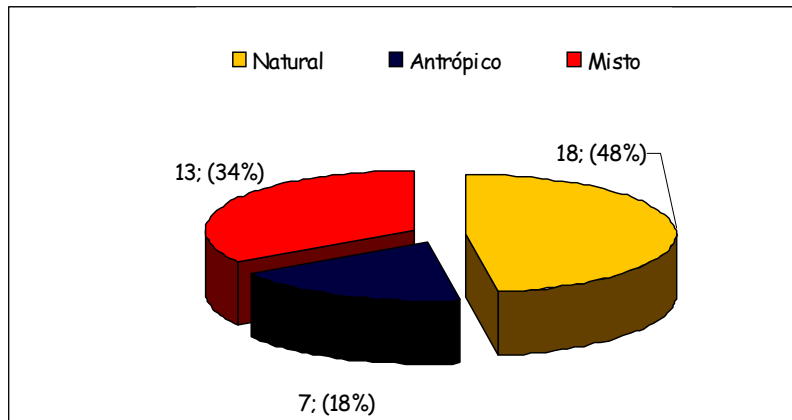


Figura 2.5 – Número e porcentagem de habitats estudados e sua natureza.

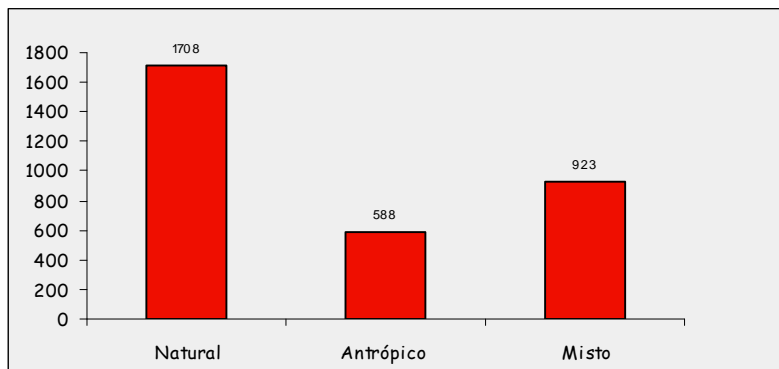


Figura 2.6 - Número de moluscos colhidos e natureza dos habitats.

A associação entre a natureza dos habitats e o número de moluscos colhidos não foi significativa. Comparando o número mediano de moluscos nos três tipos de natureza dos habitats, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, aplicando o teste de Kruskal-Wallis ($P=0,354$), atendendo ao número de observações efectuadas em cada habitat.

2.3.2.2 - Tipos físicos dos habitats

Com base nos critérios estabelecidos por Azevedo *et al.* (1961), quanto ao tipo físico, os habitats foram caracterizados com base nos dois grupos descritos anteriormente, o natural e o antrópico. Assim, no grupo dos habitats naturais salientam-se os rios e ribeiras (os) (Figura 2.7 A), os pequenos caudais de água (Figura 2.7 B), os charcos (Figura 2.7 C) e as poças (Figura 2.7 D). No segundo grupo, antrópico, temos os canais de irrigação e os tanques (Figuras 2.7 E e F, Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Distribuição e número de *P. metidjensis* colhidos, segundo o tipo físico dos habitats e o número total de observações.

Tipo físico do habitat	Nº de habitats	Nº total de observações nos habitats	Total de moluscos	Média de moluscos/Obs.
Pequeno caudal de água	6	14	175	3,6
Rio	1	1	28	28
Ribeiro(a)	22	108	2365	3,45
Tanque	3	3	273	91
Canal de irrigação	2	4	89	11,1
Charco	2	4	167	20,9
Poça	2	4	122	15,3
Total	38	138	3219	24,8

No tipo físico dos habitats, o ribeiro (a) foi o que apresentou o maior número de habitats estudados (n=22) e 108 observações, seguindo-se o pequeno caudal de água (n=6) e 14 observações, o tanque (n=3) com 3 observações, e o canal de irrigação, o charco e a poça com 2 habitats e 4 observações cada. O rio foi o que teve apenas um habitat e uma observação.

Capítulo 2

No que respeita à densidade de moluscos por habitat, no ribeiro colheram-se 2365 (73,47%) moluscos, seguindo-se o tanque com 273 (8,48%), o pequeno caudal de água com 175 (5,43%), o charco com 167 (5,18%), o canal de irrigação com 89 (2,76%) e, por fim, o rio com apenas 28 (0,86%) moluscos.

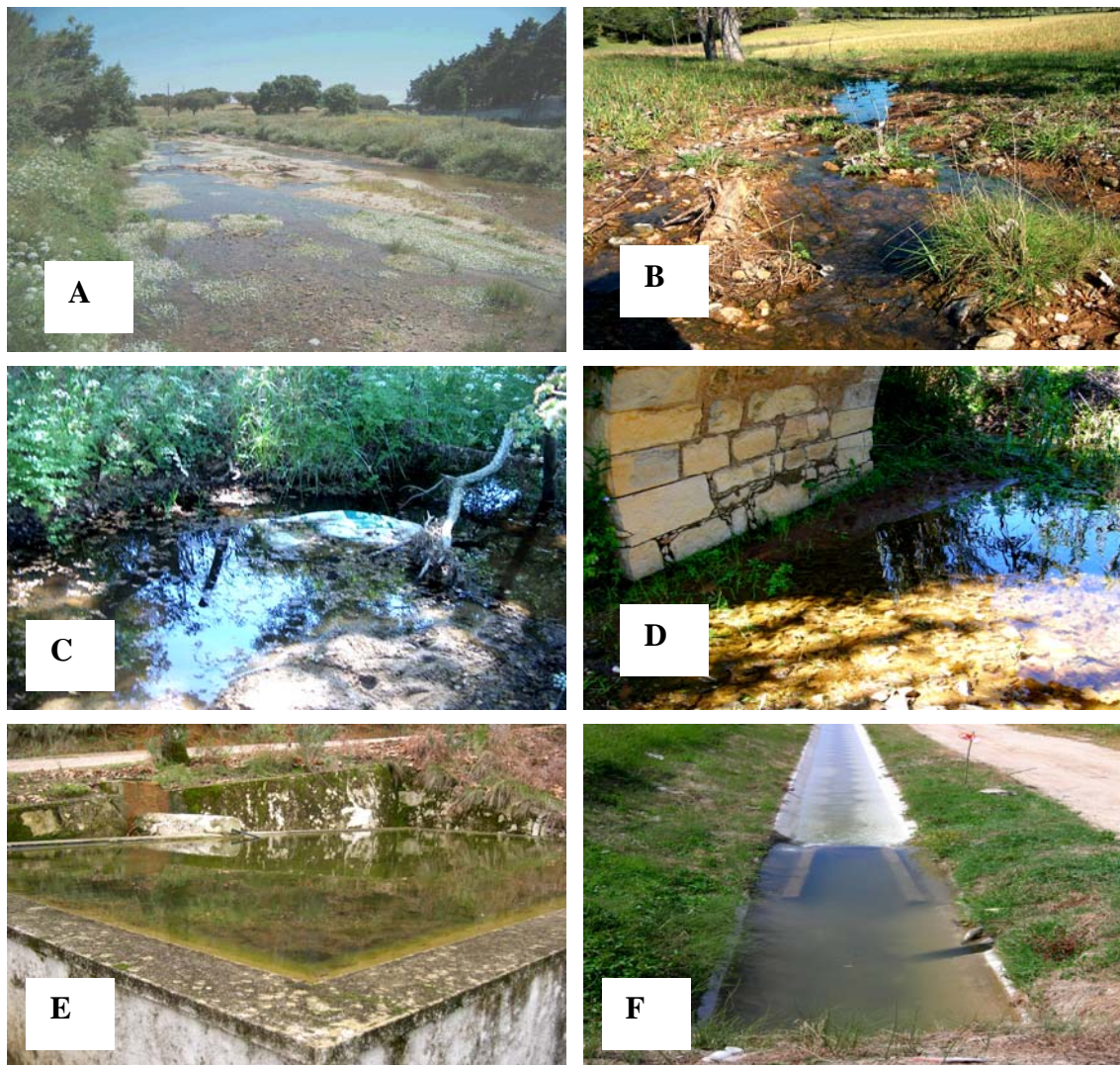


Figura 2.7 - Tipo físico dos habitats. **A** – Ribeira (Ribeira de Valverde); **B** - Pequeno caudal de água (Alqueva); **C** – Charco (Alcáçovas); **D** – Poça (Souselas); **E**- Tanque (Grândola); **F** – Canal de irrigação (Binanciate).

A relação entre o número de moluscos colhidos em cada habitat e o seu tipo físico não foi estatisticamente significativa ($P=0,491$).

2.3.2.3. - Carácter do habitat

Com base no tipo de escoamento da água, os habitats classificaram-se em **permanentes**, quando o escoamento se processa durante todo o ano, independentemente da diminuição ou não do caudal entre os períodos de Verão e Inverno e **temporários** quando são influenciados directamente pela quantidade de precipitação e capacidade de retenção de água. Dos 38 habitats estudados, 21 (55,3%) foram do tipo permanente (Figura 2.8 A) e 17 (44,7%) do tipo temporário (Figura 2.8 B).

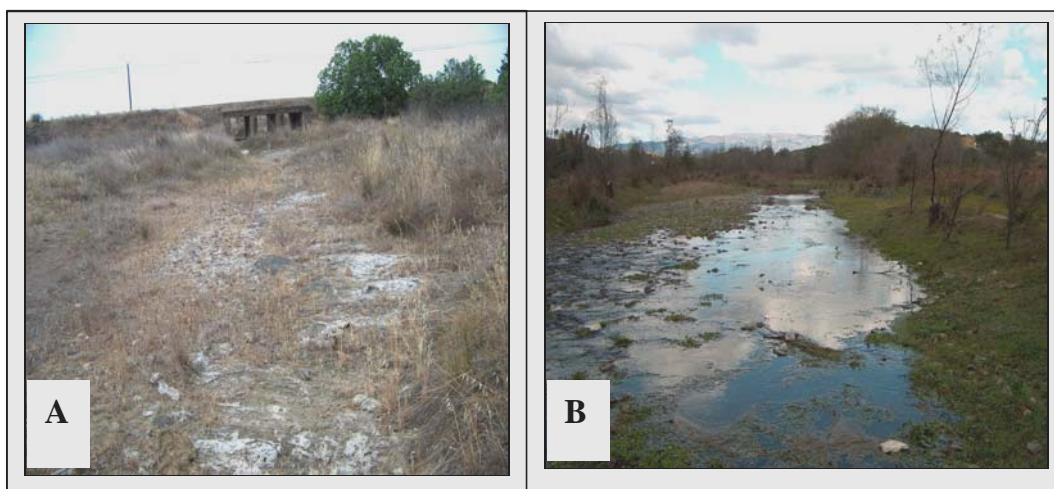


Figura 2.8 – Carácter dos diferentes habitats. **A** – habitat de carácter temporário;
B – Habitat de carácter permanente

No que respeita ao número de moluscos colhidos, nos habitats de carácter permanente foi de 2630 (81,7%) e nos de carácter temporário de 589 moluscos (18,3%) (Figura 2.9).

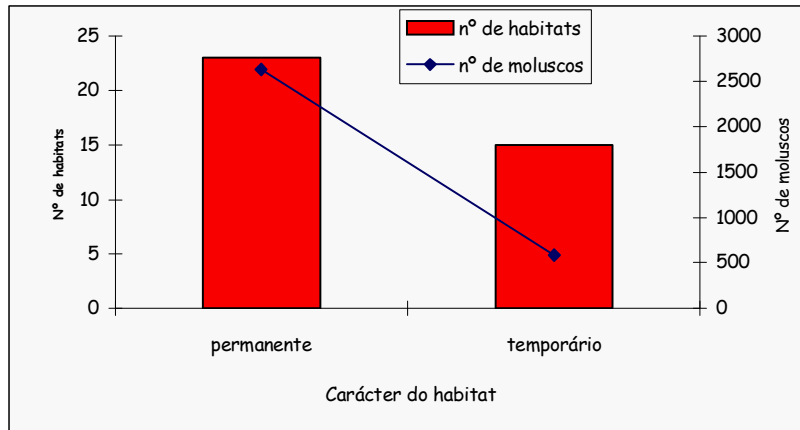


Figura 2.9 - Distribuição dos moluscos segundo o carácter e nº de habitats.

Para o número mediano de moluscos colhidos e tendo em conta o número de observações efectuadas em cada habitat, o carácter do habitat não difere significativamente, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($P=0,366$).

2.3.3. - Aspectos bio-ecológicos dos habitats

Foram analisados alguns dos factores bióticos e abióticos que influenciam os habitats, assim como a densidade dos moluscos. No que respeita aos factores foram analisados a temperatura da água e o seu pH, o tipo de vegetação na água e em volta do habitat, o tipo de substrato e a exposição solar a que estavam sujeitos.

Relativamente à temperatura, verificou-se que a temperatura média da água foi de 17° C, sendo a mínima de 11° C e a máxima de 27° C (Tabela 2.4).

No que respeita aos valores do pH encontrados nos diversos habitats, oscilaram entre 5,4 (mínimo) e 8,1 (máximo), enquanto a média foi de 6 (Tabela 2.4). No que se refere ao tipo de vegetação na água e em volta do habitat, esta foi bastante variável. A vegetação presente nas colecções de água foi diversificada, tendo-se registado como

Capítulo 2

espécie mais característica *Nasturtium aquaticum* R Br (agrião vulgar). As lentilhas de água (*Lemma minor*), estavam presentes em quase todos os habitats. Nas margens observaram-se algumas árvores de grande porte, tais como pinheiro manso (*Pinus spp*), choupos (*Populus alba*), sobreiro (*Quercus suber*), figueiras (*Ficus carica*), entre outras. No que concerne a plantas rasteiras encontradas nas margens dos habitats, salientamos o tremoceiro (*Lupinus spp*), o trevo (*Melilonus spp*) e a salva (*Salvia spp*).

O tipo de vegetação, quer na água quer em volta do habitat, não influenciou o número de moluscos colhido em cada um deles, como foi mostrado com o teste de Kruskal-Wallis: $P=0,509$ para a vegetação em volta do habitat e $P=0,452$ para a vegetação na água. Quinze habitats apresentaram o substrato constituído por húmus, matéria em decomposição e areia, seguido de treze habitats que apresentaram todos os tipos de substrato, ou seja, o substrato era formado por rochas, argila, matéria em decomposição, húmus e areia, cinco cujo substrato era formado apenas por rochas, enquanto três apresentavam substrato formado apenas por húmus e dois por argila (Tabela 2.4, Figura 2.10).

Tabela 2.4 – Caracterização dos habitats com base nos factores ambientais estudados.

Distrito	Habitat	Temperatura Média da H ₂ O (°C)	pH (média)	Tipo de vegetação na água	Tipo de vegetação no habitat	Tipo de substrato	Exposição solar
Beja	Alqueva	12	6	nula	não apresenta	húmus	fraca
Beja	Alvito	24	6,5	emergente	pouco	Húmus+mat. em decomposição+areia	total
Beja	Penilhos (1)	27	6,7	nula	pouco	rocha	total
Beja	Penilhos (2)	27	6,7	nula	pouco	rocha	total

Capítulo 2

Tabela 2.4 (Cont)- Caracterização dos habitats com base nos factores ambientais estudados.

Distrito	Habitat	Temperatura Média da H2O (°C)	pH (média)	Tipo de vegetação na água	Tipo de vegetação no habitat	Tipo de substrato	Exposição solar
Coimbra	Rib. Eiras (1)	13	7,4	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Coimbra	Rib. Eiras (2)	13,5	7,4	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Coimbra	Rib. S. Paulo (1)	12	7	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Coimbra	Rib. S. Paulo (2)	13	7	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Coimbra	Rib. Souselas (1)	16	6,75	emergente	muita	rocha	fraca
Coimbra	Rib. Souselas (2)	16	6,75	emergente	muita	rocha	fraca
Évora	Mitra	15	7,5	todos	muita	todos	total
Évora	Rib. Alcaçovas	23	6,5	imersa	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	fraca
Évora	Rib. Escoural	19,3	6,5	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	parcial
Évora	Rib. S. Lourenço (Mourão)	17,3	7	nula	não apresenta	rocha	parcial
Évora	Rib. Valverde	16,6	7,25	todos	muita	todos	total
Faro	Binanciate (1)	15,5	7	imersa	pouca	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Faro	Binanciate (2)	15,5	7	imersa	pouca	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Faro	Pincho (1)	11	6,4	todoas	muita	todos	total
Faro	Pincho (2)	11,5	6,4	todos	muita	todos	total
Faro	Pincho (3)	11	6,2	imersa	muita	todos	total
Faro	Porto de Lagos	19	6,5	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	parcial
Faro	Rib. Altura	23	7,1	imersa	pouca	argila	parcial
Faro	Rib. Boina	18,3	7,6	todos	muita	todos	total
Faro	Rib. Monchique	16	8,1	flutuante	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	parcial
Faro	Rib. Seco (Estói)	18	7,2	todos	muita	todos	parcial
Faro	Rib. S. B. Alportel	23	6,4	todos	muita	todos	parcial
Faro	V.Lobo(Algarve)	23	7,5	nula	pouca	húmus+mat. em decomposição+areia	parcial

Tabela 2.4. (cont.) -Caracterização dos habitats com base nos factores ambientais estudados.

Distrito	Habitat	Temperatura Média da H2O (°C)	pH (média)	Tipo de vegetação na água	Tipo de vegetação no habitat	Tipo de substrato	Exposição solar
Guarda	Rebolosa	18	6,2	imersa	não apresenta	húmus	total
Guarda	Rio Côa (Sabugal)	18	7,5	todos	muita	todos	total
Lisboa	Rib. Caneças	23	7,5	imersa	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	parcial
Lisboa	V. Lobos (Sintra)	19	7,3	todos	muita	todos	total
Portalegre	Esperança	24	7	todos	muita	todos	parcial
Portalegre	Portalegre	26	7,5	todos	muita	todos	total
Setúbal	Monte Novo (Grândola)	19	6,5	nula	não apresenta	argila	total
Setúbal	Rio da Figueira	18	7,5	todos	pouca	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Setúbal	Sesimbra	19	7,2	nula	muita	todos	total
Viseu	Rib. Rebordal	15	5,5	todos	muita	húmus+mat. em decomposição+areia	total
Viseu	S. Cassurões	13	5,4	imersa	não apresenta	húmus	fraca

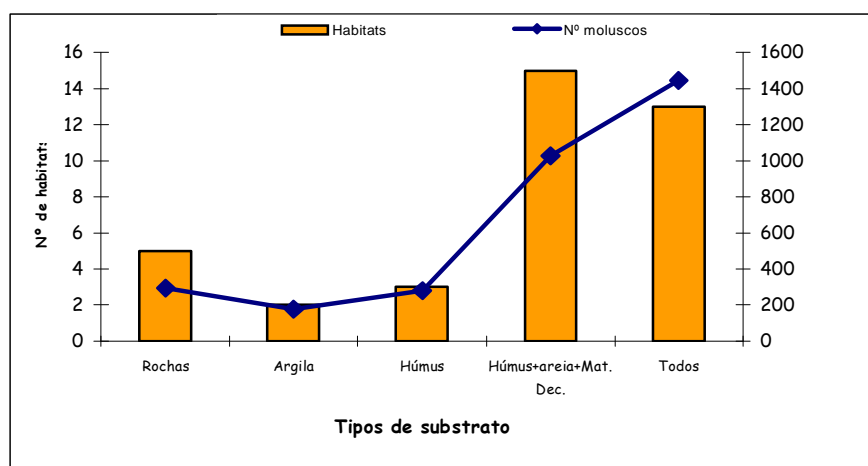


Figura 2.10 – Número de habitats e os diferentes tipos de substrato.

Capítulo 2

Apesar do número de moluscos colhidos aumentar com a composição do substrato, isto é, o substrato que apresentava uma composição mais completa (todos), foi aquele onde se colheu o maior número de moluscos ($n=1444$), a relação entre estes dois factores não foi estatisticamente significativa quando se aplicou o teste Kruskal-Wallis ($P=0,375$).

Na exposição solar, 22 habitats (57%) apresentaram exposição solar total, 12 (32%) exposição solar parcial e 4 (11%) exposição solar fraca (**Figura 2.11**).

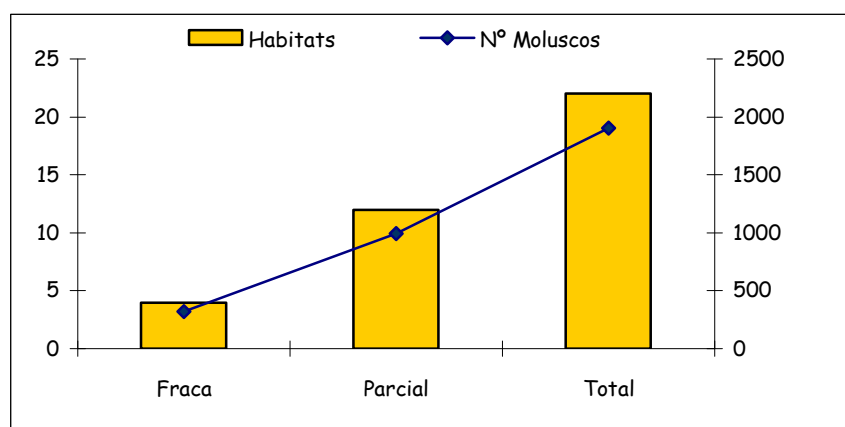


Figura 2.11 – Habitats e número de moluscos colhidos com base na exposição solar,

Os resultados da relação entre o número de moluscos colhidos nos habitats sujeitos a diferentes tipos de exposição solar não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($P=0,477$).

A maior ou menor distribuição sazonal dos moluscos está relacionada também com a média de precipitação que caiu em cada um dos trimestres. Verificou-se que o maior número de moluscos ocorreu durante o segundo trimestre (1344; 41,8%) diminuindo drasticamente durante o terceiro trimestre (505; 15,7%). Dá-se um ligeiro aumento do número de moluscos quando aparecem as primeiras chuvas, ou seja no quarto trimestre (571; 17,73%) aumentando, depois durante o primeiro (799; 24,82%) (**Figura 2.12**).

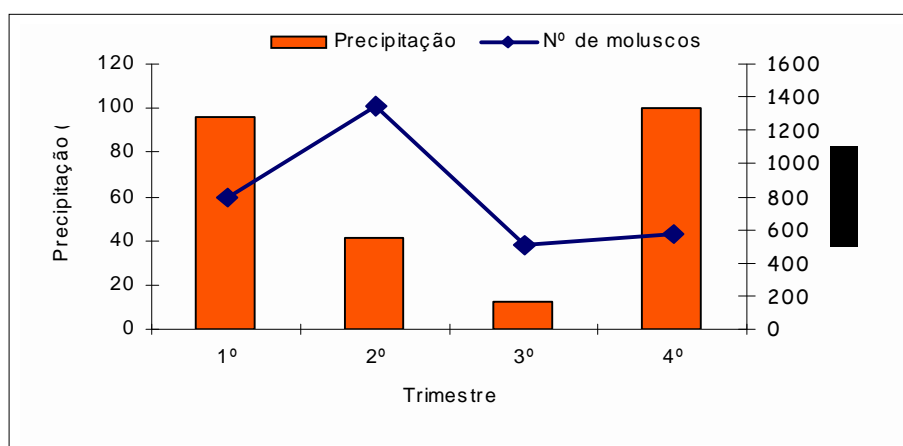


Figura 2.12. Variação do número de moluscos com a precipitação durante os quatro trimestres. (Dados obtidos no Instituto do Ambiente (1961-1990).

Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a média de precipitação/trimestre e o número de moluscos colhidos nos habitats em estudo ($R=-0,83$; $P=0,619$).

2.4 - Discussão e Conclusões

Nos diferentes distritos onde foram identificados os habitats de *P. metidjensis*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma* spp, encontraram-se, na sua maioria, habitats do tipo ribeiro e de condições naturais.

Verificou-se que na época de verão há uma diminuição drástica no número de moluscos nos habitats e, em alguns casos, acabam mesmo por desaparecer. Neste último caso, voltam a repovoar o habitat com a queda das primeiras chuvas. Azevedo *et al.* (1965) e Brown, (1994), em estudos similares, referem resultados idênticos.

Capítulo 2

Além da variação estacional na abundância de moluscos, observou-se também uma grande variação no número de moluscos presentes em diferentes habitats, com o mesmo tipo físico, carácter e natureza. A Ribeira de Valverde foi um dos casos mais evidentes. Apesar de ter tido o mesmo número de observações que a Ribeira de Escoural, o número de moluscos colhidos foi bastante inferior. Uma das explicações para este resultado poderá estar relacionada com o aparecimento de lagostins (*Procambarus* spp) que são tidos como predadores, e que terão provocado a diminuição e até o desaparecimento de algumas de outras espécies de moluscos existentes neste habitat. Esta hipótese é suportada pelo facto de ter sido demonstrado que a introdução deste predador nos focos naturais de transmissão de schistosomose pode reduzir a densidade populacional do molusco hospedeiro intermediário ou, até levar à sua erradicação (Mkoji *et al*, 1999).

Por outro lado, o desaparecimento temporário do caudal da água, principalmente no período do Verão, também poderá estar relacionado com o pequeno número de moluscos. O mesmo não acontece com a Ribeira de Escoural, tendo em conta que este é um habitat do tipo permanente.

No decurso das nossas observações verificámos que em muitos habitats que secaram apenas se encontraram conchas. Porém, praticamente todas as colecções de água se reconstituíam logo após as primeiras chuvas e o seu repovoamento ocorria rapidamente. Este repovoamento fazia-se, certamente, à custa de alguns moluscos sobreviventes que se teriam abrigado sob qualquer vegetação existente nas margens ou em depressões, ou ainda enterrados no substrato, locais onde as condições de humidade lhes permitiriam sobreviver.

A análise dos nossos resultados mostra-nos que as maiores densidades populacionais e as maiores dimensões dos moluscos são encontrados no primeiro e segundo trimestres do ano.

Kloos, *et al*, (2004), verificaram também que a pluviosidade tem um papel importante na reposição dos habitats, permitindo um aumento da fauna malacologica, para depois se reduzir na estiagem.

Capítulo 2

Embora a análise estatística não demonstrasse que o tipo físico, o carácter e a natureza dos habitats tivessem influência na mediana de moluscos colhidos, na prática verificou-se que os habitats que apresentavam condições ecológicas semelhantes, o número de moluscos colhido era também semelhante. Kloss *et al*, (2004 e 2001), ao estudarem as características físicas dos habitats de *Biomphalaria pfeifferi* e a sua distribuição geográfica na África do Sul, concluíram que o número de moluscos nos habitats tipo ribeiro era mais elevado, por este tipo de habitat reunir as condições necessárias ao bom desenvolvimento daquela espécie. Os resultados por nós obtidos em relação a *P. metidjensis* também nos permitem concluir que os habitats mais favoráveis ao seu desenvolvimento são do tipo ribeiro (a).

O número de moluscos colhidos e a sua relação com os factores bióticos e abióticos, foi variável. Assim, relativamente ao pH, que variou entre 5,4 e 7,6, não houve influência na distribuição e densidade dos moluscos nos diferentes habitats. Azevedo *et al*. (1961) observaram que, em Moçambique, 95% dos moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp encontravam-se em habitats cujo pH oscilava entre 5,5 e 8,2., reforçando, de certo modo, os resultados por nós obtidos no que se refere a este parâmetro. Por outro lado, Brown (1994), na análise das características físico-químicas que influenciam a distribuição dos moluscos dulçaquícolas em África, não considera que o factor pH possa ser relevante.

A temperatura foi considerada por Azevedo *et al* (1961) como o factor climático mais importante no desenvolvimento dos moluscos. A temperatura média por nós observada foi de 18°C, o que significa que se encontra dentro do limite que permite o desenvolvimento dos moluscos_(Wibaux-Charloi *et al*, 1982).

A associação com outros moluscos também não pareceu ser relevante. Apesar da eventual competição entre *P. metidjensis* e as outras espécies encontradas, *Physa* spp e *Lymnaea* spp e *Ancylus* spp, estatisticamente a presença destas espécies não foi significativa em relação ao número de moluscos *P. metidjensis* colhidos ($P=0,356$; Teste de Kruskal-Wallis).

Capítulo 2

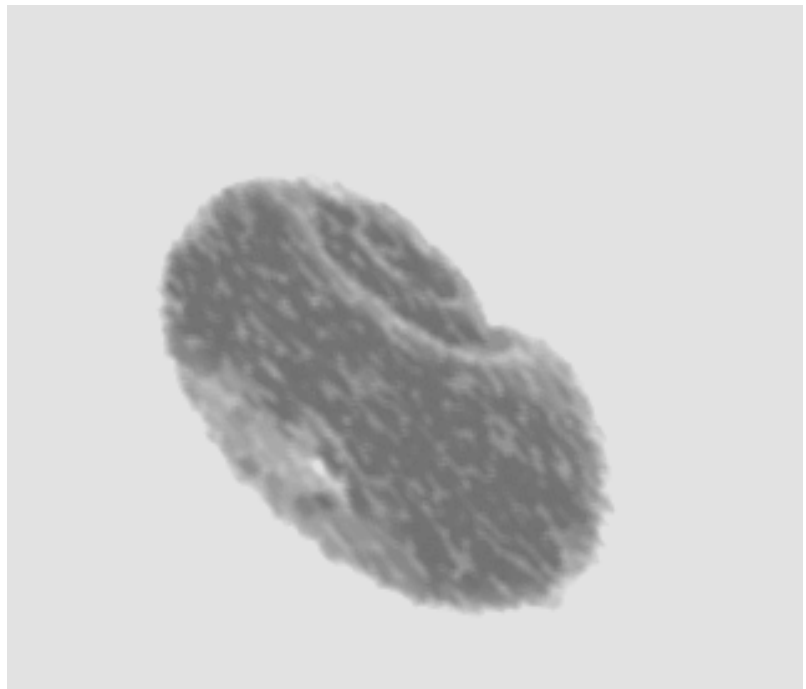
O tipo de vegetação na água e em volta do habitat, é igualmente, um dos factores a ter em conta, pois esta, para além de poder ser o seu alimento é também o local preferencial de posturas. Por outro lado, são também um meio de protecção da radiação solar directa e da velocidade da água (Brown, 1994). No nosso estudo, apesar da maioria dos habitats apresentar exposição solar total, este facto não teve qualquer significado estatístico na densidade populacional dos moluscos, certamente porque os moluscos encontraram forma de se refugiar em locais abrigados ($P=0,345$; Teste de Kruskal-Wallis).

Sobre a distribuição destes moluscos de água doce, em Portugal, verificou-se que continua com larga dispersão no país, como já havia sido descrito por outros autores.

Efectivamente, Augusto Nobre (1941), no seu levantamento malacológico referiu que *P. metidjensis* tinha uma ampla distribuição no território português e Grácio, (1981 e 1983) salientou também a larga distribuição desta espécie nos diferentes distritos de Portugal continental.

A poluição e o aparecimento de predadores (*Procambarus* spp), constituem factores destabilizantes dos habitats que podem afectar, mais ou menos drasticamente, as populações de moluscos como se verificou na ribeira de Monchique (região do Algarve) e na Ribeira de Valverde (região do Alentejo). Face ao exposto, concluímos que *P. metidjensis*, um potencial hospedeiro de tremátodes parasitas do homem e/ou animais, continua a ter uma ampla distribuição em Portugal continental e mantém populações durante todo o ano.

Assim, uma vigilância epidemiológica sobre esta espécie de moluscos é aconselhável tanto mais que as alterações climáticas que se vão observando podem ser favoráveis ao aumento da sua dispersão e da sua capacidade de hospedeiros intermediários.



Capítulo 3

Características morfométricas e a sua variação na população de moluscos de água doce *Planorbarius metidjensis* de Portugal

3.1. Introdução

Os estudos morfométricos da concha dos moluscos foram realizados com o objectivo de obter informações sobre a estrutura das populações e sua dinâmica, e, sobre a distribuição de infecções parasitárias pelos diferentes grupos, factores importantes para a determinação da dinâmica da transmissão de parasitas e para o planeamento de estratégias de luta contra os moluscos (Azevedo *et al*, 1961 e 1965).

O tamanho da concha está relacionado com a idade dos moluscos e, ao mesmo tempo, é influenciado por numerosos factores ligados ao ambiente (alimentação, clima, pH, etc.). Assim, se num dado habitat forem encontrados moluscos bem desenvolvidos, então podemos dizer que esse habitat reúne as condições naturais para o seu desenvolvimento (Azevedo *et al*, 1955 e 1966).

Desta forma, os dados morfométricos referentes aos moluscos de qualquer habitat podem dar-nos referências valiosas sobre a sua evolução (Azevedo & Pequito, 1966; Stothard *et al*, 1997 e Sesen, 2004).

Com a realização deste estudo, pretendeu-se aprofundar a relação entre as características morfométricas das conchas dos moluscos colhidos nos diferentes habitats e as características físicas de cada um dos habitats dos diferentes distritos em estudo.

3.2. Material e métodos

Os inquéritos malacológicos, a identificação dos habitats e a colheita dos moluscos realizaram-se de 2001 a 2005, uma vez por trimestre. Os moluscos foram colhidos segundo a metodologia descrita no capítulo anterior. A densidade dos moluscos foi obtida pelo número total de moluscos colhidos numa área determinada do habitat de acordo com o indicado em Fraga de Azevedo (1961).

No estudo das populações de *Planorbarius metidjensis* incluiu-se:

a) Caracterização e variabilidade das populações de *Planorbarius metidjensis* com base nos seguintes parâmetros: diâmetro maior (D.M), diâmetro menor (D.m), espessura/altura (Esp.), largura da abertura (L.a), altura da abertura (A.a) e o diâmetro do umbilicus. Foi também analisada a relação entre estes parâmetros: D.M/D.m; D.M/Esp, L.a/A.a e D.u/D.M, seguindo a metodologia referida em Fraga de Azevedo (1961) (Figura 3.1).

Na análise das características morfométricas das várias populações foram calculados: média, mediana, desvio padrão e os diâmetros máximo e mínimo. Os exemplares utilizados em microscopia electrónica de varrimento (MEV) foram metalizados com ouro (JOLj FC-1200) e observados num microscópio JOOL, (JSM 5200LVa 15KV).

Com base na dimensão das conchas foi também definida a variabilidade das populações de moluscos nos distritos e nos diferentes tipos de habitat. Os distritos foram agrupados em regiões (com base nas Regiões naturais definidas pelo Instituto do Ambiente) e em relação a estas foi também estudada a variabilidade das populações.

b)- A distribuição das populações por classes, para o que, as populações foram agrupadas em classes de intervalo constante, baseadas nos parâmetros diâmetro maior e diâmetro menor.

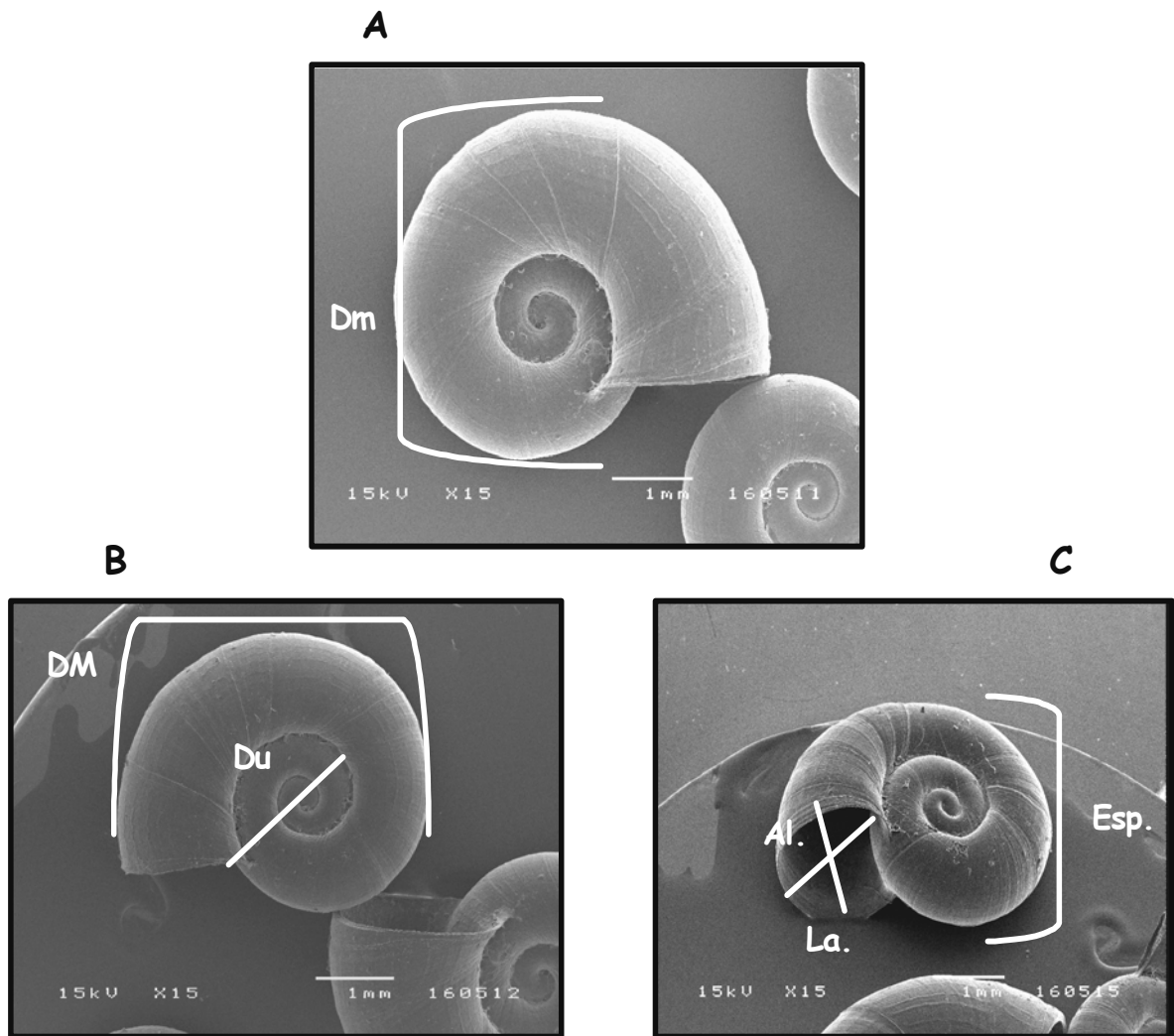


Figura 3.1 – Concha de *P. metidjensis* com alguns dos parâmetros morfométricos.

D.M – Diâmetro maior (largura)

D. m – Diâmetro menor (altura)

L.a – Largura da abertura

A.a – Altura da abertura

D.u. – Diâmetro do umbilicus

Esp. – Espessura (altura)

(Fotografias da autora).

c)- Dinâmica da população, em que foram seleccionadas 4 populações (duas do distrito de Évora e duas do distrito de Faro) nas quais se realizaram 68 observações e se colheu um total de 1557 moluscos.

d)- Análise de dados, em que foi utilizado o mesmo método descrito no capítulo anterior. A análise de grupos (cluster analysis) realizou-se com base na dissimilaridade calculada pela distância euclidiana, utilizando-se como método a distância média entre grupos (Average linkage between groups). Os dendrogramas foram construídos, mostrando a forma de combinação dos “clusters”. Na representação gráfica, os valores dos coeficientes em cada passo do processo foram reescaladas de 1 a 25. Foram utilizados outros métodos cujos resultados foram idênticos aos obtidos.

3.3. Resultados

3.3.1. - Caracterização e variabilidade das populações de *Planorbarius metidjensis* com base nas características morfométricas da concha

A densidade populacional foi calculada de acordo com o número médio de moluscos colhidos durante 30 minutos (Fraga de Azevedo, 1961). No total foram colhidos 3219 moluscos. As conchas dos exemplares estudados, (**Figura 3.1**) apresentaram uma relação entre o diâmetro maior e o diâmetro menor (DM/Dm) de $0,800 \pm 0,095$ (**Tabela 3.1**); o diâmetro menor (Dm) com um valor médio de $7,19 \pm 2,014$, o diâmetro maior (D.M) $8,42 \pm 2,230$, e a altura e a largura da abertura apresentaram um valor médio de $4,315 \pm 0,984$ e $4,687 \pm 0,93$, respectivamente. A relação entre as dimensões globais médias dos parâmetros estudados é apresentada na **Tabela 3.1**.

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Características morfométricas da concha de *Planorbarius metidjensis* nos diferentes distritos de Portugal.

Distrito		D.m	D.M	Esp.	A.a	L.a	D.u	D.M/D.m	D.M/Esp	L.a/A.a	DU/DM
Beja	Mediana	7,70	9,90	4,40	4,00	4,90	4,90	0,78	2,18	1,18	0,06
	Média	7,60	9,56	4,46	4,31	4,83	4,45	0,79	2,15	1,13	0,61
	DP	1,76	2,04	0,81	0,90	1,01	0,81	0,08	0,33	0,13	0,14
	Máx	10,60	12,00	6,00	6,00	6,10	5,90	0,97	3,00	1,27	1,55
	Min.	3,30	4,90	2,70	3,00	3,40	3,00	0,66	1,60	0,91	0,38
Coimbra	Mediana	6,60	8,80	4,00	4,00	4,40	4,00	0,79	2,40	1,00	0,57
	Média	7,76	9,12	3,85	4,50	4,44	3,99	0,78	2,41	1,00	0,57
	DP	2,29	2,59	1,11	1,29	1,20	1,06	0,05	0,33	0,12	0,08
	Máx	14,20	16,60	6,00	7,20	6,60	6,50	0,89	3,00	1,27	0,91
	Min.	2,70	3,30	1,10	2,00	2,00	2,00	0,66	1,67	0,82	0,39
Évora	Mediana	8,70	10,50	4,40	5,50	5,50	5,00	0,81	2,31	1,00	0,53
	Média	8,54	10,53	4,50	5,16	5,18	4,62	0,81	2,33	1,02	0,55
	DP	2,41	2,73	0,84	1,17	1,11	1,06	0,05	0,34	0,15	0,08
	Máx	14,20	16,60	6,00	7,20	6,60	6,50	0,96	3,00	1,45	0,91
	Min.	3,30	5,00	2,70	3,00	3,00	3,00	0,66	1,50	0,80	0,42
Faro	Mediana	8,10	10,50	4,00	5,00	5,50	5,00	0,76	2,22	1,18	0,60
	Média	7,51	9,70	4,34	4,49	5,03	4,38	0,77	2,24	1,13	0,61
	DP	2,10	2,30	0,85	0,94	0,93	0,81	0,10	0,46	0,14	0,12
	Máx	10,60	13,80	6,00	7,20	6,60	6,00	1,75	3,00	1,47	0,91
	Min.	3,30	4,00	2,70	2,00	2,80	2,00	0,61	1,33	0,78	0,36
Guarda	Mediana	6,10	7,20	3,80	3,00	3,75	3,00	0,83	1,89	1,07	0,51
	Média	5,91	7,44	3,78	3,67	3,69	3,26	0,79	1,96	1,03	0,57
	DP	1,50	1,63	0,56	0,91	0,74	0,69	0,07	0,26	0,15	0,13
	Máx	10,00	12,00	5,00	6,00	6,00	5,00	0,85	3,00	1,27	0,91
	Min.	3,30	4,40	2,30	2,70	2,10	2,00	0,66	1,60	0,78	0,44

D.m –Diâmetro menor; D.M – Diâmetro maior; Esp (espessura/altura); A.a – Altura da abertura; L.a – Largura da abertura; D.u – Diâmetro do umbilicus; D.M/D.m – relação entre o diâmetro maior e o menor; D.M/Esp – relação entre o diâmetro maior e a espessura/altura da concha L.a/A.a – relação entre a largura e a abertura da concha; D.u/D.M relação entre o diâmetro do umbilicus e o diâmetro maior

Capítulo 3

Tabela 3.1. (cont.) - Características morfométricas da concha de *Planorbarius metidjensis* nos diferentes distritos de Portugal.

	Mediana	6,60	8,00	4,40	4,90	4,80	4,00	0,78	2,00	1,00	0,70
	Média	7,00	9,12	4,37	4,60	4,79	4,61	0,76	2,10	1,05	0,68
Lisboa	DP	1,85	2,13	0,57	0,78	0,67	1,04	0,06	0,48	0,13	0,11
	Máx	10,00	12,70	5,00	6,00	6,00	5,00	0,87	3,00	1,27	0,91
	Min.	3,30	5,00	3,00	3,00	3,70	3,00	0,66	1,40	0,88	0,51
	Mediana	6,60	8,30	3,90	4,00	4,40	4,00	0,82	2,25	1,14	0,61
	Média	6,75	8,40	3,90	3,98	4,56	4,08	0,80	2,14	1,16	0,63
Portalegre	DP	1,81	2,04	0,73	0,81	0,76	0,75	0,06	0,28	0,13	0,14
	Máx	9,90	12,00	5,00	6,00	6,00	5,50	0,88	2,52	2,00	0,91
	Min.	3,30	4,90	2,70	2,50	3,30	2,50	0,66	1,60	1,05	0,41
	Mediana	7,70	9,10	4,00	4,90	4,40	4,00	0,82	2,12	0,90	0,52
	Média	7,45	8,77	4,34	4,76	4,57	3,97	0,88	2,02	0,98	0,56
Setúbal	DP	2,21	2,57	0,93	1,11	0,93	0,96	0,35	0,38	0,13	0,15
	Máx	11,10	12,70	6,10	6,60	6,60	6,00	2,22	2,76	1,27	0,91
	Min.	3,30	4,00	3,10	3,00	3,00	3,00	0,66	0,82	0,68	0,36
	Mediana	7,80	9,90	5,00	5,00	6,00	5,00	0,79	1,75	1,22	0,61
	Média	7,73	9,54	4,77	4,46	5,27	4,34	0,79	2,01	1,19	0,59
Viseu	DP	2,39	2,20	0,90	1,08	1,12	0,93	0,07	0,35	0,10	0,09
	Máx	10,60	12,00	6,00	6,00	6,10	5,00	0,88	3,00	1,45	0,91
	Min.	3,30	5,00	3,00	3,00	3,30	3,00	0,66	1,50	1,00	0,47
	MEDIANA	7,26	8,42	4,09	4,42	4,75	4,24	0,80	2,14	1,07	0,53
	MÉDIA	7,19	9,05	4,22	4,42	4,69	4,18	0,80	2,15	1,08	0,60
	DP	2,01	2,23	1,08	0,98	0,93	0,90	0,10	0,34	0,13	0,11
	MÁX.	11,42	13,48	5,60	6,32	6,21	5,74	1,12	2,88	1,42	0,97
	MIN.	3,29	4,55	2,61	2,72	3,63	2,65	0,76	1,48	0,85	0,43

D.m –Diâmetro menor; D.M – Diâmetro maior; Esp (espessura/altura); A.a – Altura da abertura; L.a – Largura da abertura; D.u – Diâmetro do umbilicus; D.M/D.m – relação entre o diâmetro maior e o menor; D.M/Esp – relação entre o diâmetro maior e a espessura/altura da concha L.a/A.a – relação entre a largura e a abertura da concha; D.u/D.M – relação entre o diâmetro do umbilicus e o diâmetro maior.

No estudo da variabilidade da concha dos moluscos colhidos (n=3219) os nove distritos estudados apresentaram diferenças inter-populacionais, cuja evidência incidiu nos diâmetros maior (DM) e menor (Dm), enquanto que na largura (La) e altura (Aa) da abertura as diferenças não foram muito evidentes (Tabela 3.1, Figuras 3.2 e 3.3).

Nas relações entre os parâmetros estudados, D.M/D.m, D.M/Esp, La/A.a e D.u/D.M foram também evidenciadas diferenças entre cada um deles. (Figura 3.3).

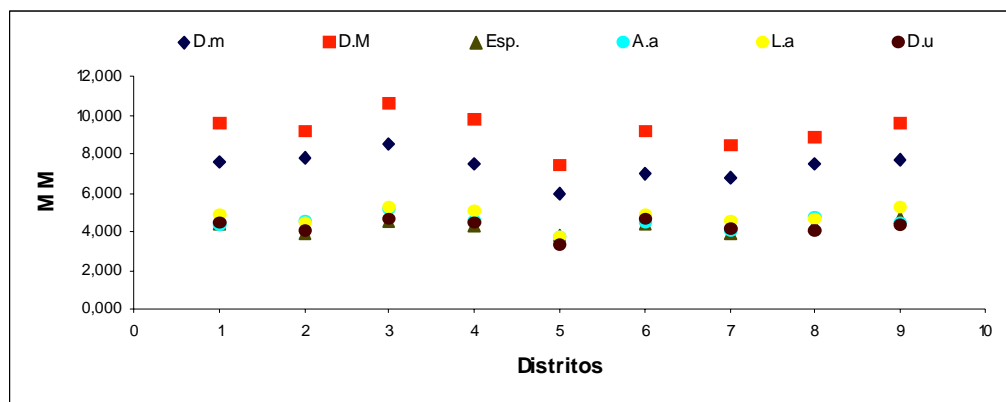


Figura 3.2 – Variabilidade das dimensões da concha de *P. metidjensis* nos diferentes distritos entre cada um dos parâmetros estudados.

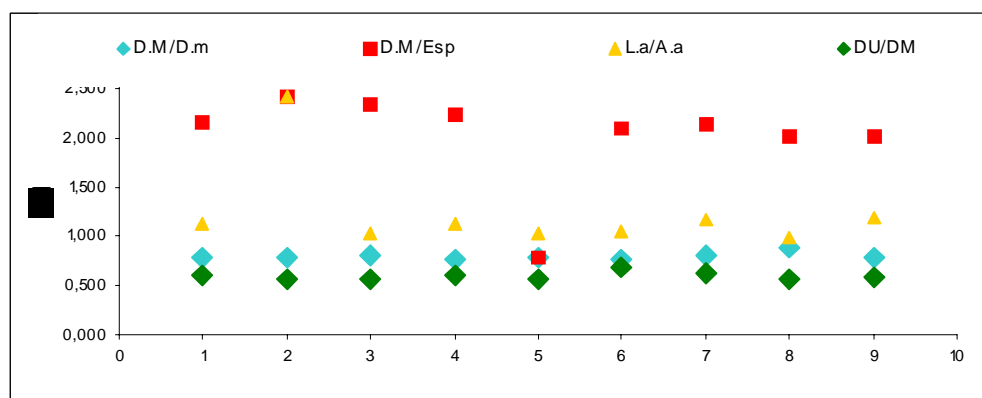


Figura 3.3 – Variabilidade das dimensões da concha de *P. metidjensis* na relação entre cada um dos parâmetros estudados.

1-Beja; 2- Coimbra; 3-Évora; 4-Faro; 5-Guarda; 6-Lisboa;
7- Portalegre; 8-Setúbal; 9-Viseu.

O teste de Kruskal-Wallis, permitiu evidenciar diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$), para todos os parâmetros morfométricos em estudo, dos moluscos colhidos nos habitats dos diversos distritos.

Capítulo 3

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas intra-populações ($P < 0,001$), mas apenas entre os habitats dos distritos de Beja, Coimbra, Évora, Faro, Lisboa e Portalegre. Os habitats dos restantes distritos, nomeadamente, Guarda, Setúbal e Viseu, não apresentaram diferenças intra-populacionais quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis ($P=0,245$; $P=0,321$; $P=0,267$ e $P=0,298$).

A Tabela 3.2 e a Figura 3.4 dão-nos as distâncias inter-distritos, reescaladas e relativas, indicando os graus de similaridade na formação do agrupamento. Quanto menor a distância euclidiana, menor é a diferença (ou maior é a semelhança ou proximidade) entre os distritos. Assim, os distritos de Portalegre e Viseu apresentam uma diferença considerável em relação aos demais distritos. Os distritos de Portalegre e Faro são os que apresentam maiores distâncias (5,381) relativamente aos restantes distritos.

A linha traçada paralelamente ao eixo horizontal (“Linha Fenon”) intercepta três ramos das ligações. Desta forma, de um total de nove distritos analisados, após a classificação, têm-se três novos e distintos agrupamentos formados.

O Grupo I ficou constituído, pelos distritos de Évora, Faro e Beja. O Grupo II pelos distritos de Coimbra, Viseu, Lisboa e Setúbal. Por fim, o Grupo III formado pelos distritos de Guarda e Portalegre. Os distritos que limitam os grupos apresentam estreita similaridade com o grupo vizinho, destacando-se a similaridade do distrito de Beja (Grupo I) com o Grupo II, que é menor do que a similaridade do distrito de Setúbal com o Grupo III. Dos três grupos formados, apenas o grupo I apresentou uma relação geográfica entre os três distritos. No Grupo II, os distritos que o constituem formam dois subgrupos distintos. Um subgrupo formado pelos distritos de Viseu e Coimbra e um outro, pelos distritos de Lisboa e Setúbal. Cada um dos distritos que constitui os subgrupos são geograficamente muito próximos.

Tabela 3.2 – Matriz de dissimilaridade baseada na distância euclidiana para os nove distritos estudados.

Distritos	Distância Euclidiana								
	Beja	Coimbra	Évora	Faro	Guarda	Lisboa	Portalegre	Setúbal	Viseu
Beja	0,000								
Coimbra	2,451	0,000							
Évora	1,495	2,540	0,000						
Faro	1,353	2,760	0,953	0,000					
Guarda	4,313	2,071	4,558	4,733	0,000				
Lisboa	2,957	1,355	2,742	3,252	2,453	0,000			
Portalegre	5,088	2,757	5,091	5,381	1,338	2,670	0,000		
Setúbal	2,474	1,589	2,517	2,757	2,814	1,296	3,098	0,000	
Viseu	1,655	1,215	1,842	2,017	2,928	1,887	3,681	1,751	0,000

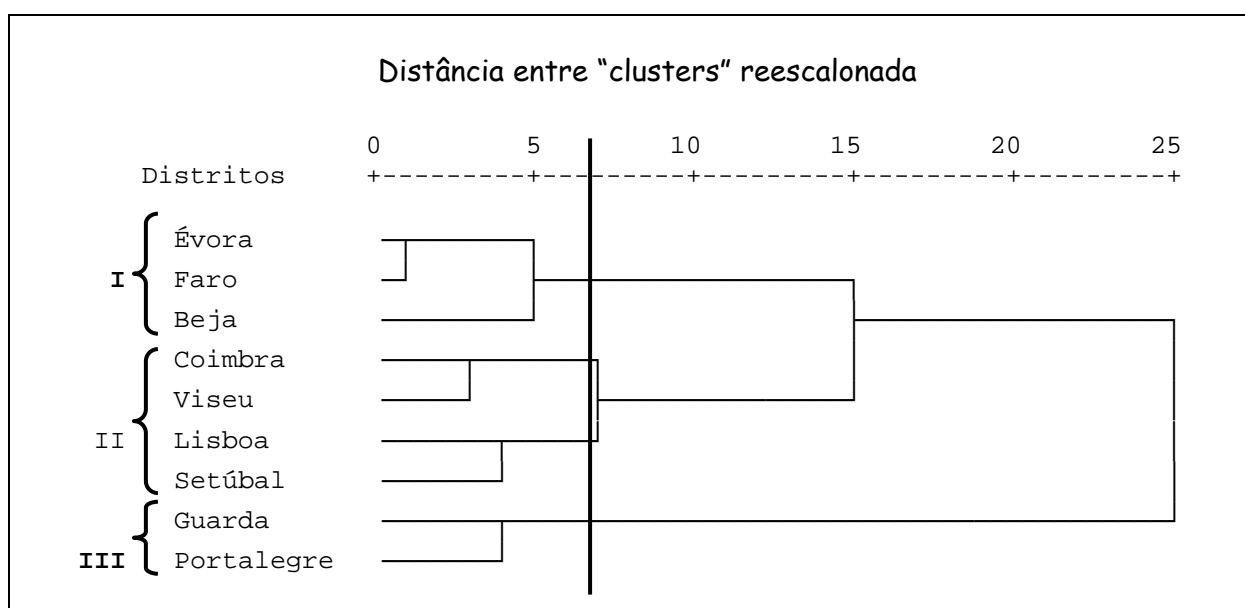


Figura 3.4 – Dendrograma* de dissimilaridade pelo método da distância média entre grupos, baseado na distância Euclidiana entre variação dos parâmetros morfométricos segundo os distritos.

*Terminologia segundo, Branco (2004)

Capítulo 3

Os distritos foram agrupados em áreas geográficas, visto haver razões de ordem ecológica que sugeriram homogeneidade entre alguns deles. Assim, com base no mapa fornecido pelo Instituto do Ambiente, (<http://www.iambiente.pt>) formaram-se 5 regiões em que os distritos de Beja, Évora, Portalegre formaram a região do Alentejo, o distrito de Faro formou a região do Algarve, o distrito de Setúbal formou a região do Sado, o distrito de Lisboa a região da Estremadura e os distritos de Coimbra, Guarda e Viseu formaram a região das Beiras. Ao relacionar as características morfométricas das conchas em cada região podemos verificar (Tabela 3.3), que as do Alentejo e Algarve apresentavam a menor distância (0,587), seguindo-se a região da Estremadura (1,231).

Tabela 3.3 – Matriz de dissimilaridade baseada na distância euclidiana para os nove distritos estudados.

Regiões	Distância euclidiana				
	Alentejo	Algarve	Beiras	Estremadura	Sado
Alentejo	0,000				
Algarve	0,587	0,000			
Beiras	1,859	1,988	0,000		
Estremadura	1,231	1,057	1,467	0,000	
Sado	2,405	2,366	1,353	1,673	0,000

O dendrograma (Figura 3.5) parece apresentar dois “clusters”. As regiões do Alentejo e do Algarve estão muito próximas (fortemente correlacionadas), enquanto que a região do Sado aparece como a região mais distante.

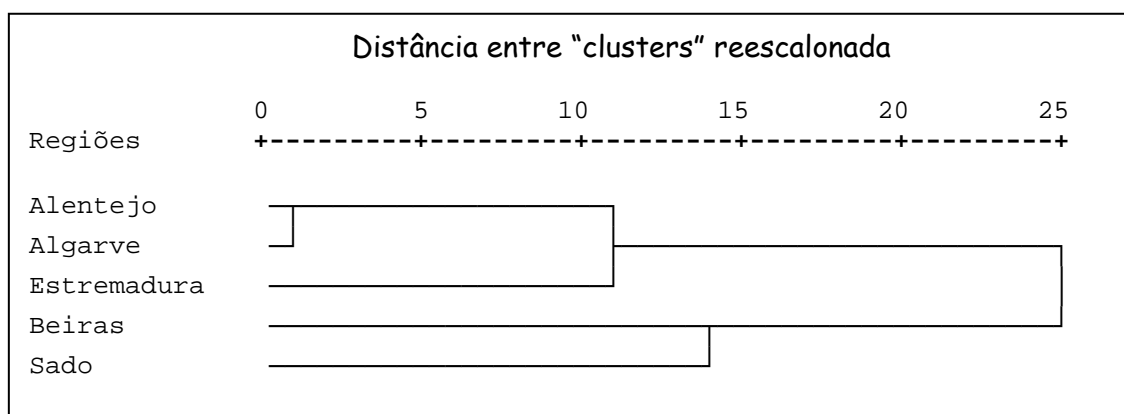


Figura 3.5 - Dendrograma da variação dos parâmetros morfométricos das regiões, pelo método da distância média entre grupos, baseado na distância Euclidiana.

Para explicar as diferenças encontradas entre as dimensões da concha, nos vários tipos de habitats, estes foram agrupados nos diferentes tipos físicos. Na **Tabela 3.4**, estão indicadas as características morfométricas da concha dos moluscos colhidos nos diferentes tipos de habitats. Verificou-se que os moluscos colhidos nos ribeiros (as) e nas poças foram os que apresentaram conchas com maiores dimensões, as quais variaram entre 14,2 mm para o diâmetro menor e 16,6 mm para o diâmetro maior. O charco, o tanque e o rio foram os tipos de habitats onde os moluscos colhidos apresentaram o diâmetro maior com dimensões mais pequenas (12,0 mm).

Na análise da matriz de dissimilaridade (**Quadro 3.5**) e do dendrograma (**Figura 3.6**) podemos observar que o canal de irrigação, é o tipo de habitat considerado o mais distante, relativamente aos demais (4,516). O charco e o ribeiro (a) apresentam uma estreita similaridade (0,985), que é menor do que a similaridade entre o charco e o pequeno caudal de água (1,749). Por outro lado, a similaridade entre os habitats dos tipos ribeiro (a) e rio é menor (2,827) do que a similaridade entre a poça e o canal de irrigação (3,064).

Capítulo 3

Tabela 3.4. - Características morfométricas da concha de *P. metidjensis*, para os diferentes tipos físicos dos habitats.

Tipos de habitat		D.m	D.M	Esp.	A.a	L.a	D.u
Rio (n=28)	Mediana	6,50	7,70	4,00	4,40	3,80	3,00
	Média	5,84	7,50	3,80	4,10	4,30	3,50
	DP	2,45	2,50	0,70	1,10	0,88	0,83
	Máx	10,00	12,00	5,00	6,00	6,00	5,00
	Min.	3,30	5,00	3,00	3,00	3,70	3,00
Ribeiro (a) (n=2365)	Mediana	7,80	9,90	4,00	4,90	4,90	4,40
	Média	7,77	9,70	4,36	4,80	4,90	3,30
	DP	2,36	2,60	0,93	1,14	1,10	0,90
	Máx	14,20	16,60	6,10	7,20	6,60	7,00
	Min.	2,70	3,30	1,10	2,00	2,00	2,00
Pequeno caudal de água (n=175)	Mediana	7,50	8,30	4,00	4,00	4,40	4,00
	Média	7,10	8,70	4,25	4,14	4,60	4,20
	DP	1,65	1,90	0,81	0,90	0,90	0,84
	Máx	10,50	12,70	6,00	6,60	6,60	6,00
	Min.	3,30	4,00	2,70	2,00	2,80	2,00
Canal de irrigação (n=89)	Mediana	9,00	11,00	4,00	5,00	5,50	5,00
	Média	8,49	10,70	4,14	4,83	5,35	4,70
	DP	1,61	1,80	0,42	1,05	0,69	0,77
	Máx	10,50	13,80	5,50	7,20	6,60	6,00
	Min.	3,30	5,00	3,00	3,00	2,90	3,00
Charco (n=167)	Mediana	7,80	9,90	4,40	4,00	4,90	4,00
	Média	7,80	9,80	4,33	4,30	4,87	4,40
	DP	1,80	1,90	0,74	0,91	1,00	0,88
	Máx	10,60	12,00	6,00	6,00	6,10	5,90
	Min.	3,30	4,90	2,70	3,00	3,40	3,00
Poça (n=122)	Mediana	8,00	9,90	4,00	4,90	4,90	5,00
	Média	8,10	10,20	4,40	4,80	5,00	4,30
	DP	2,50	1,70	0,74	1,40	9,90	1,08
	Máx	14,20	16,60	6,00	7,20	6,90	6,50
	Min.	3,30	5,00	3,00	3,00	3,30	3,50
Tanque (n=273)	Mediana	7,20	9,00	4,00	4,40	4,40	4,00
	Média	7,10	8,80	4,43	4,10	4,70	3,90
	DP	2,20	2,10	0,93	1,10	1,30	0,98
	Máx	10,60	12,00	6,00	6,00	6,10	5,00
	Min.	3,30	4,40	2,30	2,70	2,10	2,00
MEDIANA		7,70	9,90	4,00	4,90	4,90	4,40
MÉDIA		7,70	9,60	4,34	4,70	4,87	4,33
DP		2,30	2,50	0,90	1,10	1,10	0,98
MÁX.		14,20	16,60	6,10	7,20	6,60	7,00
MIN.		2,70	3,30	1,10	2,00	2,00	2,00

Capítulo 3

Tabela 3.5 - Matriz de dissimilaridade da distância euclidiana para os diferentes tipos físicos dos habitats

Tipos dos habitats	Distâncias Euclidianas						
	Rio	Ribeiro	P. caudal de água	Canal de irrigação	Charco	Poça	Tanque
Rio	0,000						
Ribeiro (a)	2,827	0,000					
P. caudal de água	1,371	1,926	0,000				
Canal de irrigação	4,516	1,738	3,428	0,000			
Charco	2,839	0,985	1,749	2,042	0,000		
Poça	2,528	1,600	2,304	3,069	1,879	0,000	1,520
Tanque	1,594	1,292	0,860	2,968	1,319	1,520	0,000



Figura 3.6 – Dendrograma da variação dos parâmetros morfométricos segundo o tipo de habitats, pelo método da distância média entre grupos baseado na distância Euclidiana.

Baseado na caracterização do tipo físico de cada habitat (*vide* Capítulo II), aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis cujos resultados permitiram verificar que alguns dos tipos de habitats não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros diâmetros maior (D.M) e menor (D.m) das conchas ($P < 0,001$). Porém, o ribeiro (com 22 habitats caracterizados), o pequeno caudal de água (com seis habitats) e

tanque (com três habitats) apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$).

Os restantes tipos de habitats, como o charco, o canal de irrigação e poças todos eles apenas com dois habitats cada, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando aplicado o teste de Mann-Whitney ($P > 0,001$)

3.3.2. Dinâmica da população de *Planorbarius metidjensis*

3.3.2.1. População de moluscos estudada

A dinâmica da população, flutuação inter-sazonal e inter-anual da população incidiu sobre os 1557 moluscos provenientes das amostras colhidas nos quatro habitats, pertencentes aos distritos de Faro e Évora. Os habitats foram seleccionados com base no número de observações que se realizaram durante 2001 e 2005, num total de 17 observações por habitat, como descrito no capítulo anterior. Os habitats seleccionados foram a Ribeira de Boina e o Ribeiro Seco-Estói no distrito de Faro e as Ribeiras do Escoural e Valverde no distrito de Évora.

Quanto aos exemplares colhidos observou-se a seguinte distribuição:

- a) no distrito de Faro colheram-se 1090 (70%) moluscos, e no distrito de Évora 467 (30%) do total de moluscos ($n=1557$) (Figura 3.7);
- b) a ribeira de Boina foi o habitat que contribuiu com o maior número de moluscos, ou seja, 822 (52,8%), seguindo-se a ribeira do Escoural com 405 (26,0%). A ribeira de Valverde contribuiu apenas com 62 moluscos (4,0%) (Figura 3.8);

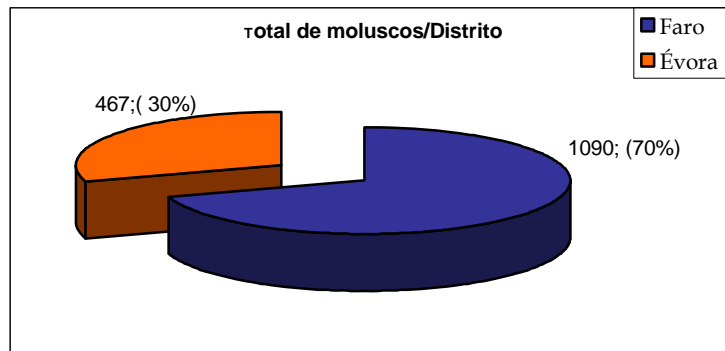


Figura 3.7 - Total de moluscos colhidos por distrito durante 2001 a 2005.

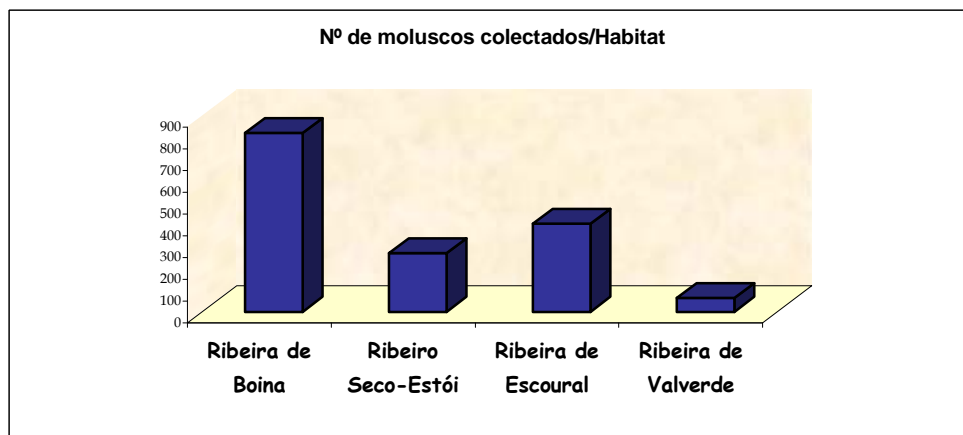


Figura 3.8. - Número de moluscos colhidos por habitat nos anos de 2001. a 2005 (n=1557).

3.3.2.2. - Período de observações.

Quanto ao número de exemplares colhidos observou-se a seguinte distribuição:

a) por ano

O ano de 2002 foi o que mais contribuiu, com um total de 396 moluscos (25,4%), seguindo-se o ano de 2004 com 376 (24,1%) (Tabela 3.6);

Capítulo 3

b) por trimestre

O 2º trimestre, foi o que contribuiu com o maior número de moluscos, ou seja, 663 (42,5%), seguindo-se o 3º trimestre com 352 (22,6%) (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Total de moluscos colhidos por ano e trimestre.

		Trimestre				Total
		1º	2º	3º	4º	
Ano	2001	–	62 (9,35%) * (18,45%) ** (3,98%) ***	63 (17,89%) * (18,75) ** (4,04%) ***	211 (65,12%) * (62,79%) ** (13,55%) ***	336 (21,6%) ***
	2002	87 (39,9%) * (21,96%) ** (5,58) ***	161 (24,28%) * (40,65%) ** (10,34%) ***	113 (32,1%) * (28,53%) ** (7,25%) ***	35 (10,8%) * (8,8%) ** (2,24%) ***	396 (25,4%) ***
	2003	61 (27,98%) * (21,47%) ** (3,9%) **	87 (13,12%) * (30,63%) ** (5,58%) ***	74 (21,02%) * (26,05%) ** (4,75%) ***	62 (19,13%) * (21,83%) ** (3,98%) ***	284 (18,2%) ***
	2004	58 (26,6%) * (15,42%) ** (3,72%) ***	200 (30,16%) * (53,19%) ** (12,84%) ***	102 (28,97%) * (27,12%) ** (6,55%) ***	16 (4,93%) * (4,25%) ** (1,02%) ***	376 (24,1%) ***
	2005	12 (5,5%) * (7,27%) ** (0,77%) ***	153 (23,07%) * (92,72%) ** (9,82%) ***	–	–	165 (10,6%) ***
Total		218 (14,0%) ***	663 (42,6%) ***	352 (22,6%) ***	324 (20,8%) ***	1557 (100%)

* Relativo ao Total/Trimestre.

** Relativo ao Total/Ano.

***Relativo ao Total de moluscos colhidos (n=1557).

Capítulo 3

b) por habitat:

Tabela 3.7 - **Distribuição** total dos moluscos por trimestre (A) e ano (B) nos quatro habitats estudados.

Trimestres	HABITAT				Total
	Ribeira de Boina	Ribeira de Escoural	Ribeiro Seco	Ribeira de Valverde	
1	82 (5,3%)	80 (5,1%)	39 (2,5%)	17 (1,1%)	218 (14,0%)
2	368 23,6%	178 11,4%	108 6,9%	9 (0,6%)	663 (42,6%)
3	210 (13,5%)	90 (5,8%)	52 (3,3%)	0	352 (22,6%)
4	162 (10,4%)	57 (3,7%)	69 (4,4%)	36 (2,3%)	324 (20,8%)
Total	822 (52,8%)	405 (26,0%)	268 (17,2%)	62 (4,0%)	1557 (100,0%)

A)

ANO	HABITAT				Total
	Ribeira de Boina	Ribeira de Escoural	Ribeiro Seco	Ribeira de Valverde	
2001	184 (11,8%)	20 (1,3%)	102 (6,6%)	30 (1,9%)	336 (21,6%)
2002	152 (9,8%)	94 (6,0%)	132 (8,5%)	18 (1,2%)	396 (25,4%)
2003	129 (8,3%)	117 (7,5%)	27 (1,7%)	11 (0,7%)	284 (18,2%)
2004	192 (12,3%)	174 (11,2%)	7 (0,4%)	3 (0,2%)	376 (24,1%)
2005	165 (10,6%)	0	0	0	165 (10,6%)
Total	822 (52,8%)	405 (26,0%)	268 (17,2%)	62 (4,0%)	1557 (100,0%)

B)

A Ribeira da Boina foi o habitat em que o número de moluscos colhidos foi maior com um total de 882 (52,8%) (Tabela 3.7 A e B).

Na Ribeira de Valverde não se observaram moluscos durante o 3º período de observações. O 4º trimestre foi aquele onde se registou o maior número de moluscos

colhidos 36 (58,1%) do total de exemplares aí colhidos (**Tabela 3.7 A**). As diferenças encontradas no número de moluscos colhidos ao longo de cada um dos trimestres foram estatisticamente significativas quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis, ($P < 0,001$).

3.3.2.3. - O desenvolvimento dos moluscos

O estudo referente ao estado de desenvolvimento das populações incidiu sobre a totalidade dos moluscos colhidos nos quatro habitats (n=1557).

Para este estudo, foram seleccionados os diâmetros maiores (D.M) e menores (D.m). Assim, todos os moluscos colhidos foram medidos com um paquímetro (compasso de espessura) e as dimensões agrupadas nas seguintes classes: 3,0-6,0 mm; 6,1-9,0 mm; 9,1-12 mm; 12,1-15,0 mm e 15,1-17mm. e as classes: 2,0-5,0 mm; 5,1-8,0 mm; 8,1-11,0 mm; 11,1-14,0 mm e 14,1-17,0 mm, respectivamente.

A Ribeira da Boina foi o habitat que apresentou o maior número de moluscos nas diferentes classes. A classe cujas dimensões estavam entre 9,1mm e 12,0 mm foi a que apresentou um total de 398 moluscos colhidos, seguindo-se a Ribeira do Escoural e o Ribeiro Seco-Estói. (**Figuras 3.8 A e B**).

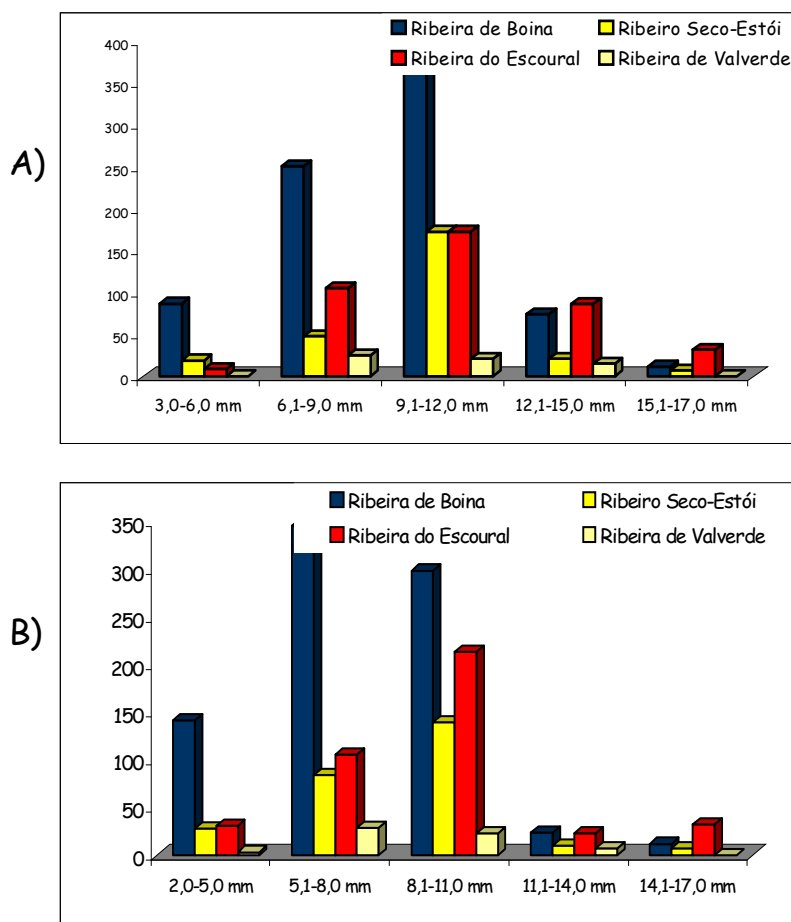


Figura 3.9 - Distribuição do diâmetro maior (A) e do diâmetro menor (B) das conchas de *P. metidjensis* por classes, nos habitats estudados.

No que se refere ao diâmetro menor, a ribeira de Boina também foi o habitat que apresentou o maior número de moluscos nas duas classes: 5,1-8,0 mm com um total de 346 exemplares e 299 exemplares na classe 8,1-11,0mm (Fig.3.9 A).

A distribuição dos moluscos segundo as classes do diâmetro maior e menor permitiu evidenciar que o maior número de moluscos colhidos ocorreu no 2º trimestre (no qual foi colhido o maior número de moluscos), pertencia à classe “média” de dimensão maior (51,5% com 9,1-12 mm). Em relação ao diâmetro menor, o maior número de

Capítulo 3

moluscos colhidos estava incluído na classe “sub-média” (53,2% - 5,1-8,0 mm), também no 2º trimestre (Tabelas 3.8 A e B).

Tabela 3.8 – Distribuição dos moluscos colhidos pelas diferentes classes dos diâmetro maior (A) e menor (B) durante os quatro trimestres estudados.

Dimensões		Trimestre				TOTAL
		1ª	2ª	3ª	4ª	
A) Diâmetro maior	3,0-6,0 mm	28 (11,5%)	7 (1,0%)	62 (19,3%)	18 (6,3%)	115 (7,38%)
	6,1-9,0 mm	59 (24,2%)	248 (35,1%)	68 (21,2%)	54 (18,9%)	429 (27,6%)
	9,1-12,0 mm	103 (42,2%)	364 (51,5%)	131 (40,8%)	167 (58,6%)	765 (49,13%)
	12,1-15,0 mm	44 (18,0%)	74 (10,5%)	47 (14,6%)	32 (11,2%)	197 (12,7%)
	15,1-17,0 mm	10 (4,1%)	14 (2,0%)	13 (4,0%)	14 (4,9%)	51 (3,3%)
TOTAL		244 (15,8%)	707 (45,4%)	321 (20,6%)	285 (18,3%)	1557 (110%)

Dimensões		Trimestre				TOTAL
		1ª	2ª	3ª	4ª	
B) Diâmetro menor	2,0-5,0 mm	54 (22,1%)	23 (3,3%)	94 (29,3%)	32 (11,2%)	203 (13,03%)
	5,1-8,0 mm	50 (20,5%)	376 (53,2%)	136 (42,36%)	88 (30,9%)	650 (41,74%)
	8,1-11,0 mm	118 (48,4%)	283 (40,4%)	50 (15,5%)	138 (48,4%)	589 (43,4%)
	11,1-14,0 mm	12 (4,9%)	11 (1,6%)	28 (8,7%)	13 (4,6%)	64 (4,11%)
	14,1-17,0 mm	10 (4,1%)	14 (2,0%)	13 (4,0%)	14 (4,9%)	51 (3,3%)
Total		244 (15,8%)	707 (45,4%)	321 (20,6%)	285 (18,3%)	1557 (100%)

Quanto à variação dos diâmetros maior e menor verificou-se que o terceiro trimestre foi aquele que apresentou uma maior heterogeneidade. No segundo trimestre, as dimensões das conchas dos moluscos foram mais homogêneas (Figura 3.10). Também se

verificou que a Ribeira de Boina e Ribeiro Seco m foram os habitats que apresentaram maior homogeneidade nas dimensões dos moluscos, enquanto que a Ribeira de Valverde apresentou uma maior heterogeneidade (Figura 3.11).

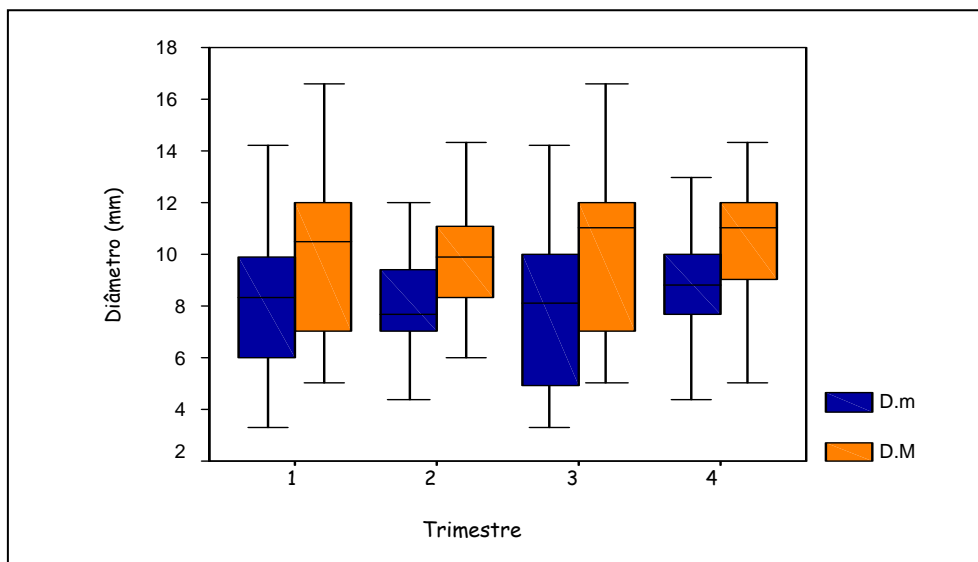


Figura 3.10 – Variação dos diâmetros menor (Dm) e maior (DM) em função do trimestre.

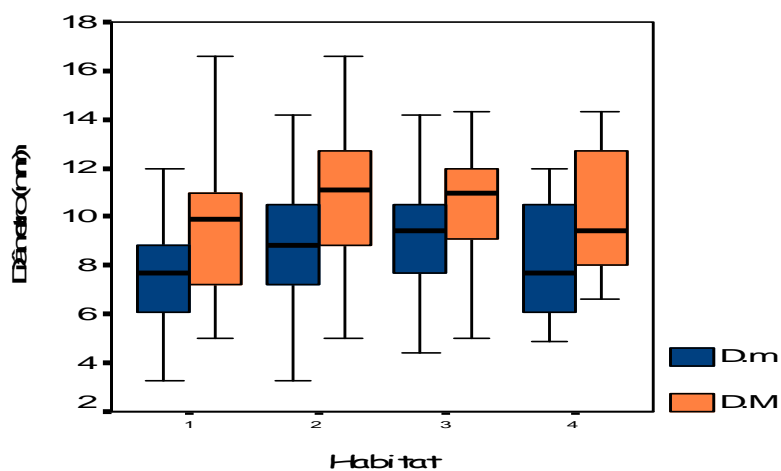


Figura 3.11 – Variação dos diâmetros menor (Dm) e maior (DM) nos diferentes habitats. 1-Rib. Boina; 2-Rib. Escoural; 3-Rib. Seco-Estói; 4- Rib. Valverde.

Na Figura 3.12, podemos verificar que na Ribeira de Boina a amplitude de variação do diâmetro maior da concha de *P. metidjensis* foi bastante grande no 3º trimestre, enquanto que no Ribeiro Seco a maior heterogeneidade verificou-se no 4º trimestre.

A Ribeira do Escoural apresentou uma amplitude mais heterogénea no 2º e 3º trimestres, enquanto no 1º e 4º trimestres a ampliação foi mais homogénea. Na Ribeira de Valverde, devido às características do habitat, não foram encontrados moluscos durante o 3º trimestre, enquanto os 1º e 4º trimestres foram os que apresentaram uma maior amplitude de variação do diâmetro maior.

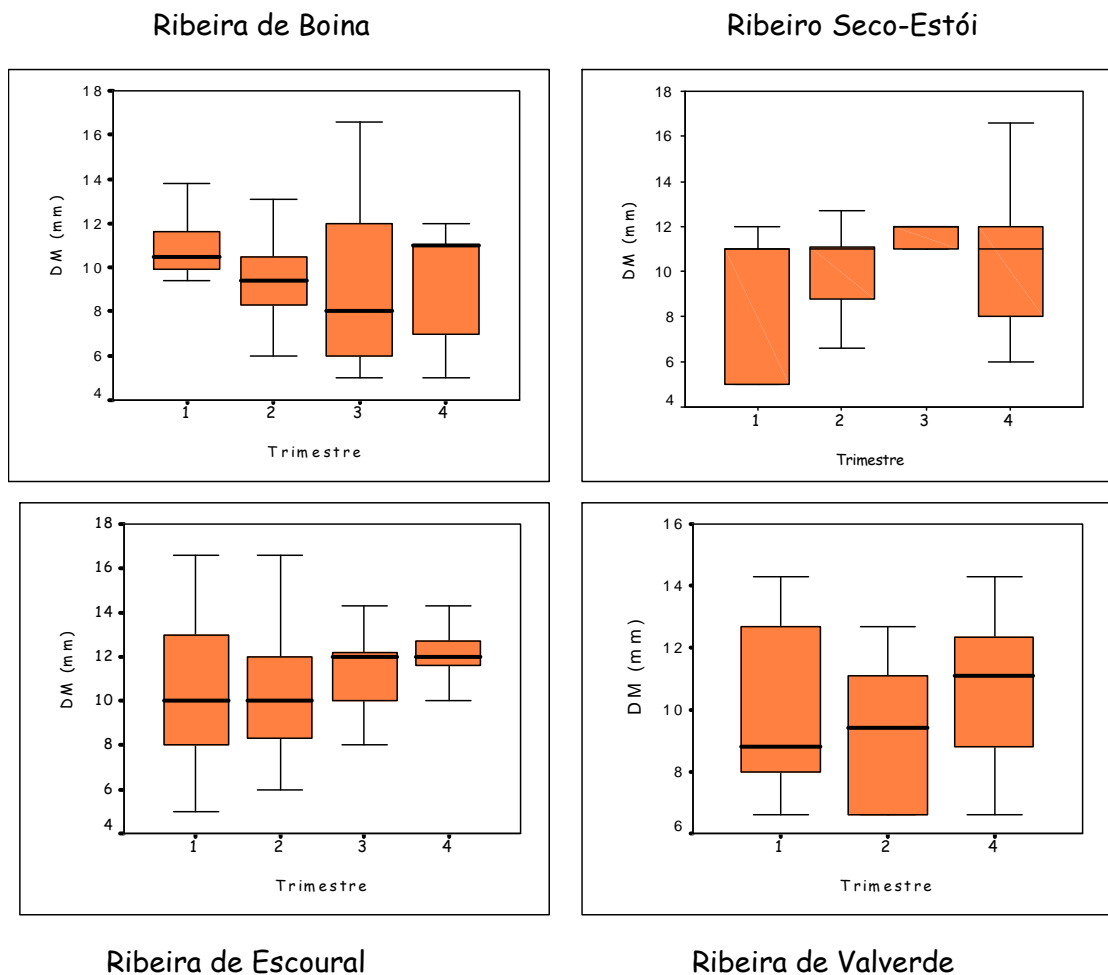


Figura 3.12 – Amplitude da variação do diâmetro maior (DM) da concha de *P. metidjensis* nos quatro habitats estudados durante o trimestre.

Capítulo 3

Com a exceção da Ribeira de Valverde, a variabilidade do diâmetro maior encontrada em cada um dos habitats para os diferentes trimestres, apresenta diferenças estatisticamente significativas para o teste de Kruskal-Wallis, ($P < 0,001$).

Constatou-se ainda que os diâmetros maior e o menor de *P. metidjensis* estavam altamente correlacionados entre si, (com o coeficiente de correlação de Spearman de 0,948 e $P < 0,001$) (Figura 3.13).

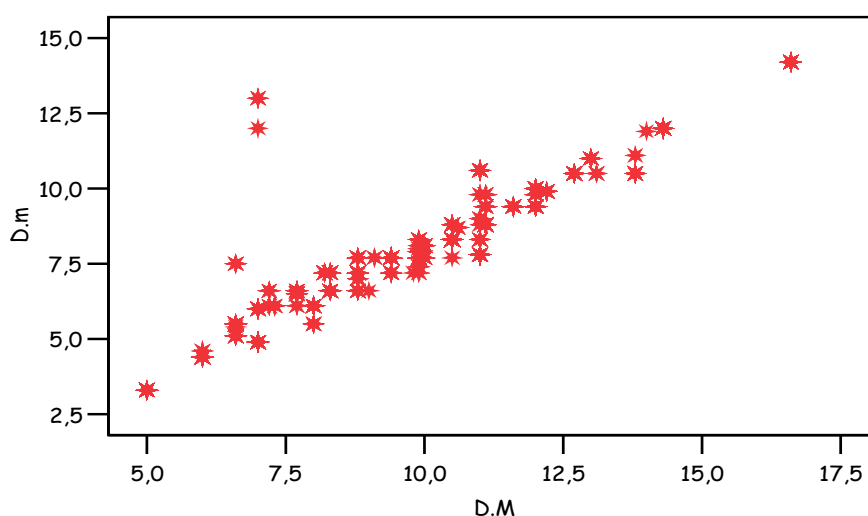


Figura 3.13 – Correlação entre o diâmetro maior e o diâmetro menor da concha de *P. metidjensis* nos quatro habitats estudados.

A variabilidade referente aos dois parâmetros em estudo foi confirmada pelo teste de Kruskal-Wallis, em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em função do trimestre, ano e todos os habitats estudados ($P < 0,001$).

A análise das características morfométricas das conchas dos quatro habitats, mostrou uma estreita similaridade morfométrica entre os moluscos colhidos na Ribeira de Boina e os moluscos colhidos no Ribeiro Seco (1,129). A Ribeira de Valverde apresenta uma diferença considerável, formando um grupo distinto relativamente aos outros três habitats. A distância euclidiana entre a Ribeira de Valverde e a Ribeira de Escoural foi bastante alta (3,741) (Tabela 3.9; Figura 3.14). Este valor elevado, poderá ter uma

justificativa no tipo de habitat que caracteriza a Ribeira de Valverde e a Ribeira de Escoural, sendo um temporário e o outro permanente.

Tabela 3.9. – Matriz de dissimilaridade da distância euclidiana para os quatro habitats em análise.

Habitats	Distâncias Euclidianas			
	Escoural	Valverde	Boina	Estói
Escoural	0,000			
Valverde	3,741	0,000		
Boina	2,701	2,886	0,000	
Estói	3,015	3,064	1,219	0,000

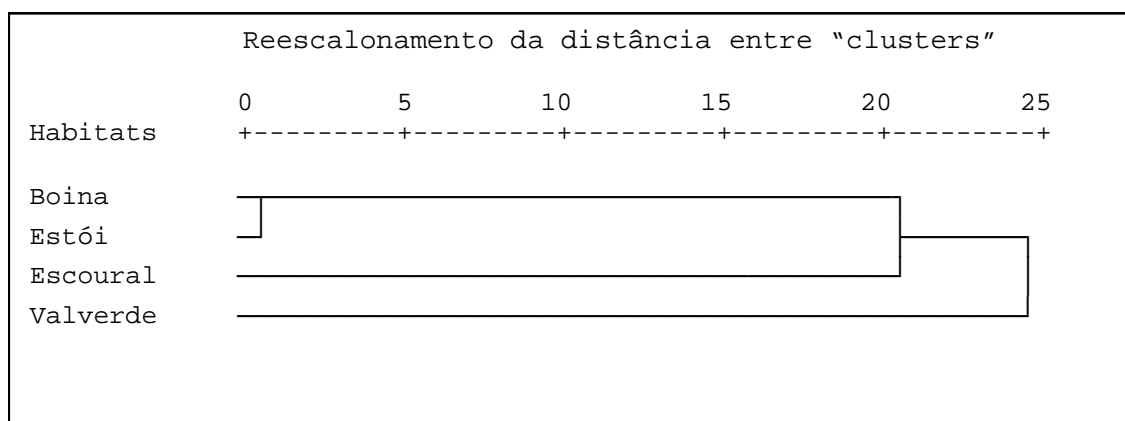


Figura 3.14 – Dendrograma da distância euclidiana obtido pelo método da média entre grupos para os quatro habitats.

Atendendo a que a variabilidade encontrada nas populações de moluscos estudadas, quer seja ela intra-população ou até mesmo, inter-população, estará também relacionada com as condições ecológicas de cada um dos habitats estudados, seleccionámos para o estudo, a temperatura da água e a exposição solar como factores abióticos e o tipo de vegetação no habitat e na água como factor biótico e o tipo de substrato.

Os factores temperatura da água e exposição solar, apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$).

O tipo de vegetação na água e no habitat não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, Por outro lado, a quantidade de vegetação e o tipo de substrato do habitat, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$), relativamente às dimensões.

3.4. - Discussão e Conclusões.

As características das conchas dos moluscos são usadas frequentemente para diferenciar populações ou até espécies dentro do mesmo género (Stothard *et al*, 1997). Estudos similares ao aqui apresentado foram realizados com moluscos de água doce pertencentes aos géneros *Biomphalaria* e *Bulinus*, tendo sido possível a obtenção de dados para um melhor entendimento sobre a relação dos moluscos com as condições ecológicas dos seus habitats e, também, ao seu desenvolvimento sexual e idade, factores importantes quando se trata de moluscos potenciais hospedeiros intermediários de tremátodes, nomeadamente, de *Schistosoma* spp (Azevedo *et al*, 1961, 1957).

Os moluscos de água doce *P. metidjensis* apresentam, por vezes, conchas com “grandes” dimensões e são habitantes típicos de pequenas colecções de água as quais podem ser de carácter permanente ou temporário.

A maior variação nas dimensões dos moluscos, verificadas no 2º trimestre, poderá ser justificada pelas chuvas que ocorreram durante o primeiro trimestre, as quais teriam possibilitado a reposição das populações de moluscos nos locais habituais. Verificou-se que os moluscos apresentaram diferentes ritmos estacionais, baixando o seu número com a diminuição da quantidade de água e aumentando quando a reposição da quantidade de água era favorável ao seu desenvolvimento e a manutenção do habitat.

Capítulo 3

Também Gaud (1958) ao estudar o comportamento de duas espécies distintas de hospedeiros intermediários de *S. haematobium* do mesmo local de Marrocos, *B. truncatus* e *P. metidjensis*, observou que apresentavam diferente ritmo estacional. Enquanto que o primeiro apresentava actividade reprodutiva quase nula de Dezembro até Maio, o segundo era mais frequente na Primavera e quase desaparecia no Verão. Isto porque o maior volume de água que ocorre durante os dois primeiros trimestres, favorece o crescimento e a fecundidade dos moluscos, permitindo que os moluscos já adultos possam produzir maior número de posturas e de ovos e os jovens vão ter o seu ritmo de crescimento mais acelerado. Dado que a maturidade sexual do molusco está ligada ao seu tamanho e não à sua idade, os moluscos jovens iniciaram muito cedo a deposição de posturas. Estes dois factores, contribuem para o aumento rápido da densidade dos moluscos.

Com a diminuição da precipitação, começa a baixar o nível de água nos habitats, assistindo-se a uma redução da área do habitat acabando mesmo, por vez, por desaparecer. (*vide* Capítulo II). Pode acontecer que à medida que vai baixando o nível de água haja uma maior concentração de moluscos contribuindo assim, para um aumento da sua densidade populacional durante um curto período de tempo. Foi o que aconteceu na Ribeira de Boina em que o maior número de moluscos colhidos ocorreu no segundo trimestre, devido à diminuição do caudal de água houve uma redução na dispersão dos moluscos e como consequência, a densidade dos moluscos no habitat também aumentou. Contudo, a competição pelo alimento exercida quando o número de moluscos aumenta devido a uma diminuição da área disponível, poderá levar a uma redução rápida e drástica do número de efectivos. Trabalhos realizados em laboratório sobre os efeitos da densidade populacional sobre o crescimento e desenvolvimento dos moluscos permitiram concluir que estes quando sujeitos a uma grande aglomeração, apresentam uma inibição do crescimento e alteração da fecundidade (Simões *et al*, 1974).

Também o tamanho médio das conchas de *P. metidjensis*, coincide com a descrição feita por Nobre em 1941. Este autor refere ter encontrado conchas de grandes dimensões, o que mais tarde foi corroborado por Fraga de Azevedo, *et al*, (1948) e Grácio, (1983). No

Capítulo 3

presente estudo o tamanho máximo encontrado nos distritos de Coimbra e Évora variou entre 16,6 mm (DM) e 14,2 mm (Dm) (Tabela 3.1).

A variabilidade encontrada nas características morfométricas da concha de *P. metidjensis* nos diferentes distritos, permitiu evidenciar dois grupos distintos, em relação à proximidade dos valores encontrados. O primeiro, engloba as regiões do Alentejo, Algarve e Estremadura e o segundo grupo, as regiões do Sado e das Beiras. Geograficamente a região do Sado está mais próxima da região do Alentejo do que da região das Beiras apesar das distâncias nos indicar uma maior proximidade com a região das Beiras. O tipo físico dos habitats e as características morfométricas das conchas dos moluscos colhidos, parecem ser os factores que expliquem esta proximidade.

Em relação aos tipos físicos dos habitats verifica-se que foi nos pequenos caudais de água e nos tanques que se encontram os moluscos biometricamente mais próximos entre si, seguindo-se os ribeiros e os charcos. Este facto, pode explicar-se por os ribeiros (de carácter permanente na sua maioria) e os charcos (de carácter temporário), apresentarem características idênticas que permitem um melhor desenvolvimento dos moluscos relativamente aos outros tipos de habitats. Também outros factores ligados ao habitat (elementos químicos, fauna, flora, temperatura, etc.) poderão explicar as diferenças encontradas.

Nos quatro habitats seleccionados, verificou-se que o número de moluscos foi maior nos dois primeiros trimestres, coincidindo estes com o período das chuvas. É durante este período que se verifica a consolidação dos habitats e o aumento da reprodução. Alguns estudos correlacionam o início das chuvas e o aumento da actividade reprodutiva das populações, cujo estímulo poderá estar associado ao aumento da área do próprio habitat, a adição de suplementos alimentares e à diminuição de substâncias nocivas (Brown, 1994).

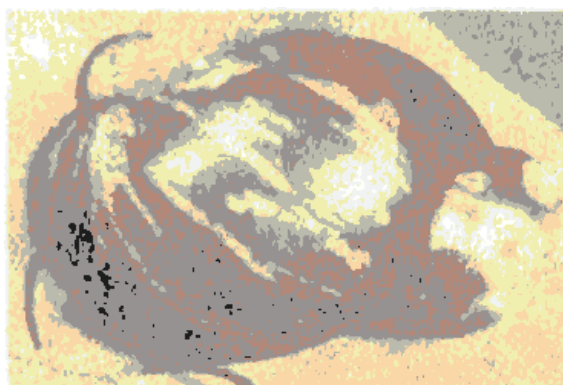
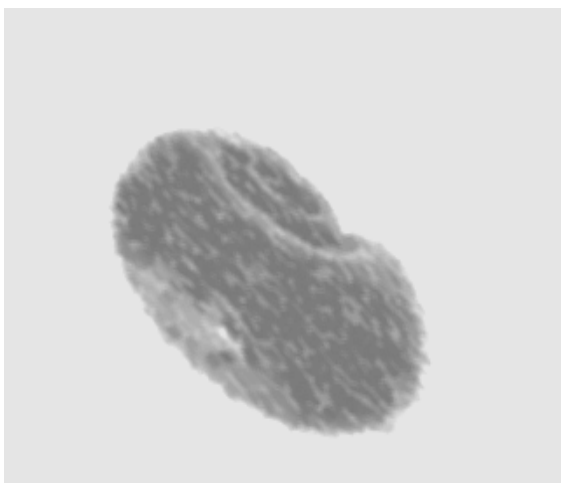
A heterogeneidade encontrada nas dimensões das conchas do Ribeiro Seco e da Ribeira de Valverde, sugere a existência simultânea de várias gerações de moluscos, apesar de serem habitats de carácter temporário, em que durante o período de Verão o número de

Capítulo 3

moluscos diminuí drasticamente, no caso, do Ribeiro Seco ou como na Ribeira de Valverde em que não é possível encontrar moluscos durante os 2º e 3º trimestres.

Nas Ribeiras de Boina e Escoural encontram-se moluscos durante todo o ano, havendo uma diminuição durante o período de Verão, o que poderá explicar-se pelas alterações das características físicas dos habitats, tais como, a diminuição do caudal de água e da vegetação e o aumento da temperatura da água.

P. metidjensis mostrou-se bem adaptado aos tipos de habitats permanentes e temporários, estando presente durante todo o ano nos distritos estudados, havendo nas suas populações heterogeneidade de dimensões que permitem desempenhar o papel de hospedeiros intermediários de tremátodes. Estes resultados parecem estar de acordo com os de outros estudos realizados, com *P. metidjensis*, hospedeiro intermediário, de *Schistosoma haematobium* em Marrocos, os quais permitiram confirmar a grande capacidade de adaptação que estes moluscos têm a diferentes tipos de habitats e de climas (Yacoubi *et al*, 2007).



Capítulo 4

Planorbarius metidjensis e *Bulinus truncatus*:
infecção natural e experimental

4.1. Introdução

Uma das principais características da associação tremátode-molusco está relacionada com a sua especificidade (*vide* Capítulo I). Embora, o grau de especificidade do tremátode pelo hospedeiro possa ser influenciado por diferentes factores (ecológicos, etiológicos e fisiológicos), terá também uma forte componente imunológica. Este facto sugere que mecanismos da capacidade infectante específicos e difíceis de compreender têm evoluído entre o grande grupo de tremátodes digenea, e, de forma idêntica, os moluscos têm desenvolvido mecanismos de defesa eficazes contra os tremátodes (van der Knaap & Loker, 1990).

A relação hospedeiro-parasita tem por base a interacção entre as estratégias de sobrevivência do parasita e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Woolhouse & Webster, 2000). O sistema de defesa dos moluscos, que embora não possua muitos dos elementos do sistema imune inerentes aos vertebrados (linfócitos, imunoglobulinas, anticorpos específicos e memória imunológica), consegue distinguir o “próprio” do “não próprio” e constituir um obstáculo ao desenvolvimento do parasita.

A maioria dos resultados descritos até ao momento foram obtidos em modelos experimentais, em que foram utilizados o molusco *B. glabrata* e *S. mansoni* ou várias espécies de *Echinostoma*, com estirpes do hospedeiro seleccionadas intensivamente, pela sua capacidade de resistência ou susceptibilidade de infecção (van der Knaap & Loker, 1990).

Sendo o *P. metidjensis* um potencial hospedeiro intermediário de *S. haematobium* em Marrocos (Moukrim *et al*, 1996 e Yacoubi *et al*, 1999), e de *S. bovis* em Espanha (Ramajo-Martin & Simon-Vicent, 1988) vários estudos experimentais têm vindo a ser desenvolvidos com o objectivo de averiguar qual o grau de susceptibilidade desta espécie de molusco ao parasita e efeitos no seu desenvolvimento (Xavier & Azevedo, 1965; Silva *et al*, 1974, Simões e Medeiros, 1980 e Zekhnini *et al*, 2002).

Capítulo 4

O presente trabalho foi planeado, com o objectivo de avaliar a susceptibilidade de *P. metidjensis* descendentes de moluscos colhidos em diversos habitats de Portugal continental (*vide* Capítulo II) e de *B. truncatus* (mantidos em condições laboratoriais) a diferentes espécies de *Schistosoma* e a sua capacidade de eliminação de cercárias.

4.2. - Material e métodos

A pesquisa de moluscos infectados por formas larvares de *Schistosoma spp* e de outros tremátodes foi efectuada por eliminação espontânea de cercárias e por estudos histológicos.

Após terem sido colhidos nos seus habitats naturais, os moluscos foram transportados para o laboratório. Seguidamente, os moluscos foram colocados em tubos de Willis com 15 ml de água morna e deixados sob uma fonte de luz durante 2 horas. Terminado esse período os moluscos eram observados individualmente com o objectivo, de verificar se as partes moles apresentavam ou não esporocistos e se eliminavam ou não cercárias. Os moluscos positivos foram separados para estudos posteriores e aqueles em que não foi possível observar esporocistos foram deixados durante mais alguns dias para que, se infectados, viessem a eliminar cercárias.

Posteriormente, procedeu-se à identificação das cercárias, que foram montadas entre lâmina e lamela e coradas com lugol. Para a medição e observação dos detalhes morfológicos, foram utilizadas 150 cercárias. Os dados obtidos foram comparados com os de Carvalho *et al* (2001), Frandsen & Kristensen (1984).

A infecção experimental dos moluscos decorreu em duas fases. Na primeira fase foram usados 20 exemplares da 1ª geração de *P. metidjensis*, nascidos em laboratório e descendentes dos moluscos colhidos nos vários habitats. Quanto a *B. truncatus*, não tendo sido possível encontrar exemplares vivos durante o período em que se realizou o trabalho de campo, foram utilizados 30 exemplares mantidos no laboratório de Malacologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, colhidos e gentilmente cedidos pela Prof^a

Capítulo 4

Doutora Maria Amélia Grácio. Para a infecção dos moluscos foram usados miracídios que eclodiram dos ovos de *Schistosoma haematobium* recolhidos das urinas de vários pacientes angolanos.

Devido à dificuldade em encontrar doentes infectados com *S. haematobium* e de manter o ciclo de vida deste parasita em laboratório, procedeu-se à segunda fase da infecção experimental dos moluscos com os miracídios que eclodiram de ovos de *S. mansoni* obtidos por infecção experimental de *Mus musculus*. O ciclo de vida de *S. mansoni* é mantido no Laboratório de Malacologia tendo como hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata* e como hospedeiro definitivo *M. musculus*.

Cada molusco a infectar foi colocado num tubo de Willis contendo cerca de 15 ml de água, com uma temperatura entre os 25-27° C e deixados durante a noite para que a infecção se possa efectuar plenamente, sendo o número de miracídios variável de acordo com o plano de trabalho.

Após exposição aos miracídios, os moluscos foram divididos em grupos, segundo a sua origem. Durante o período de observações a temperatura da água dos recipientes oscilou entre 24° C \pm 1° C e receberam como alimento alface fresca. Foram infectados um total de 180 moluscos, sendo 120 *P. metidjensis* e 60 *Bulinus truncatus*. Como controlo utilizaram-se 30 exemplares de *P. metidjensis* e 15 de *B. truncatus*, que foram mantidos nas mesmas condições que a dos infectados.

Para observar a possível eliminação de cercárias, os moluscos foram colocados individualmente, num tubo de Willis com água a uma temperatura entre 26°-28° C, o qual ficou debaixo de um foco de luz artificial durante 2-4 horas.

Durante o período experimental as nossas observações incidiram também em cada um dos grupos na contagem do número de posturas, de ovos e de moluscos que morriam.

Com o objectivo, de obter informação sobre as alterações morfo-histológicas, dos moluscos que se encontravam naturalmente infectados, foram seleccionados 10 exemplares com os quais se fez um exame histológico. Nos ensaios experimentais, seleccionaram-se 3

exemplares com, 24 horas após exposição aos miracídios, 4 exemplares com 48h, 4 exemplares após 96 horas, 4 exemplares após 5 dias e 4 exemplares após 10 dias. Os restantes moluscos expostos a miracídios foram colocados individualmente, duas vezes por semana, sob uma lâmpada durante 2-3 horas para se observar se ocorria a eliminação de cercárias. Os cortes seriados foram corados pela PSB-hematoxilina.

4.3. Resultados

4.3.1. Infecção Natural

Dos 3219 *P. metidjensis* colhidos, 1456 (45,2%) apresentavam esporocistos em diversas partes do corpo, nomeadamente, nos tentáculos (Figura 4.1-1), manto e pé (Figura 4.1-2).

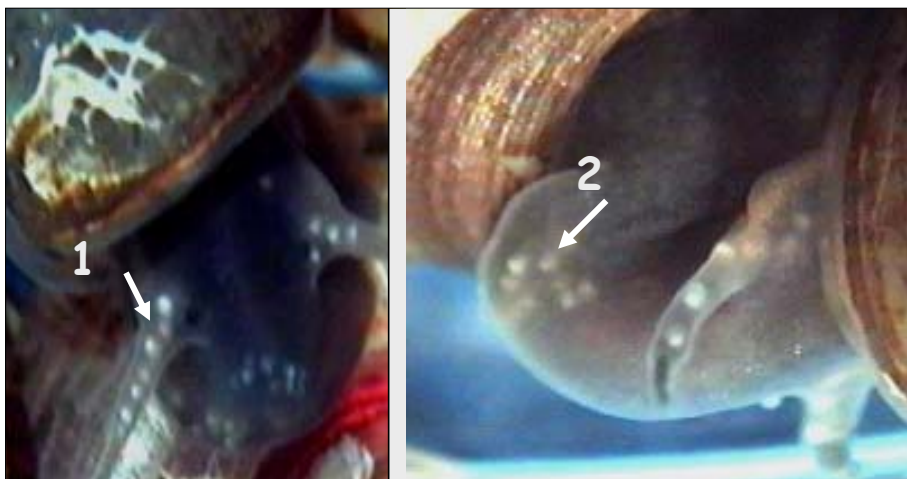


Figura 4.1. – Infecção natural de *Planorbarius metidjensis* (Ampliação 40x).

Capítulo 4

As cercárias eliminadas por estes moluscos foram semelhantes às descritas como sendo xifidiocercárias (Frandsen *et al.*, 1984) por apresentarem uma ventosa oral com um estilete largo e um pouco achatado, a cauda larga com uma membrana terminal pregueada e a faringe e o sistema excretor em forma de Y bem visíveis. Uma vez observadas as xifidiocercárias a serem eliminadas do molusco pelo estímulo luminoso, notou-se que permaneciam nadando, utilizando por vezes a cauda e por outra fixando-se com as ventosas no fundo do tubo, mostrando-se muito activas. Todas estas características estão de acordo com as descritas para as xifidiocercárias (Figura 4.2).



Figura 4.2. – Xifidiocercária eliminadas por *P. metidjensis* colhidos na natureza. (Ampliação 100x)

A – Estilete **B** – Ventosa oral **C** – Ventosa ventral **D** – Cauda

Os cortes histológicos mostraram focos de proliferação e diferenciação de numerosos esporocistos, sem qualquer reacção aparente por parte do hospedeiro, formando por vezes lesões encapsuladas no centro das quais os esporocistos exibiam vários graus de desintegração (Figura 4.3).

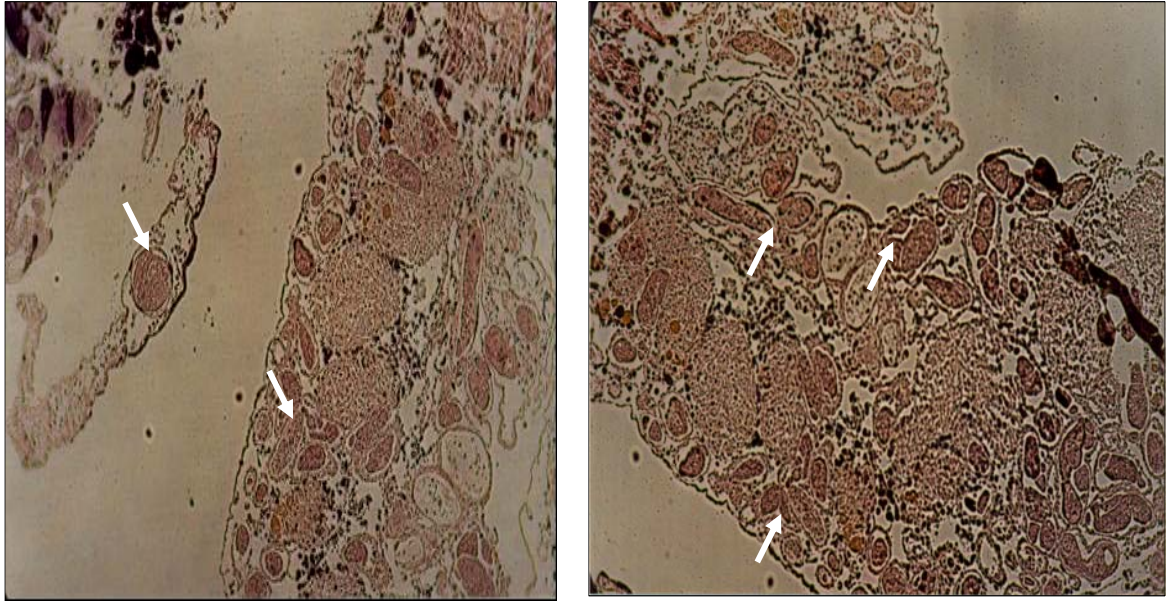


Figura 4.3. – Cortes Histológicos do tentáculo e bordo do manto de *P. metidjensis* (Ampliação 100x). As setas indicam a formação de esporocistos.

4.3.2. - Infecção experimental.

4.3.2.1. - Infecção experimental com *S. haematobium*.

Foram expostos a miracídios de *S. haematobium*, oriundos de Angola, 30 moluscos *B. truncatus* da região do Algarve e 20 *P. metidjensis* das regiões do Alentejo e Algarve. Verificou-se a não susceptibilidade daqueles moluscos à estirpe de *S. haematobium* de Angola.

4.3.2.2. - Infecção experimental com *S. mansoni*.

Os grupos e o número de miracídios a que foram sujeitos 120 exemplares de *P. metidjensis* e a sua origem estão descritos no **Anexo 2 (Tabela A2)**. Foi feito o mesmo procedimento com os 60 exemplares de *B. truncatus*, 50 do Algarve e 10 de Coimbra (**Anexo 3, Tabela A3**).

Dos exemplares de *P. metidjensis* submetidos à exposição a *S. mansoni*, apenas 10 desenvolveram infecção até à fase de esporocisto. Os restantes moluscos acabariam por morrer em diferentes etapas do período de infecção (**Anexo 4, Tabela A4**). Observou-se também que nos moluscos infectados com 5 e 10 miracídios a percentagem da mortalidade foi mais elevada do que nos grupo de moluscos infectados com 8 miracídios.

Devido à elevada taxa de mortalidade que se verificou entre os moluscos expostos, não foi possível determinar o número de posturas e de ovos eclodidos.

Nos moluscos que desenvolveram infecção, observou-se alterações, essencialmente, morfo-histológicas, sobretudo a nível da deformação dos tentáculos em diferentes períodos de infecção, evidenciando-se o grau de degradação dos tentáculos à medida que a infecção aumentava (**Figura 4.4**).

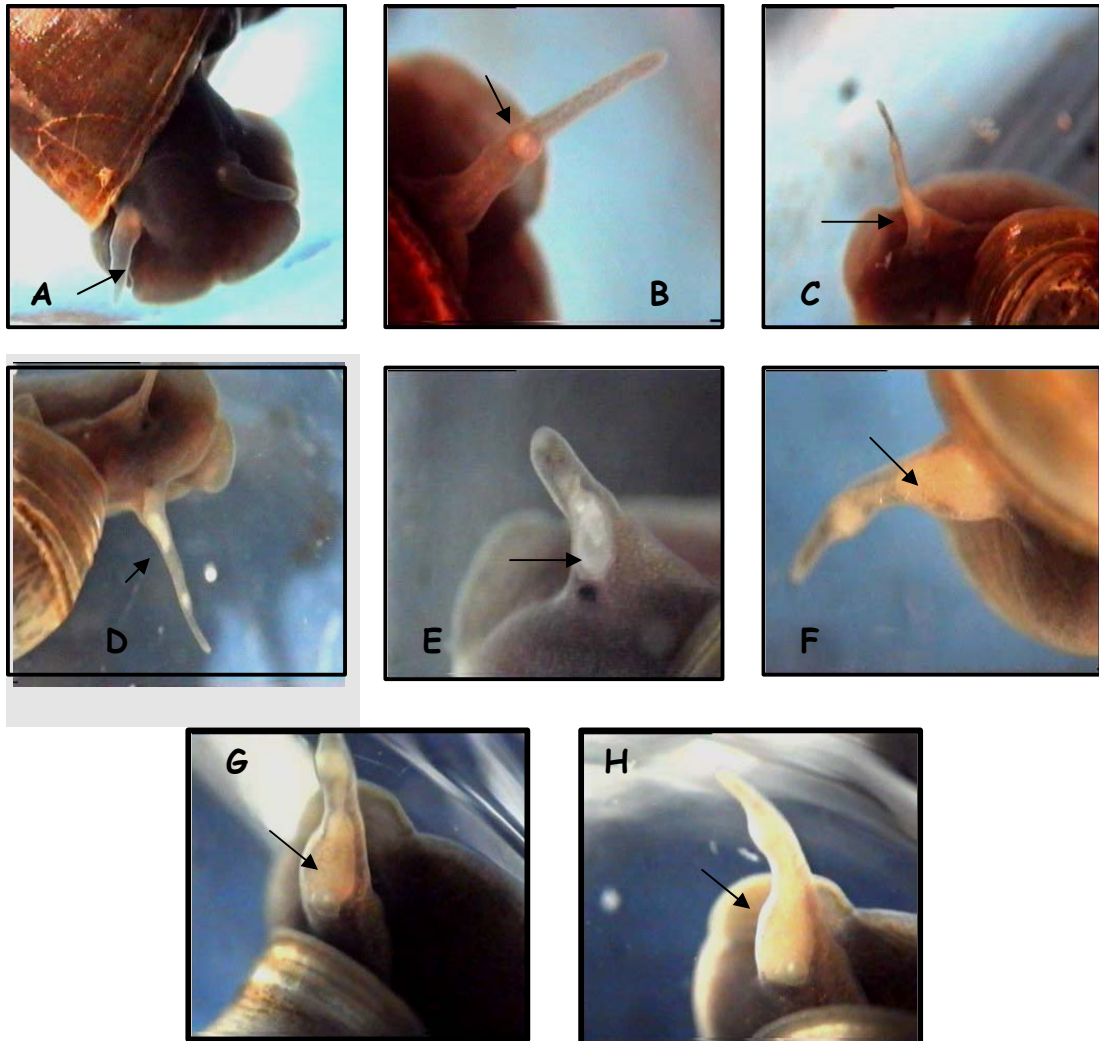


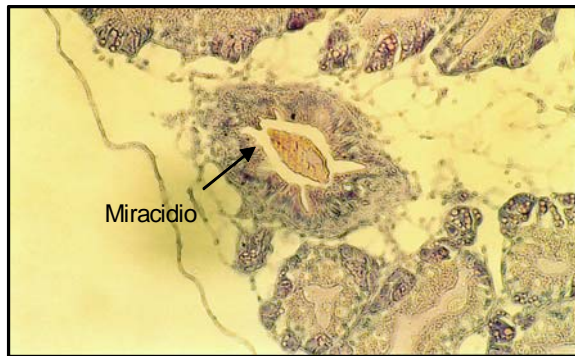
Figura 4.4. – *P. metidjensis* expostos com 8 miracídios de *S. mansoni*.

As setas indicam os diferentes estádios dos esporocistos (Ampliação 40x)

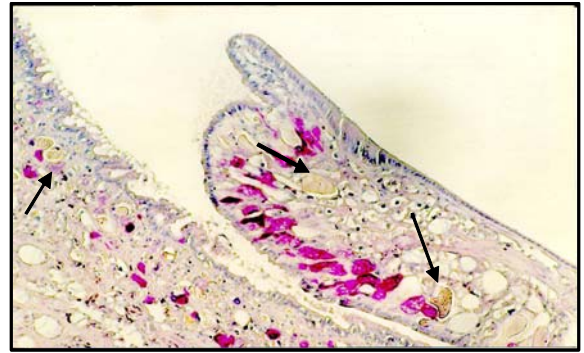
- A**- Ribeira de Escoural (10 dias de infecção);
- B**- Ribeira de Valverde (10 dias de infecção);
- C**- Ribeira de Boina (20 dias de infecção);
- D**- Ribeira de Souselas (20 dias de infecção);
- E**- Ribeira de Escoural (30 dias de infecção);
- F**- Ribeira de Boina (30 dias de infecção);
- G**- Ribeira de Boina (35 dias de infecção);
- H**- Ribeira de Escoural (40 dias de infecção).

Capítulo 4

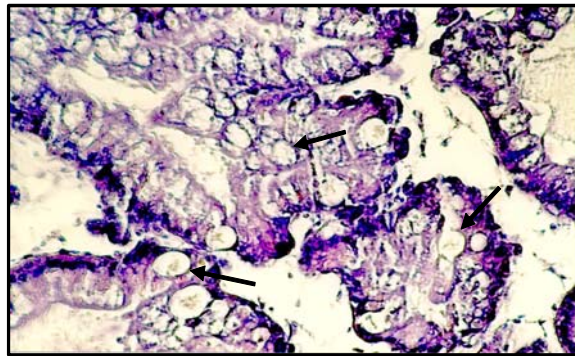
Os estudos a nível histológico mostraram focos de proliferação de esporocistos, sem reacção dos tecidos ou com lesões encapsuladas no centro das quais os esporocistos apresentavam diferentes graus de desintegração variável consoante a fase de infecção. Na (Figura 4.5).



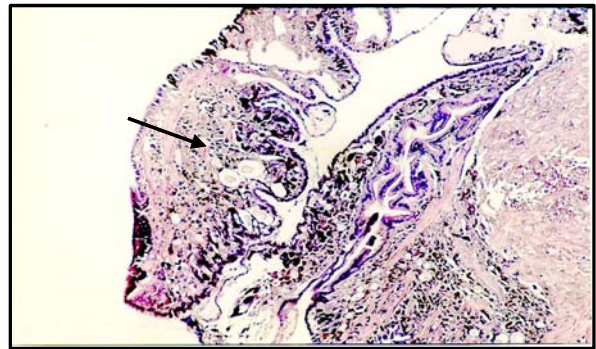
a) 24 horas após infecção



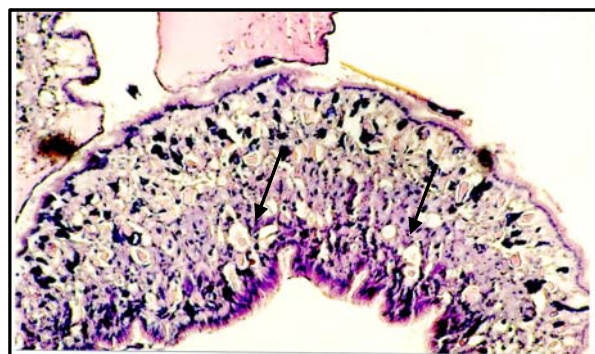
b) 48 horas após infecção



c) 96 horas após infecção



d) 5 dias após infecção



e) 10 dias após infecção

Figura 4.5. – Cortes histológicos da zona cefalopodal de *P. metidjensis* infectados com *S. mansoni*. (ampliação 100x).

Relativamente ao *B. truncatus*, nenhum dos exemplares expostos a diferentes doses de miracídios de *S. mansoni* eliminou cercárias, e dos 60, 46 (76,6%) acabariam por morrer 10 dias após a exposição, e os restantes 14 (23,3%) ao fim de 20 dias.

4.4. Discussão e conclusões.

Apesar de nenhum dos moluscos colhidos nos 38 habitats ter eliminado cercárias de *Schistosoma* spp, foi possível constatar a presença de cercárias de outros tremátodes, não parasitas de humanos que também completam os seus ciclos de vida em moluscos de diversos géneros (Souza *et al*, 1997). Em 1456 exemplares de *P. metidjensis* colhidos, apenas foram encontradas cercárias que não apresentam a cauda bifurcada e que foram identificadas como sendo xifidiocercárias, não tendo sido possível chegar à espécie por falta de dados.

Quanto à longevidade dos moluscos parasitados, verificou-se que estes sobreviviam muito menos tempo em laboratório do que os moluscos colhidos no mesmo local mas que não se encontravam parasitados. As alterações em determinados órgãos, tais como, a glândula digestiva (hepatopâncreas) e ovotestis (glândula hermafrodita) podem ser uma das consequências nas alterações observadas na fecundidade e longevidade dos moluscos (Malek & Cheng, 1974).

Na infecção experimental, os resultados obtidos vêm confirmar, mais uma vez, a não susceptibilidade de *Planorbarius metidjensis* de Portugal continental a estirpes de *Schistosoma haematobium* oriundas de Angola.

Em 1965, Xavier Sampaio *et al*, submeteram vários exemplares de *P. metidjensis* da região do Algarve à exposição a miracídios de *S. haematobium* da Guiné e demonstraram que os moluscos não eram susceptíveis ao parasita, visto não terem eliminado cercárias nem ter sido notado qualquer desenvolvimento de miracídios nos cortes histológicos efectuados.

Capítulo 4

Posteriormente, em 1974, Oliveira *et al* também procederam à infecção experimental de *P. metidjensis* utilizando duas estirpes de *S. haematobium*, uma da Guiné-Bissau e outra de Moçambique, cujos resultados foram idênticos aos anteriores. Em 1980, nova exposição a miracídios de uma estirpe de *S. haematobium* de Angola foi realizada pelos mesmos autores e os resultados confirmaram os resultados obtidos nos dois trabalhos anteriores.

Idênticos resultados foram também observados pelos autores atrás mencionados com *Bulinus truncatus*. Os nossos resultados confirmaram aqueles resultados para as estirpes de *S. haematobium*. Contudo, aqueles autores consideraram o *B. truncatus* como um perigo potencial, visto que anteriormente já se tinha mostrado susceptível, em exposições laboratoriais, a algumas estirpes de *S. haematobium de Angola*, assim como, a estirpes de Moçambique e Guiné-Bissau, tendo-se mostrado um bom hospedeiro por estas últimas (Xavier, 1972, Simões & Azevedo, 1974 e Simões & Medeiro, 1980).

Em 1965, Fraga de Azevedo e colaboradores submeteram *B. truncatus* da região de Coimbra à exposição a miracídios de *S. haematobium* de Guiné-Bissau e verificaram que esta espécie era susceptível ao parasita, concluindo que este molusco, largamente distribuído a norte do rio Mondego, podia comportar-se como um hospedeiro de *S. haematobium*, facto que se revestia da maior importância, quer parasitológica quer epidemiológica, porque até aquela altura, se suponha que apenas o *P. metidjensis* existente na região do Algarve poderia desempenhar o papel de hospedeiro intermediário.

Mas, se *P. metidjensis* mostrou não ser susceptível à infecção experimental com miracídios de *S. haematobium*, o mesmo não aconteceu quando foram submetidos à infecção por *S. mansoni*. Apesar de não terem eliminado cercárias, alguns exemplares desenvolveram infecção até à fase de esporocisto.

Os resultados obtidos evidenciaram também uma mortalidade elevada e nenhum dos moluscos eliminou cercárias. Dos 120 moluscos infectados, 10 exemplares desenvolveram infecção até à fase de esporocisto. O facto do *S. mansoni* não ter

Capítulo 4

completado o seu ciclo durante a experiência, a presença de esporocistos nos tentáculos ou nos tecidos, são um indício de que a infecção ocorreu acompanhada por alterações a nível morfológico. Para estudar a susceptibilidade à infecção de *P. metidjensis* originário de Portugal, Barbosa *et al* (1959 e 1961) submeteram 22 moluscos *P. metidjensis* de Portugal a um número variável de miracídios de *S. mansoni* (5 a 20). Os resultados obtidos evidenciaram uma mortalidade elevada e os moluscos sobreviventes não se mostraram positivos. Contudo, a análise dos cortes histológicos mostraram a presença de esporocistos. Perante tais resultados, os autores concluíram que embora *P. metidjensis* não seja um bom hospedeiro para a estirpe brasileira de *S. mansoni*, poderá vir a ser um potencial hospedeiro, considerando que a susceptibilidade à infecção tem características genéticas e hereditárias e que o sucesso da relação parasita-molusco está dependente de diferentes factores, nomeadamente factores ecológicos, etiológicos e fisiológicos (Malek & Cheng, 1974; van der Knaap & Loker, 1990).

A alta taxa de mortalidade que se verificou nos moluscos de ambas as espécies, poderá estar relacionada com a resistência dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni* que se manifesta pela imensa reacção amebócita em torno dos esporocistos, levando os moluscos à morte, enquanto que os moluscos susceptíveis à infecção apresentam reacções leves e os esporocistos aparecem na sua maioria viáveis (Coelho, 1962).

A elevada taxa de mortalidade dos moluscos e o desenvolvimento incompleto do parasita na fase intra-molusco parecem não ter sido influenciados pelas diferentes doses de miracídios a que foram sujeitos os moluscos, mas sim pelos mecanismos de resistência à infecção desencadeadas pelo molusco. Segundo Théron *et al*, (1997), a ausência de resistência do hospedeiro, permite que o miracídio se desenvolva até à fase final do seu ciclo intra-molusco.

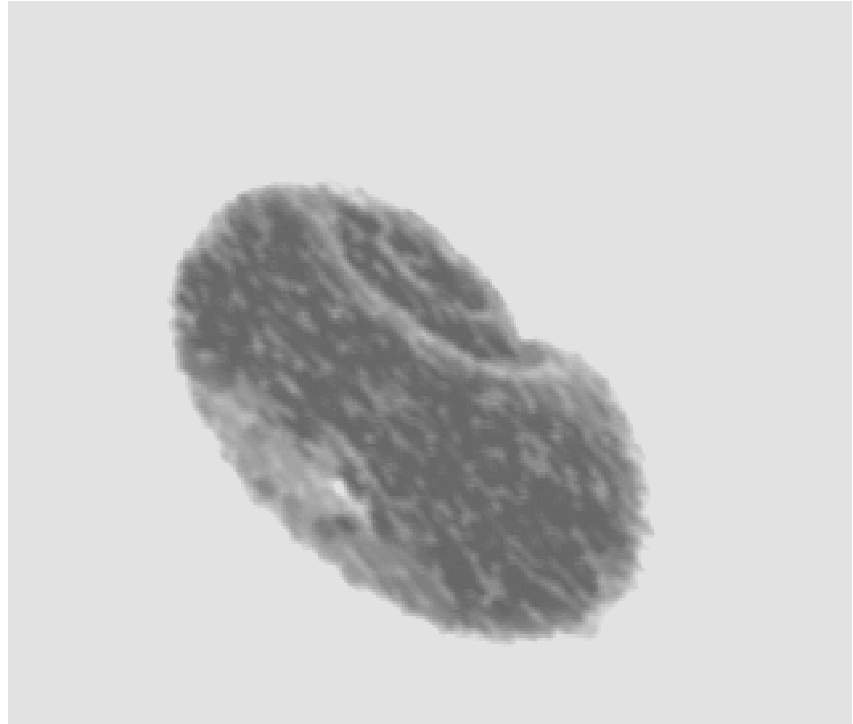
A sobrevivência e longevidade dos moluscos infectados com tremátodes, têm consequências importantes em relação à prevalência do parasita e dinâmica da população hospedeira. Embora taxas elevadas de mortalidade caracterizem a infecção por tremátodes,

Capítulo 4

alguns autores têm descrito casos de longevidade dos moluscos infectados, principalmente quando infectados com algumas espécies de *Schistosoma*. Muitos factores poderão estar envolvidos na determinação da sobrevivência e longevidade, incluindo a intensidade da infecção, nutrição do hospedeiro e compatibilidade das estirpes de parasita e hospedeiros envolvidos.

O facto do número de posturas produzidas pelos diferentes grupos de moluscos ter sido muito reduzido, poderá estar relacionado com a perda de potencial reprodutivo do hospedeiro, denominada por “castração” e que é uma característica comum de muitas interacções tremátode-molusco (Thompson, 1997), levando a uma redução da sua fertilidade (Webster & Woolhouse, 1999).

Embora ainda não se conheçam muitas das alterações fisiológicas e bioquímicas observadas em moluscos infectados com tremátodes, parece ser evidente que o desenvolvimento da infecção é um processo bem regulado e que envolve um confronto entre a manipulação do parasita e a resposta do hospedeiro. A natureza cíclica do desenvolvimento do parasita e a eliminação de cercárias, sugere que o hospedeiro sofre também ciclicamente, exaustão metabólica seguida por um período de recuperação, o que permite ao parasita uma utilização óptima e por períodos de tempo mais longos dos recursos do hospedeiro (Thompson, 1997).



Capítulo 5

Caracterização molecular de *Planorbarius metidjensis* de Portugal

5.1. Introdução

Planorbarius metidjensis, Gastropoda de água doce, amplamente distribuído em Portugal, desempenha um importante papel como hospedeiro intermediário de *Schistosoma haematobium* no Norte de África (Yacoubi *et al*, 1999), como único hospedeiro intermediário de *S. bovis* em Salamanca (Ramajo-Martin, 1988) e, provavelmente, foi hospedeiro natural de *S. haematobium* no Algarve (Bettencourt *et al*, 1922).

Devido à sua distribuição geográfica confinada apenas à região do norte de África e Península Ibérica, esta espécie de moluscos tem sido um pouco discriminada relativamente a outras espécies. Na perspectiva de contribuir para o estudo molecular desta espécie e de estabelecer uma relação filogenética com outras dentro da família Planorbidae, foi desenvolvido este estudo cujo objectivo principal visava a caracterização molecular desta espécie de moluscos utilizando como marcadores os genes mitocondriais COI (Cytochrome Oxidase subunit I) e 16S (rRNA).

Procurou-se também inserir neste estudo a caracterização da variabilidade genética das diferentes populações de *P. metidjensis*, colhidos nos vários habitats (*vide* Capítulos II e III), recorrendo à técnica de RAPD.

5.2. Material e Métodos

Dos trinta e oito habitats estudados (*vide* Capítulo II), foram seleccionados 19 para estudos de caracterização molecular através de RAPD, tendo como base para a selecção o tipo de habitat e os distritos. Na análise dos dois marcadores genéticos foram seleccionados 22 habitats. Foi analisado um total de 120 exemplares (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição geográfica e tipo de habitats de *P. metidjensis*, utilizados nas diferentes análises moleculares.

Populações	Distrito	Tipo de habitat	Marcadores		
			RAPD	COI	16S
Penilhos	Beja	Temporário	X	x	x
Alvito		Temporário	X	x	x
Rib. Monchique	Faro	Temporário	X	x	X
Rib. Seco-Estói		Temporário	X	x	X
Binanciate		Temporário		x	x
Rib. Pincho 1		Permanente	X	X	X
Rib. Pincho 2		Permanente		X	X
Rib. Boina		Permanente	X	x	x
Rib. S. Lourenço-Mourão		Temporário	X	x	x
Rib. Escoural	Évora	Permanente	X	X	X
Rib. Valverde		Temporário	X	x	x
Rib. S. Cacém	Setubal	Permanente	X	X	x
Sesimbra		Temporário	X	X	X
Rib. V. Lobos - Sintra	Lisboa	Permanente	X	x	x
Rib. S. Paulo	Coimbra	Temporário	X	X	X
Rib. Eiras		Permanente	X	X	X
Rib. Souselas		Temporário	X	x	X
Rib. Souselas (2)		Temporário		x	x
Rio Coa-Sabugal		Guarda	Permanente	X	x
Rebolosa	Viseu	Temporário	X	x	x
Cassurões		Temporário	X	x	X
Portalegre		Portalegre	Temporário	X	X

Capítulo 5

Dos moluscos que se encontravam em etanol, retiraram-se o pé e a cabeça (zona cefalopodal) para extracção do ADN total, a qual foi realizada de acordo com o protocolo utilizado na Divisão de Parasitologia Biomédica do Museu de História Natural de Londres (Anexo 5).

A amplificação do ADN genómico dos moluscos foi realizada por reacção de PCR, aplicada aos genes mitocondriais COI (Cytochrome oxidase sub-unit I) e 16S (ARNr). Os fragmentos do gene COI foram amplificados utilizando os oligonucleótidos universais descritos por Folmer *et al* (1994) e para o gene 16S foram utilizados os oligonucleótidos já utilizados para outras espécies de moluscos, nomeadamente, espécies pertencentes ao género *Biomphalaria* (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Oligonucleótidos utilizados na amplificação dos dois genes.

Gene a ser amplificado	Sequência dos oligonucleótidos (Fwd)
COI	Folmer 1 (Folmer <i>et al</i> , 1994)
16S	5' -TGCTTAAGTTCAGCGGGT- 3'
Sequência dos oligonucleótidos (Rvs)	
COI	Folmer 2 (Folmer <i>et al</i> , 1994)
16S	5' -TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3'

As reacções de amplificação dos genes COI e 16S foram efectuadas em volumes de 25 µl, utilizando o kit “puREtaq ready-To-Go PCR beads” comercializado pela “Amersham Biosciences”. Em cada reacção de PCR foi também incluída uma amostra negativa (sem ADN) que serviu de controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler ® (Eppendorf). A ampliação dos genes foi realizada com os oligonucleótidos descritos, cujo volume das amostras para PCR foi de 25 µl. As amplificações do gene COI foram realizadas com um passo de desnaturação a 95° C

Capítulo 5

durante 5 minutos, seguindo-se 37 ciclos de ampliação a 95° C durante 15 segundos, a 58° C durante 30 segundos e 72° C durante 90 segundos e uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

As amplificações do gene 16S do ARNr foram realizadas com um passo de desnaturação a 95° C durante 5 minutos, seguindo-se 37 ciclos de ampliação a 94° C durante 1 min., a 50° C durante 1 min., a 72° C durante 2 mins., e uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de ADN foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM EDTA 1 mM; pH 8,3), onde foi incorporado brometo de etídio, numa concentração de 0,5 µg/ml. Juntamente com os produtos de PCR, foi também adicionado um marcador de massa molecular “HyperLadder II (Bioline). As amostras foram preparadas com 6 µl de produto de PCR ao qual se adicionou 1 µl de tampão (Azul de Bromofenol com glicerol). A migração foi feita a 120 V durante, aproximadamente trinta e cinco minutos. Os fragmentos de ADN amplificados foram visualizados sob radiação ultravioletas (UV) por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado do ADN, numa cabine “Eagle Eye® II” (Stratagene).

Para a realização da sequenciação, os produtos de PCR foram purificados usando as colunas de purificação Qiaquick PCR™ comercializadas pela Qiagen Inc. e todos os produtos de PCR foram sequenciados para ambos os sentidos utilizando o Kit de sequenciação SequiTherm Excell TM^{II} ADN comercializado pelo Cambio (UK).

Os produtos de PCR depois de purificados foram submetidos a reacção de sequenciação num sequenciador automático (MWG Biotech, UK). As sequências foram determinadas em ambos as sentidas, usando *e-seq*™ e alinhadas com o auxílio de Align IR (vers. 1.2).

As sequências nucleotídicas parciais obtidas para os genes COI e 16S, foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (Blast) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), que permitiu a pesquisa de sequências homólogas depositadas nas bases de dados de acesso público (disponível em

Capítulo 5

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) (**Anexo 6, Tabela A6**). As sequências obtidas, quer as de *Planorbarius metidjensis*, quer as que se obtiveram com recurso ao Genbank foram alinhadas com o apoio do programa ClustalW (Thompson, *et al*, 1994), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos manualmente à posterior.

Os estudos da inferência filogenética foram realizados com o auxílio do programa MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2004) onde se calcularam as matrizes de distância genéticas entre os diferentes haplotipos, calculadas pelo modelo de dois parâmetros de Kimura e construídos os respectivos dendrogramas pelo método UPGMA para a observação do agrupamento dos haplotipos de acordo com os polimorfismos de cada gene.

A estimativa do número médio de diferenças nucleotídicas (K), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade de haplotipos (Hd) foram analisados de acordo com Nei (1987) com o apoio do programa DnaSP 4.10.7 (Rozas *et al*, 2003).

A análise estatística da genética populacional foi realizada através das análises das frequências e distribuição de haplotipos utilizando os programas DnaSP Ver.4.10.7 (Rozas *et al*, 2003). Os níveis de estruturação das populações foram inferidos pelas análises de G_{st}, que é a medida de diferenciação genética entre as populações (Slatkin, 1985), e o fluxo génico através do número de migrantes por geração (N_m), em que N é o tamanho efectivo de cada população e m é o número de migrantes entre a população.

A análise filogenética foi conduzida através do programa MEGA version 3.1 (Kumar *et al*, 2004), incluindo o cálculo da composição nucleotídica e a distância genética. Também com o auxílio do programa MEGA e pelo método “neighbor-joining” (junção de vizinhos), foi construída uma árvore filogenética, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo método de dois parâmetros de Kimura, para cada um dos genes analisados. Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados por análise de “bootstrap” obtidos com 1.000 réplicas aleatórias dos dados.

Na amplificação aleatória de polimorfismos de ADN (RAPD) utilizou-se o kit “Ready-To-Go RAPD Analysis Beads” (Amersham Pharmacia) que é comercializado e

Capítulo 5

preparado para RAPD e dois oligonucleótidos que fazem parte do kit, com as seguintes sequências: (P1) 5' – GTTTCGCTCC 3' e (P2) 5' – GTTTCGCTCC 3'.

Nas ampliações com dois oligonucleótidos (os que apresentaram melhores resultados do conjunto de seis oligonucleótidos que constituíam o kit) foi seguida a metodologia indicada no protocolo que acompanha o kit. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler® (Eppendorf), programado para 1 ciclo a 95° C, 5 minutos; 45 ciclos a 94° C por 1 min, 36° C por 1 min.; 72° C por 2 min. e um ciclo final a 72° C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% suplementado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Para estimar o peso molecular dos fragmentos amplificados utilizou-se um marcador de massa molecular “HyperLadder II” de 2000 pares de bases. A migração ocorreu a 160V durante duas horas. As bandas de ADN foram visualizadas numa cabine “Eagle Eye® II” (Stratagene).

Na análise da similaridade genética foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas. Foram consideradas as bandas visíveis, enquanto que as de difícil resolução, não foram incluídas. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo “Coeficiente de Similaridade de Jaccard” (Sneath & Sokal, 1973), para o cálculo das similaridades genéticas para os habitats e os distritos, conforme a expressão:

$$S_{ij} = a/a+b+c$$

a – número de bandas presentes em ambos os indivíduos;

b - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *i*;

c – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*

A matriz de similaridade, construída com o auxílio do programa SPSS (versão 12) foi transformada em matriz de distâncias genéticas (d) usando a fórmula $d=1-S$, a qual foi sujeita a análise com o auxílio do pacote de programas PHYLIP (versão 3.5; Felsenstein, 1993). A matriz foi testada usando o programa Neighbor do PHYLIP e do qual foi gerado

Capítulo 5

um dendrograma, pelo método de UPGMA (Método de média aritmética não ponderada), aplicando-se o programa TREEVIEW (Page, 1998).

A matriz binária de presença/ausência de bandas também foi utilizada para calcular o índice de diversidade de Shannon (H_o) (Lewontin, 1972), com o objectivo de descrever a distribuição da diversidade dos dados de RAPD entre e dentro das populações (habitats). Foram aferidos os seguintes parâmetros: diversidade genética total de Nei (1973) (H_t), diversidade genética dentro (H_s) e entre (H_c) as populações de moluscos de cada um dos distritos. A diferenciação genética entre e dentro dos habitats foi determinada pela Diversidade Genética de Nei's (1987) (G_{st}). Para o nível de diferenciação estabeleceu-se a definição proposta por Wright (1978) em que os valores de 0,00 a 0,05 apresentavam pequena diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 apresentavam diferenciação moderada, valores entre 0,15 e 0,25 alta diferenciação e maiores que 0,25 elevada diferenciação genética. Foi também obtido o fluxo génico (N_m), ou seja, o número de migrantes que uma população recebe por geração. Para a aferição dos parâmetros acima mencionados foi utilizado o programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al*, 1999).

Para testar a hipótese da existência de um isolamento geográfico, realizou-se um teste de associação entre as matrizes de similaridade genética e a distância geográfica através do Coeficiente de correlação matricial (r) com o apoio do programa “Mantel for the Windows” (Cavalcanti, 2005).

5.3. Resultados

5.3.1. Polimorfismos do gene COI do ADN mitocondrial

5.3.1.1. - Diversidade molecular

Em todos os habitats estudados, observou-se um fragmento com um peso molecular aproximadamente de 680 pb. A Figura 5.1 mostra as 13 populações de *P. metidjensis* analisadas.

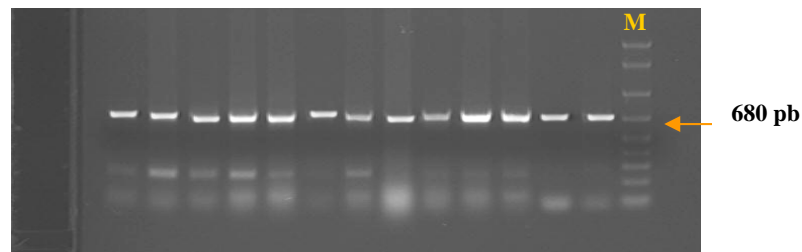


Figura 5.1 – Visualização do gel de agarose a 1 dos produtos de PCR do gene COI para 13 habitats estudados. M- marcador molecular

As sequências parciais dos diferentes habitats foram alinhadas manualmente e agrupadas nos respectivos distritos para se proceder à análise dos dados. Foram retiradas deste estudo as sequências que apresentaram resultados incongruentes.

A média de bases nucleóticas calculada foi de 13,35% para a citosina, 38,72% para timina, 31,00% para adenina e 16,93% para guanina. A frequência de A+T encontrada foi elevada com 69,72%. A Tabela 5.3. mostra a composição nucleotídica encontrada nas populações de *P. metidjensis* de cada distrito.

Tabela 5.3. – Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o gene COI. (nº de habitats analisados).

	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
Coimbra (5)	8,46	44,39	28,78	18,37
Évora (2)	20,33	30,89	34,11	14,67
Faro (3)	9,49	43,09	29	18,42
Lisboa (1)	20,33	30,49	34,55	14,63
Setúbal (2)	8,16	44,78	28,46	18,6
Média	13,35	38,72	31,00	16,93

5.3.1.2. - Distribuição e análise dos haplotipos

As sequências analisadas apresentaram 9 haplotipos diferentes classificados de Hap1 a Hap9 (Anexo 7, Tabela A7). O haplotipo 9 (Hap 9) foi encontrado em dois distritos, Lisboa e Évora, respectivamente. Faro e Coimbra foram os distritos mais polimórficos por apresentar em três haplotipos cada um e todos eles exclusivos. Os distritos de Lisboa e de Setúbal mostraram ser monomórficos por apresentarem um único haplotipo. A distribuição e frequência relativas dos haplotipos encontrados em cada um dos distritos estão descritas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. – Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no gene COI nos diferentes distritos estudados.

Coimbra	Évora	Faro	Lisboa	Setúbal
Hap 1 (0,6)	Hap 3 (0,5)	Hap 2 (0,333)	Hap 9 (1,0)	Hap 6 (1,00)
Hap 3 (0,2)	Hap 8 (0,5)	Hap4 (0,333)		
Hap8 (0,2)		Hap 7 (0,333)		

Na Tabela 5.5, estão descritos os haplotipos encontrados nos diferentes distritos, o número médio de diferenças nucleotídicas (K), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica (H_d).

Tabelas 5.5. – Índices de polimorfismos do gene COI nos diferentes distritos analisados. (nº de habitats estudados).

Distritos	Haplótipo	K	π	Hd
Coimbra (5)	H1; H3, H8	47,00	0,143	0,70
Évora (2)	H3; H5	5,00	0,015	1,00
Faro (3)	H2;H4;H7	6,00	0,018	1,00
Lisboa (1)	H9	-	-	-
Setúbal (2)	H6	-	-	-
Total	9	48,75	0,147	0,94

O cálculo da diversidade nucleotídica (π) para as populações de *P. metidjensis* dos cinco distritos em análise, apresentou um elevado nível de polimorfismo, $\pi=0,147$. A diversidade haplotípica (H_d) foi de 0,94 para o conjunto dos distritos. Contudo, o distrito de Coimbra foi o que apresentou menor diversidade haplotípica ($H_d=0,70$).

Os polimorfismos de nucleótidos simples (“Single Nucleotide Polymorphic”) do gene COI calculados através da diversidade nucleotídica, demonstraram que as populações de *P. metidjensis* nos cinco distritos analisados, apresentaram um nível de polimorfismo elevado, com uma média de 147 SNPs por 1000 pb ($\pi=0,147$).

Com base no cálculo da distância genética entre os haplotipos par a par foi construído um dendrograma a partir do método UPGMA (método da média aritmética não ponderada) que mostra as relações entre os haplotipos encontrados para o gene COI do mtADN.

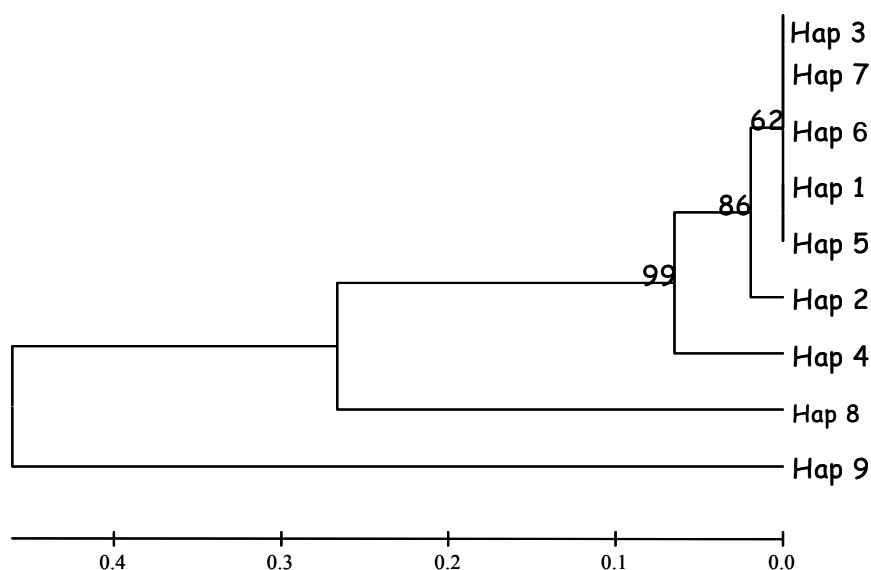


Figura 5.2. – Dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostrando as relações entre os nove haplotipos do gene COI. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 replicações usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

A maioria dos haplotipos encontrados apresentou uma diversidade genética com valores que variaram entre 0,00 e 0,59. No entanto, o haplotipo H9 (Hap 9) apresentou um elevado índice de diferenciação genética comparado com os demais haplotipos, cujos valores variaram entre 1,03 e 0,89 (**Anexo 8, Tabela A8**).

5.3.1.3. - Diferenciação genética

A diferenciação genética entre os distritos emparelhados foi determinada pela diversidade genética de Nei (1973) (G_{st}), cuja média obtida sugere que 33,7% da variabilidade genética está distribuída entre os distritos ($G_{st}=0,337$) e que apresenta uma elevada diferenciação (**Anexo 9 Tabela A9**). O fluxo génico indica que o número de migrantes por geração foi inferior a 1 ($N_m=0,49$).

Com a matriz de distâncias genéticas entre distritos emparelhados foi possível construir um dendrograma pelo método UPGMA, no qual o distrito de Lisboa aparece separado dos restantes distritos por conter um único haplotipo (Hap 9) com uma alta-frequência haplotípica (1,00) (Tabela 5.4, Figura 5.3).

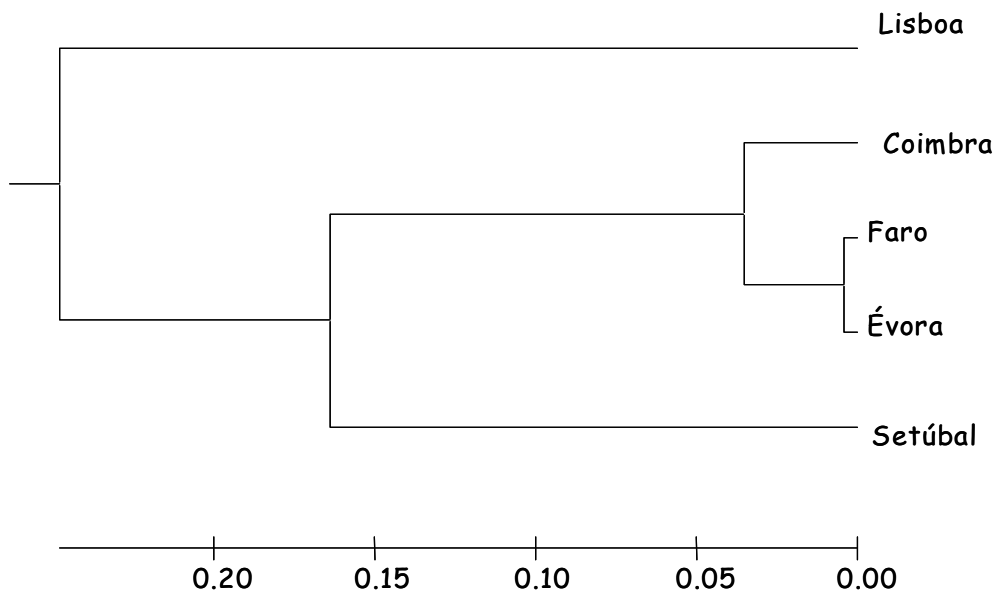


Figura 5.3 – Dendrograma obtido com base no coeficiente de divergência génica de Nei, G_{st} (1973).

5.3.2. Polimorfismos do gene do ARN ribossomal (rDNA) 16S

5.3.2.1. - Diversidade molecular

Foram analisadas 16 habitats distribuídos por cinco distritos (Tabela 5.1). Em todos as mostras analisadas observou-se um fragmento de 420 bp. A Figura 5.4 mostra os produtos de PCR amplificados do gene 16S para os habitats analisados.

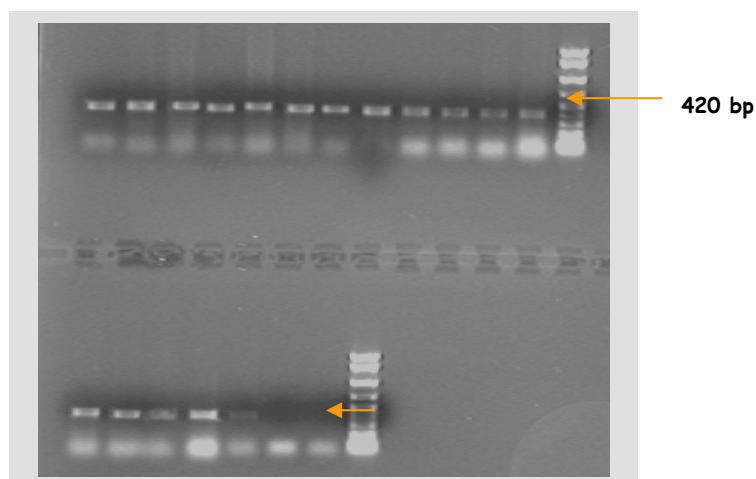


Figura 5.4. – Visualização do gel de agarose a 1% para os produtos de PCR do gene 16S.

As amostras que se apresentaram incongruentes foram retiradas do estudo. No total, foram identificados quatro haplotipos diferentes (**Anexo 10, Tabela A10**) as bases nucleotídicas apresentadas foram de 11,76% para a citosina, 36,26% para timina, 36,25% para adenina e 15,71% para guanina. A frequência de A+T encontrada foi elevada, com 73,51. A **Tabela 5.6.** faz referência à composição nucleotídica das populações de *P. metidjensis* de cada um dos distritos.

Tabela 5.6. – Distribuição das percentagens de nucleótidos encontrados nas sequências analisadas para o gene 16S. (nº de habitats analisados).

Distritos	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
Beja (n=2)	11,83	36,06	36,34	15,77
Coimbra (n=5)	11,82	36,15	36,26	15,77
Évora (n=2)	11,5	36,98	36,01	15,51
Faro (n=6)	11,83	36,06	36,34	15,77
Setúbal (n=1)	11,83	36,06	36,34	15,77
Média	11,76	36,26	36,25	15,71

5.3.2.2. - Distribuição e análise dos haplotipos

O haplotipo 1 (H1) foi o mais comum, estando presente em quase todos os distritos, excepto no distrito de Évora (Tabela 5.7). O haplotipo 2 (Hap 2) apenas foi encontrado no distrito de Coimbra e os haplotipos 3 (Hap 3) e 4 (Hap 4) foram encontrados apenas no distrito de Évora. Dos distritos analisados três mostraram-se monomórficos, ou seja, apenas um haplotipo foi identificado.

Tabelas 5.7. – Distribuição e frequências relativas dos haplotipos identificados no gene 16S nos diferentes distritos estudados.

Beja	Coimbra	Évora	Faro	Setúbal
Hap 1 (1,0)	Hap 1 (0,5)	Hap 3 (0,5)	Hap 1 (1,0)	Hap 1 (0,1)
	Hap 2 (0,5)	Hap 4 (0,5)		

Na Tabela 5.8, estão descritos os haplotipos encontrados nos diferentes distritos, o número de haplotipos encontrados em cada distrito, o número médio de nucleótidos diferentes (K), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica (Hd).

O cálculo da diversidade nucleotídica (π) para as populações de *P. metidjensis* dos cinco distritos apresentou um nível de polimorfismo de 0,021. A diversidade haplotípica foi de 0,371 para o conjunto dos distritos. Contudo, o distrito de Coimbra foi o que apresentou menor diversidade haplotípica (Hd=0,40) (Tabela 5.8).

Os polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) do gene 16S calculados através da diversidade nucleotídica, demonstraram que as populações de *P. metidjensis* nos cinco distritos analisados, apresentaram um alto nível de polimorfismos, com uma média de 21 SNPs por 1000 pb ($\pi=0,021$).

Tabela 5.8. – Índices de polimorfismos do gene 16S nos diferentes distritos analisados. (nº de habitats analisados).

Distritos	Haplotipos	K	π	Hd
Beja (2)	H1	-	-	-
Coimbra (5)	H1; H2	0,40	0,0015	0,40
Évora (2)	H3; H4	39,00	0,1541	1,00
Faro (6)	H1	-	-	-
Setúbal (1)	H1	-	-	-
Total	4	5,561	0,021	0,371

Com base no cálculo da distância genética entre os haplotipos emparelhados foi construído um dendrograma a partir do método UPGMA que mostra as relações entre os haplotipos encontrados para o gene 16S (Figura 5.5).

O haplotipo 4 (Hap 4) apresentou o índice de diferenciação genética mais elevado quando comparado com os demais haplotipos, cujos valores variaram entre 0,68 e 0,60. O haplotipo 3 (Hap 3), quando comparado com os demais haplotipos apresentou um valor muito baixo (0,04)

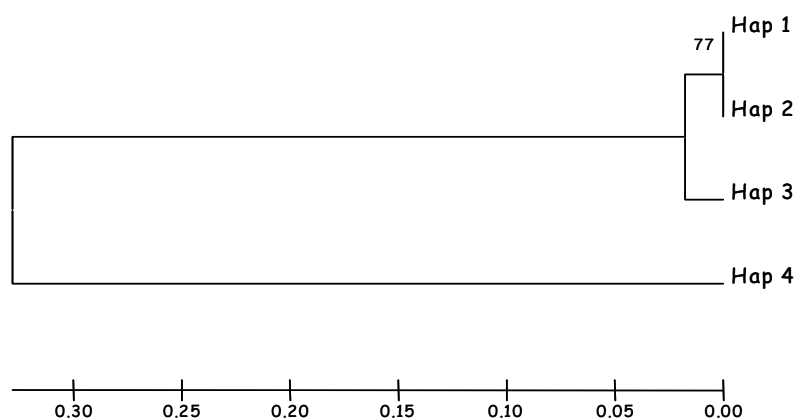


Figura 5.5. – Dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostrando as relações entre os nove haplotipos do gene 16S. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um "bootstrap" de 1000 replicações usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

5.3.2.3 - Diferenciação genética

A diferenciação genética total dos distritos emparelhados, determinada pela Diversidade Genética de Nei (1987) ($G_{st}=0,466$), sugere que 46,6% da variabilidade genética haplotípica está distribuída entre os distritos apresentando uma elevada diferenciação. O fluxo génico indica que o número de migrantes por geração foi inferior a 1 ($N_m=0,29$).

Com a matriz de distâncias genéticas entre os distritos emparelhados foi possível construir um dendrograma pelo método UPGMA, no qual o distrito de Beja aparece separado dos restantes distritos, cujos valores de G_{st} quando comparado com os demais distritos variaram de 0,031 (Coimbra), 0,333 (Évora) e 1,00 (Faro e Setúbal). Comparando Coimbra com os restantes distritos, os valores obtidos foram 0,198 (Évora), 0,000 (Faro) e 0,31 (Setúbal). Entre Évora e Faro o valor foi de 0,427 e entre Évora e Setúbal o valor foi 0,333. Por fim, entre Faro e Setúbal o valor G_{st} foi de 1,00 (Figura 5.6).

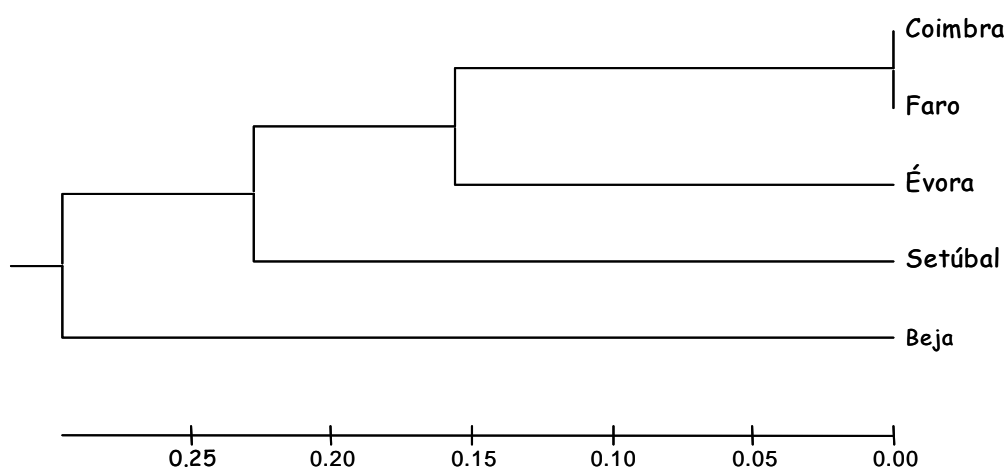


Figura 5.6 – Dendrograma obtido com base no Coeficiente de divergência génica de Nei, G_{st} (1973) para os distritos em análise.

5.3.4. - Variabilidade entre as populações de *Planorbarius metidjensis*

5.3.4.1. Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN (RAPD)

Dos cinco oligonucleótidos que constituem o kit, apenas dois (P1 e P2) foram os que apresentaram os dados passíveis de interpretação, reproduzindo polimorfismos cujo tamanho variou de 300 bp a 1800 bp, (Figura 5.7). Ambos os oligonucleótidos apresentaram um máximo de 8 “loci” polimórficos, para um total de 146 amostras. O maior número de bandas polimórficas encontradas nos diferentes habitats foi 8 e o menor foi 2.

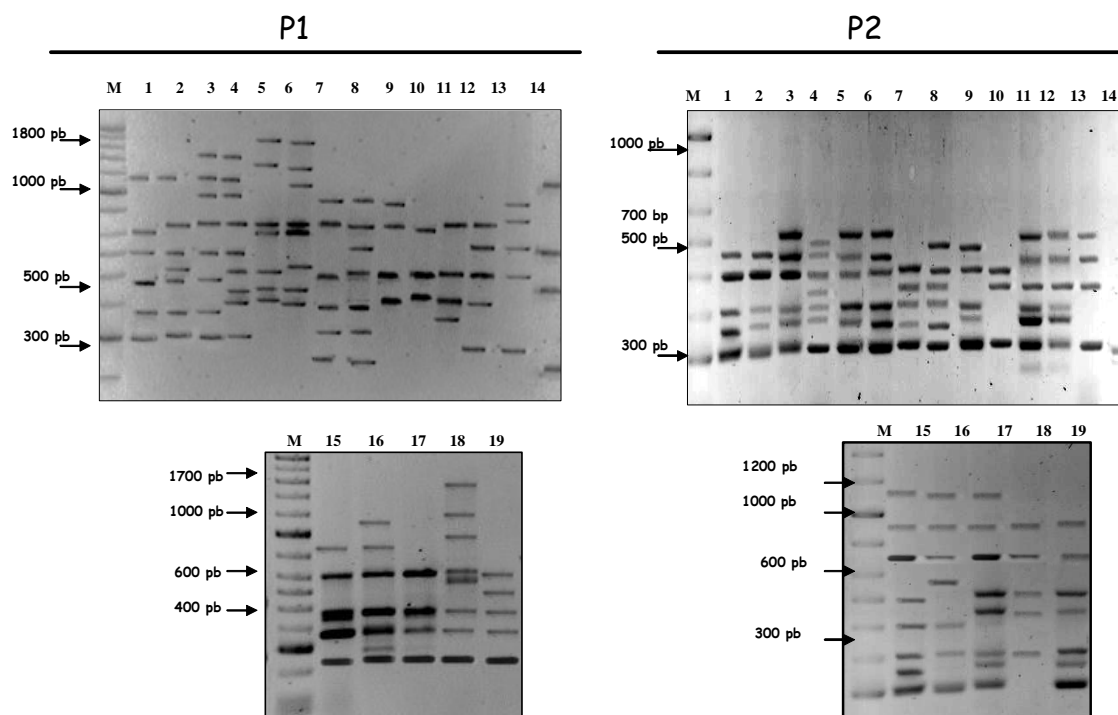


Figura 5.7 - Gel de agarose a 1% mostrando os perfis de RAPD de *P. metidjensis* de diferentes habitats usando os oligonucleótidos 1 (P1) M - marcador molecular; 1- Sabugal; 2- Rebolosa; 3- Cassurões; 4- Ribeira de Eiras; 5- Ribeira de Souselas; 6- Santiago do Cacém; 7- Sesimbra; 8- Vale de Lobos (Sintra); 9- Alvito; 10- Mourão; 11-Ribeira do Pincho; 12- Penilhos; 13- Ribeira de Monchique; 14- Portalegre; 15-Ribeira de Estói; 16- Ribeira de Boina; 17- Ribeira de Valverde; 18- Ribeira de Escoural; 19- Ribeira de S. Paulo.

5.3.4.2. - Caracterização da diversidade genética

Os valores estimados para a diversidade genética determinada pelo Índice de Shannon (H_o) estão descritos na **Tabela 5.9**. Os resultados mostram diferenças significativas entre e dentro dos 19 habitats de *P. metidjensis* em estudo.

Os valores para o Índice de Shannon (H_o), evidenciaram alta diversidade genética para o conjunto dos habitats com um total de 0,4981 ($\pm 0,1008$).

Ribeira de Souselas, apresentou o índice de Shannon mais elevado ($H_o=0,4005$), sendo também o habitat que apresentou maior variabilidade, com moluscos geneticamente diferentes. Por outro lado, o habitat Rio Côa-Sabugal, com o índice de Shannon mais baixo (0,0866), apresentou moluscos geneticamente mais homogêneos. Os restantes habitats apresentaram moderada a alta diversidade genética (**Tabela 5.9**).

Quanto à diferenciação genética entre e dentro das populações de moluscos agrupadas nos diferentes distritos e determinada pela diversidade genética de Nei's (1987), os resultados evidenciaram ($G_{st}=0,2389$) que 23,9% da variabilidade genética se encontra entre os distritos e que 76,1% dentro dos distritos (**Tabela 5.10**). De acordo com a definição proposta por Wright (1978), o valor encontrado sugere alta diferenciação genética.

Relativamente a cada um dos distritos, Guarda foi o que apresentou uma maior diferenciação genética, com 64,8% entre os habitats ($G_{st}=0,648$) e 35,2% dentro dos habitats que compõem o distrito, enquanto que Coimbra, demonstrou que 26,5% ($G_{st}=0,265$) da variabilidade genética se encontra entre os habitats e 73,5% dentro dos habitats. Com a exceção dos distritos de Portalegre e Viseu (cujos resultados não foi possível apresentar devido ao número de habitats estudados não ter sido suficiente para a análise de dados), os resultados evidenciam que existe uma elevada diferenciação genética entre os distritos, assim como, dentro dos distritos (**Tabela 5.10**).

Capítulo 5

Tabela 5.9 - Índices de diversidade genética para os habitats de *P. metidjensis* estudados.

Habitats	Distritos	Índice de Shannon (H ₀)
1. Alvito	Beja	0,1993
2. Penilhos		0,1569
3. Ribeira de Eiras	Coimbra	0,2907
4. Ribeira de S. Paulo		0,2272
5. Ribeira de Souselas		0,4005
6. Ribeira do Escoural	Évora	0,3078
7. Ribeiro S. Lourenço-Mourão		0,2346
8. Ribeira de Valverde		0,2643
9. Ribeira de Boina	Faro	0,3466
10. Ribeiro Seco-Estói		0,2436
11. Ribeira de Monchique		0,1538
12. Ribeira do Pincho		0,3139
13. Rio Coa-Sabugal	Guarda	0,0866
14. Rebolosa		0,2296
15. Ribeira V. Lobo-Sintra	Lisboa	0,2599
16. Portalegre	Portalegre	0,3302
17. Ribeira S. Cacém	Setúbal	0,3319
18. Sesimbra		0,1769
18. Cassurões	Viseu	0,3263
TOTAL		0,4981 (± 0,1008)

Quadro.5.10. - Índices de diversidade genética (Nei, 1973) para os nove distritos estudados.

Distrito	Diversidade genética total (Ht)	Diversidade genética entre os distritos (Hs)	Coefficiente de diferenciação genética (Gst)	Nº de migrantes (Nm)
Beja	0,227	0,1207	0,4685	0,5673
Coimbra	0,3242	0,2383	0,2651	1,3864
Evora	0,3038	0,1927	0,3657	0,8672
Faro	0,2529	0,1836	0,2741	1,3239
Guarda	0,316	0,1111	0,6484	0,2712
Lisboa	0,3961	0,1324	0,4864	0,5763
Portalegre	0,3587	-	-	-
Setubal	0,2075	0,1348	0,5018	0,4964
Viseu	0,3729	-	-	-
Total	0,3546	0,2748	0,2389	1,8845

- Não foi possível apresentar resultados, devido ao reduzido número de habitats analisados.

O fluxo génico (Nm) para o conjunto dos distritos analisados foi de 1,8845, indicando que o número de migrantes foi superior a um, demonstrando a possível ocorrência de fluxo génico. Ao analisarmos a **Tabela 5.10**, podemos concluir que os distritos de Coimbra e Faro apresentaram um número de migrantes superiores a um, com 1,3864 e 1.3239, respectivamente. Para os restantes distritos o fluxo génico foi inferior a um (0,5673, 0,8672, 0,2712 e 0,4964).

Segundo o tipo físico (temporários ou permanentes), observou-se que a divergência genética (Gst) foi mais elevada nos habitats do tipo temporários, com 0,4971, do que nos habitats do tipo permanente, com 0,4044. Os valores estimados para o índice de Shannon, (Ho), evidenciaram alta diversidade genética para os dois tipos de habitat, sendo 0,4638 para os permanentes e 0,5368 para os temporários. O fluxo génico foi inferior a um para ambos os tipos físicos (**Tabela 5.11**).

Os resultados obtidos para os diferentes tipos físicos dos habitats indicam uma elevada diferenciação genética para cada um deles, notando-se que a diferenciação genética apresentada pelo habitat do tipo temporário é ligeiramente superior aos habitats do tipo permanente.

Tabela 5.11. - Índices de diversidade genética para os dois tipos físicos dos habitats em estudo.

Tipos de Habitats	Índice de Shannon (H_0)	Diversidade genética total (H_t)	Diversidade genética entre os distritos (H_s)	Coefficiente de diferenciação genética (G_{st})	Nº de migrantes (Nm)
Temporários	0,5358	0,3540	0,2108	0,4971	0,5058
Permanentes	0,4538	0,2952	0,1484	0,4044	0,7364

5.3.4.3. - Identidade e distância genéticas entre as populações de *P. metidjensis*

Baseado nos valores da distância e identidade genéticas de Nei (1973) que medem o grau de proximidade genética entre pares de populações (**Anexo 11, Tabela A11**) obtiveram-se dois dendrogramas pelo método de UPGMA, para os 19 habitats e 9 distritos, respectivamente.

A análise de agrupamento UPGMA utilizando as estimativas da identidade e distâncias genéticas de Nei (1972) para os 19 habitats emparelhados, mostra que Sabugal devido à baixa variabilidade encontrada entre os moluscos nele colhidos, apresenta-se como um grupo separado dos demais habitats (**Figura 5.8**).

Aquele habitat foi o que apresentou as maiores distâncias quando comparado com os restantes. A maior distância genética observada, verificou-se entre a Rebolosa e Penilhos (0,8512), enquanto que a menor distância se verificou entre Ribeira de S. Paulo e Alvito (0,0010) (Anexo 11, Tabela A11).

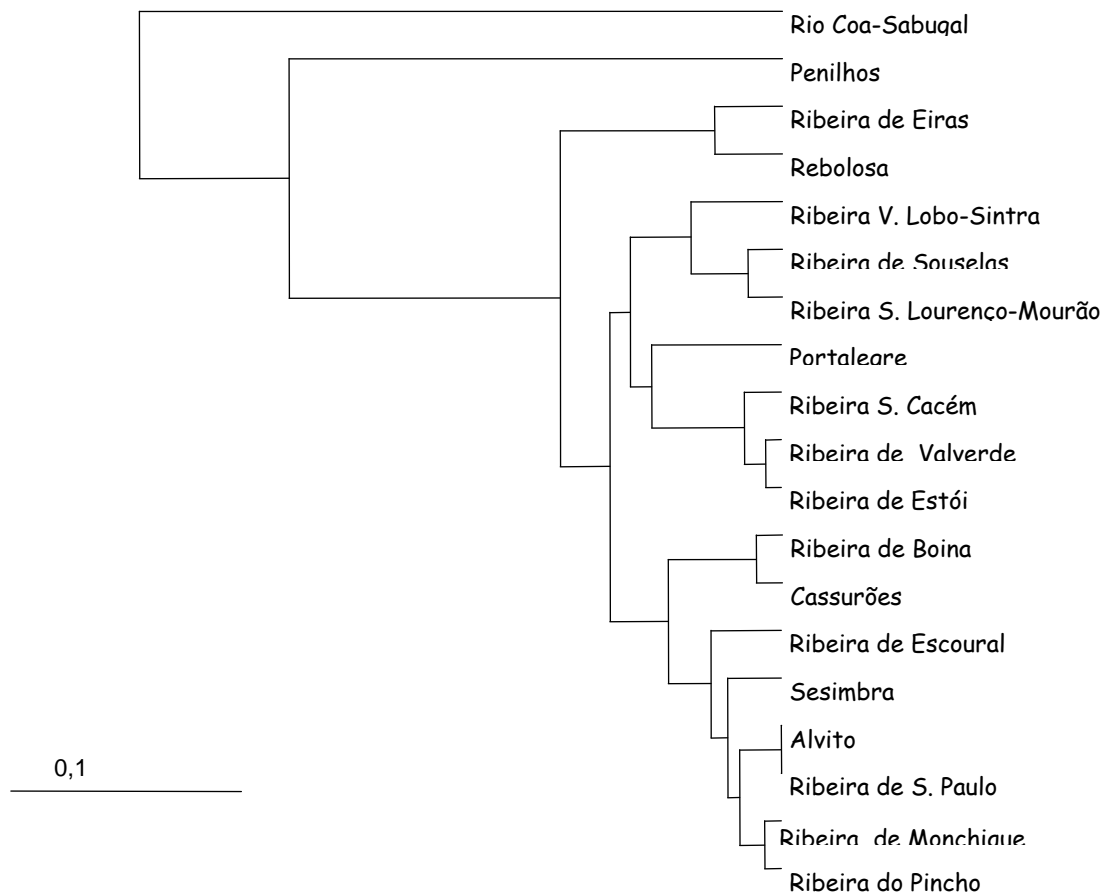


Figura 5.8. – Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) entre os habitats de *P. metidjensis*

O dendrograma da Figura 5.9, mostra que o distrito da Guarda, forma um grupo separado dos restantes distritos, como consequência da baixa variabilidade encontrada em Sabugal. Os distritos de Coimbra e Viseu, assim como Évora e Setúbal, estão muito

próximos uns dos outros comportando-se como se fossem uma única população. Os resultados parecem também evidenciar um nítido isolamento do distrito da Guarda relativamente aos restantes, se tivermos em consideração que este é o distrito geograficamente situado mais a norte.

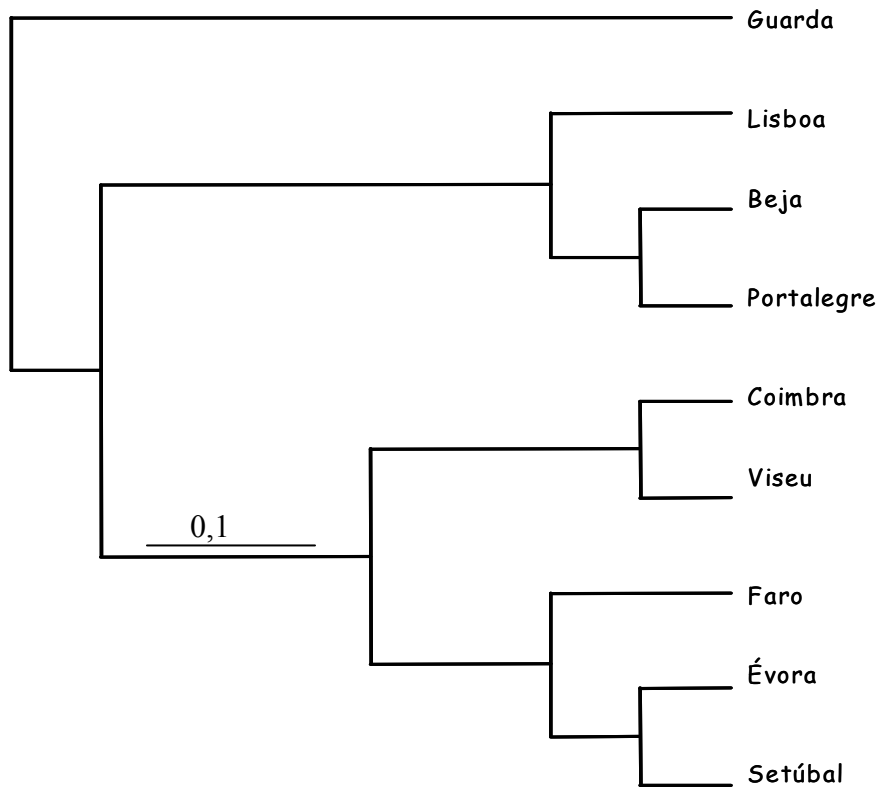


Figura 5.9. – Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) para os distritos de *P. metidjensis* em análise.

5.3.4.4. - Correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica

Entre a distância geográfica e a similaridade genética foi encontrada uma correlação negativa ($r=-0,085$; $p= 0,33$), como se pode observar na **Figura 5.10**, indicando que a distância geográfica entre os vários habitats, não influencia a similaridade genética encontrada entre cada um deles.

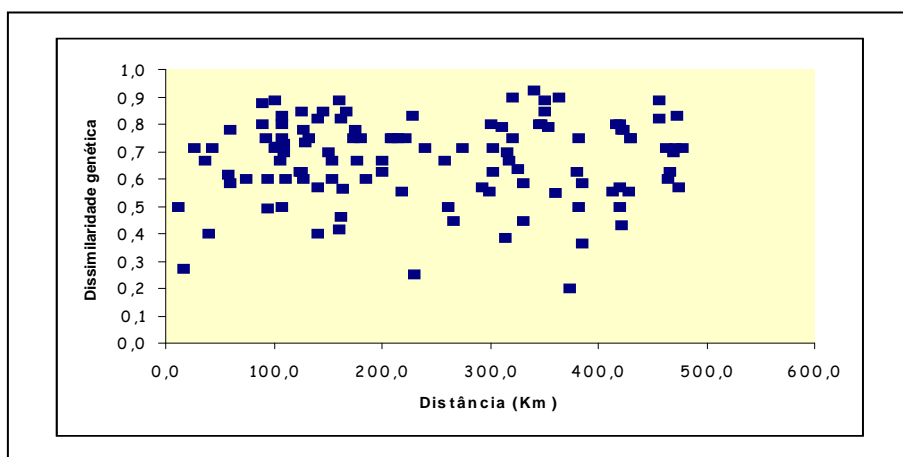


Figura 5.10. – Representação gráfica da correlação (r) entre as distâncias geográficas (Km) e a similaridade genética.

5.4. - Análise filogenética

A análise filogenética das sequências parciais de *P. metidjensis* obtidas para os genes que codificam a enzima citocromo oxidase (COI) e para o gene ARNr 16S ambos do ADN mitocondrial, 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.

Capítulo 5

A análise demonstrou para ambas as sequências analisadas, a formação de dois e três grandes grupos, respectivamente. Na árvore filogenética obtida para o gene COI, foi adicionada a espécie *Ferrissia rivularis* como um grupo externo (“outgroup”) (Figura 5.11), enquanto que a espécie *Anisus vortex* funciona como grupo externo para a árvore filogenética para o gene 16S (Figura 5.12).

Na análise do gene COI, a árvore é constituída por dois grandes ramos. O primeiro ramo é constituído pelo conjunto da espécie de *P. metidjensis*, representativo dos diferentes habitats e um segundo grupo formado pelas espécies do género *Planorbarius* (*Planorbarius* sp e *P. corneus*), suportado por um valor de “bootstrap” elevado 81%. Os diferentes habitats representativos da espécie *P. metidjensis* de Portugal formam um grupo parafilético suportado por um valor de “bootstrap” máximo (100%).

O segundo ramo é constituído por dois grupos distintos onde se agrupam as diferentes espécies de moluscos pertencentes ao género *Biomphalaria*, agrupado segundo a origem das espécies, destacando-se as espécies do velho continente, ou Africanas, ao qual, pertencem as espécies *B. pfeifferii*, *B. angulosa*, *B. choanomphala* e *B. sudanica* e as espécies do novo continente, ou Neotropical que engloba as espécies *B. occidentalis*, *B. obstructa* e *B. glabrata*. A espécie *B. occidentalis* parece ser a espécie basal ao grupo Neotropical, suportado por um alto valor de “bootstrap” (99%).

A estreita associação entre a *B. glabrata* (espécie neotropical) e as espécies africanas é suportada por um valor de “bootstrap” de 79%, que se encontra no limite do estatisticamente significativo.

A espécie *Helisoma trivolvis* é basal neste segundo ramo e parece ser grupo irmão das outras espécies pertencentes ao género *Biomphalaria*. Esta relação é explicada pela formação de um grupo parafilético, em que o valor de “bootstrap” associado a este ramo se encontra no limite do estatisticamente significativo (76%).

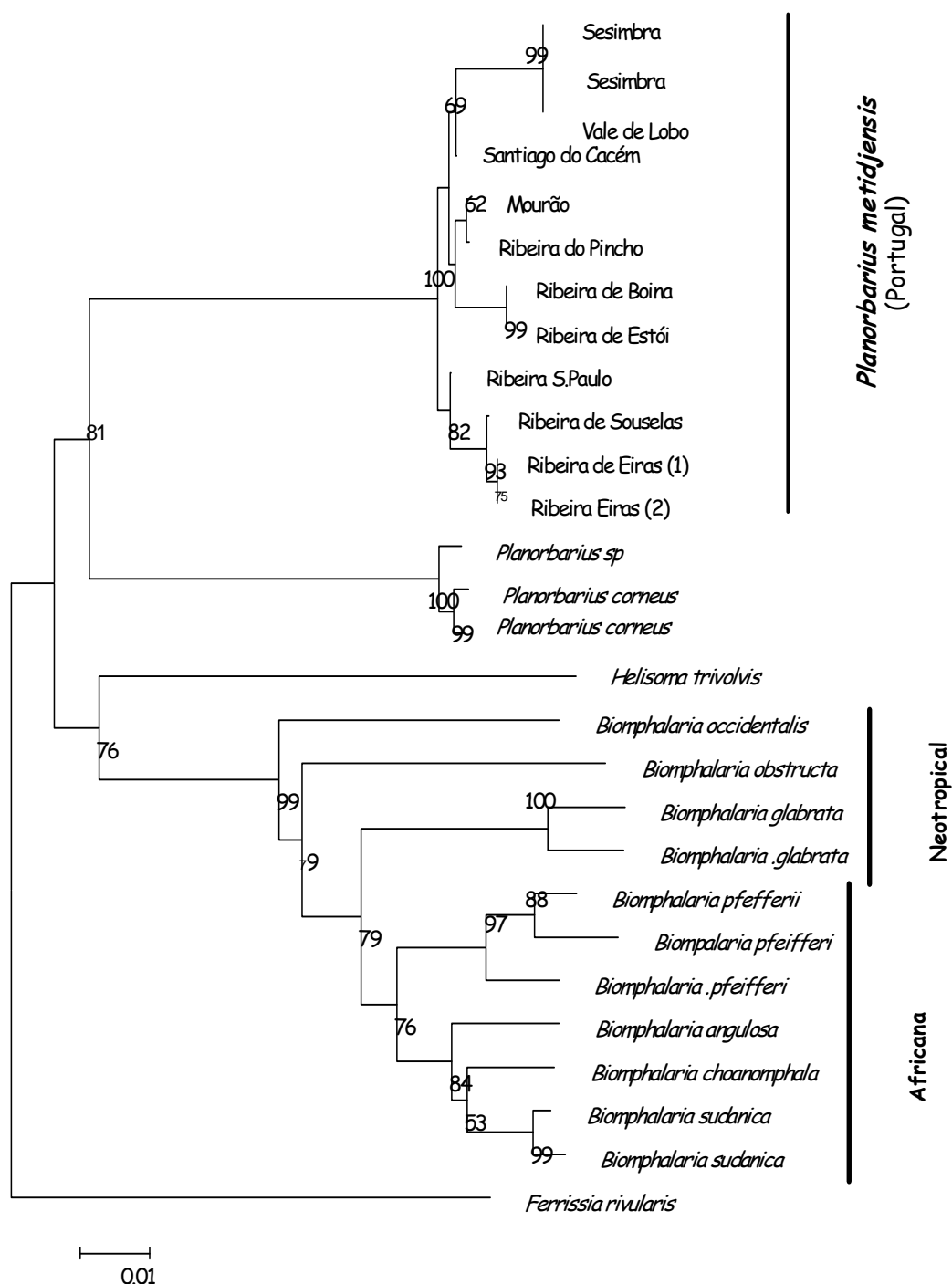


Figura 5.11 Relação filogenética entre as várias populações de *Planorbarius metidjensis* de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de *Schistosoma spp* e de outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais do gene COI através do método “neighbor joining”, tende por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros. Os números sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

Capítulo 5

Relativamente à análise do gene 16S do ARN ribossomal (Figura 5.12), a árvore obtida apresenta a formação de três ramos principais. O primeiro ramo é formado por dois grupos distintos que agrupam as diferentes espécies de moluscos pertencentes ao género *Biomphalaria* segundo a sua origem. Assim, destaca-se o grupo das espécies do velho continente ou Africanas, constituído pelas espécies *B. choanomphala*, *B. sudanica* e *B. camarunensis* e o grupo das espécies do novo continente ou Neotropicais, do qual fazem parte as espécies *B. glabrata*, *B. tenegophila*, *B. kuniana*, *B. peregrina*, *B. obstructa* e *B. tesmacalensis*. Tal como na árvore anterior a espécie *Helisoma trivolvis* surge em estreita associação com estes dois grupos, apresentando-se como um grupo basal, suportado por um valor de “bootstrap” de 81%.

O segundo ramo principal é constituído pela espécie *P. metidjensis* de Portugal em que os diferentes habitats representativos da espécie sugerem a formação de um grupo monofilético em associação com a espécie *P. corneus*, em que o valor de “bootstrap” associado a este ramo é bastante elevado (98%) e estatisticamente significativo.

Por fim, o terceiro ramo principal é formado pelas espécies pertencentes ao género *Bulinus* (*B. nassutus*, *B. truncatus* e *B. liratus*). Neste grupo o *B. nassutus* apresenta-se como a espécie basal, com um valor de “bootstrap” máximo (99%). Associado a este grupo, está a espécie *Indoplanorbis exutus*, que sugere a formação de um grupo parafilético, suportado por um valor de “bootstrap” de 80 %.

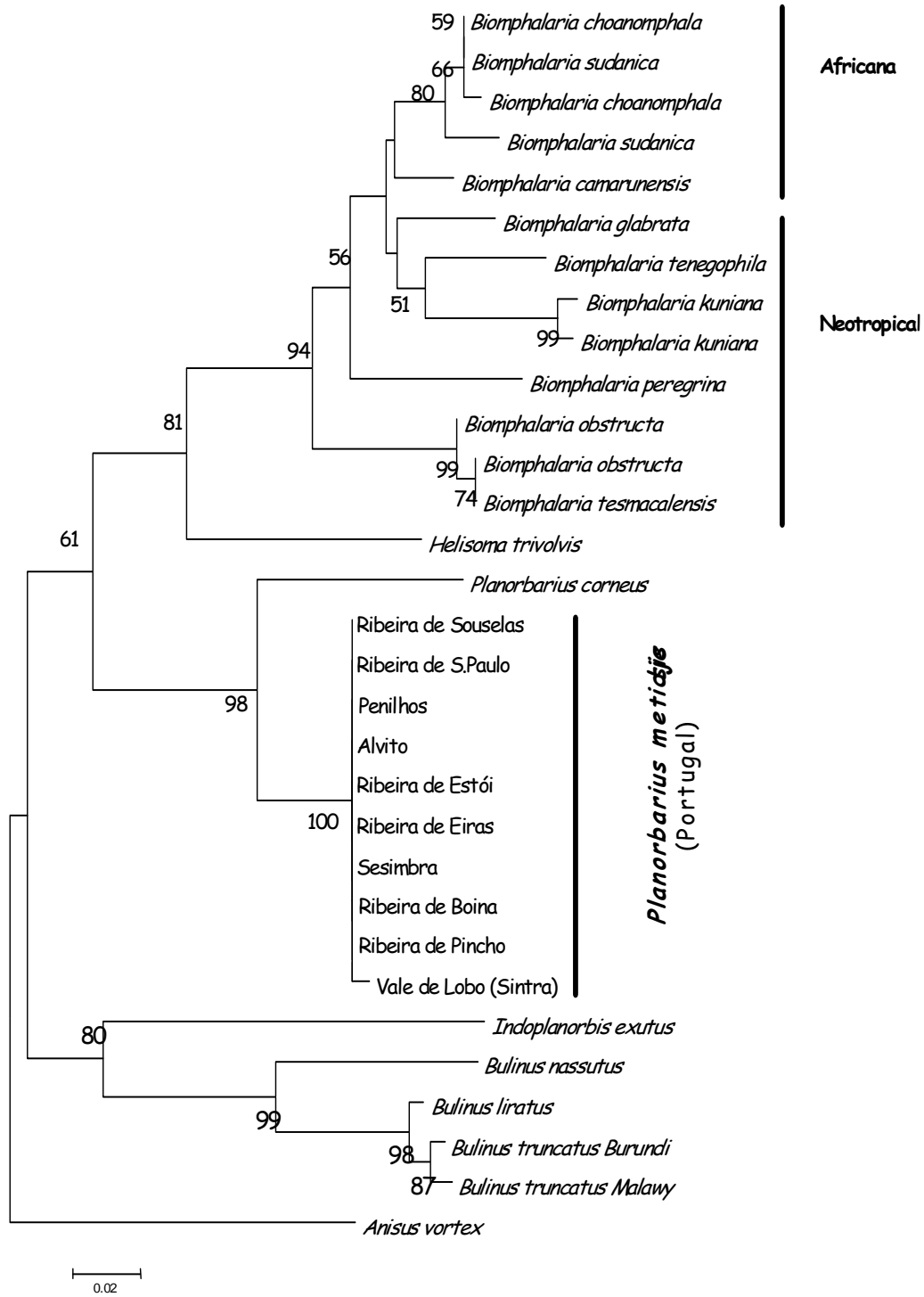


Figura 5.12. - Relação filogenética entre as várias populações *P. metidjensis* de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de *Schistosoma sp*, inferidas pela análise das sequências parciais do gene 16S através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas.

5.5. Discussão e conclusões

O presente estudo permitiu apresentar as primeiras sequências, ainda que parciais dos genes COI e 16S de *P. metidjensis* provenientes de diferentes áreas geográficas de Portugal continental e, paralelamente, estabelecer uma relação filogenética com outras espécies pertencentes à mesma família. Consequentemente, também foi possível estimar os níveis da variabilidade genética intra e interpopulação de 19 habitats de *P. metidjensis* de diferentes regiões geográfica através de marcadores de RAPD.

Nos dois genes (COI e 16S), dos moluscos colhidos nos diferentes distritos, foi observada uma proporção maior do par Timina-Adenina (T+A) em relação ao par Guanina-citosina (G+C) com 71,11% e 28, 86%, respectivamente. Esta parece ser uma propriedade característica dos genes mitocondriais de algumas espécies de invertebrados (Davis *et al*, 1996 *cit* Stothard *et al*, 2002).

Neste estudo, foram detectados nove haplotipos diferentes para o gene COI num total de 13 habitats estudados. Para o gene 16S, num total de 16 habitats foram encontrados quatro haplotipos diferentes. Os moluscos provenientes do distrito de Coimbra foram os mais polimórficos, com um total de 5 haplotipos, sendo três haplotipos para o gene COI e dois para o gene 16S. Os habitats estudados caracterizaram-se por ser, na sua maioria, habitats do tipo temporários apresentando alta variabilidade genética.

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).

A média da diversidade nucleotídica (π) encontrada em todos os haplotipos para o gene COI foi 0,147 e para o gene 16S foi de 0,021. A alta diversidade nucleotídica encontrada no gene COI parece estar relacionada com a presença de um haplotipos específico (Hap 9) que apresentou um elevado índice de diferenciação genética.

Capítulo 5

Dejong, *et al.* (2003) compararam duas espécies de moluscos do género *Biomphalaria*, *B. glabrata* e *B. pfeifferi*, respectivamente, demonstrando que estas duas espécies apresentaram um elevado número de haplotipos, característica presente em moluscos de água doce com capacidade de dispersão limitada, a qual parece estar relacionada com o isolamento geográfico.

Na análise do gene COI foi possível observar a ocorrência de um haplotipo comum H3 (Haplótipo 3) em dois dos cinco distritos analisados, enquanto que para o gene 16S o H1 (Haplótipo 1) foi encontrado em quatro dos distritos analisados. Estes dois haplotipos distintos um do outro, evidenciam serem os possíveis haplotipos ancestrais (para os genes COI e 16S), apesar da distância geográfica entre eles ser superior a 200 km.

A caracterização da estrutura genética através da análise do ADN mitocondrial tem sido, ao longo desta última década, bastante estudada em populações de moluscos pertencentes a diferentes género e espécies. Os resultados da diferenciação genética entre e dentro dos distritos estudados, mostraram uma diversidade genética elevada para ambos os genes, com $G_{st}=0,466$ para 16S e $G_{st}=0,337$ para COI. De acordo com a definição de Wright (1978) estes valores dão uma ideia aproximada da estrutura populacional dos moluscos nos cinco distritos analisados a qual é elevada.

A diferenciação genética poderá ser influenciada pelo baixo número de migrantes (N_m) que foi inferior a 1 para ambos os genes. Assim, para o gene COI o N_m foi de 0,49 e para o gene 16S N_m foi de 0,29. Estes valores indicaram que não houve fluxo génico entre as populações de moluscos dos distritos em estudo, sugerindo a ocorrência de um isolamento reprodutivo entre as populações, que na maioria das vezes é gerada pelo isolamento das populações naturais devido à sua fragmentação (Mukaratirwa *et al.*, 1996 e 1998). Porém, um baixo fluxo génico (inferior a 1) não significa que haja uma ausência de fluxo de genes (Coutlec-Vreto *et al.*, 1994) e que este pode ser impulsionado pela dispersão passiva que possa ocorrer durante o período de chuvas ou através do transporte dos ovos pelos pássaros (Jarne & Delay, 1991). Por outro lado, um fluxo génico limitado,

causado pela falta de intercomunicação entre diferentes populações, leva ao aparecimento de uma variabilidade interpopulacional (Caldeira *et al*, 2001).

A disposição geral dos haplotipos nos dois dendrogramas confirma a não diferenciação genética segundo a área geográfica associada aos diferentes distritos. Em cada um dos dendrogramas, pode-se observar a formação de um grupo englobando a maioria dos haplotipos. O suporte estatístico para estes agrupamentos pode ser considerado alto (77% e 99%, para 16S e COI, respectivamente).

A comparação dos respectivos dendrogramas (**Figuras 5.3 e 5.6**) obtidos com base no coeficiente de divergência genética de Nei (G_{st}), dá-nos uma percepção da posição dos diferentes distritos relativamente à divergência genética encontrada para cada um deles. Assim, para o gene COI o distrito de Lisboa forma um grupo separado dos demais distritos, como consequência do único haplotipos encontrado (Hap 9) ser o mais divergente de todos. O mesmo sucedeu para o gene 16S em que o distrito de Faro e Coimbra são os distritos mais próximos um do outro.

Por outro lado, a técnica molecular RAPD-PCR revelou ser também um meio adequado para analisar a variação genética dentro e entre as populações de *P. metidjensis* de diferentes áreas geográficas. As amplificações de ADN pela técnica de RAPD-PCR resultaram de um número suficiente de fragmentos polimórficos para as análise de estruturação genética, apesar do número de oligonucleótidos ter sido muito reduzido. Também é importante salientar que embora os marcadores RAPD não representem a melhor ferramenta para definir e diferenciar populações, estes abriram uma nova perspectiva para aprofundar o conhecimento sobre a genética das populações naturais, e têm sido largamente usados nos estudos da variabilidade genética intra e inter populacional nos mais variados organismos (Langand *et al*, 1993; Sire *et al*, 1999; Cardoso *et al*, 2006)

Marcadores similares também são usados no estudo da deriva genética, nos diferentes sistemas reprodutivos, nos níveis de endogamia e no fluxo génico, mostrando a influência na dinâmica populacional e consequentemente, na estrutura da genética populacional (Semyenova *et al*, 2003). Uma das muitas hipóteses na utilização de

marcadores RAPD, consiste na sua aplicação aos estudos de variabilidade genética nas populações de moluscos (Vidigal *et al*, 1994 e 1998; Gutiérrez *et al*, 2003 e Caliens *et al.*, 2004).

Os nossos resultados mostraram que a variabilidade genética determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon foi elevada para o total dos 19 habitats ($H_o=0,4981$). Analisando os habitats, observou-se que a variabilidade genética variou de 0,0866 (para Sabugal) e 0,4005 (Ribeira de Souselas). O índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixa é a diversidade. Dos resultados por nós obtidos, podemos concluir que a Ribeira de Souselas foi o habitat em que os moluscos colhidos se apresentaram bastante heterogéneos. Por outro lado, o Rio Côa-Sabugal foi o habitat com as características mais homogéneas. Estes valores estão um pouco abaixo dos valores encontrados por Langand *et al* (1999) ao estudar a estrutura populacional de *Biomphalaria glabrata* nas ilhas de Guadalupe, os quais variaram de 0,571 a 0,330, indicando neste caso uma diversidade intrapopulacional elevada e separando ao mesmo tempo as populações segundo a sua região geográfica.

Com base na definição de diferenciação genética proposta por Wright (1978), o valor G_{st} ($G_{st}=0,2389$) obtido para o conjunto dos distritos indica alta diferenciação genética. O número de migrantes por geração (N_m) foi de 1,8845, o que indica que um fluxo génico moderado entre os moluscos colhidos nos vários distritos. Estes resultados são similares aos obtidos por Cardoso *et al* (2006) no estudo da variabilidade genética de *Lymnaea columella*, em que registaram uma elevada variabilidade genética ($F_{st}=0,816$) e um fluxo génico muito baixo entre as populações.

As 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, factores que eventualmente podem contribuir para a deriva genética, para o efeito fundador ou até mesmo pressões ambientais, os quais podem levar a alterações drásticas nos habitats dos moluscos (Jarne & Dalay, 1991). Este factores podem ser compensados com o tipo de reprodução (autofecundação)

Capítulo 5

característico destes planorbídios e aos seus mecanismos de sobrevivência quando as condições ambientais lhes 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 (Bandoni, *et al*, 1990; Angers, *et al*, 2003 e Charbonnel *et al*, 2002 e 2005). Populações de moluscos que ocupam habitats instáveis ou temporários, geralmente apresentam uma estrutura genética forte (Charbonnel *et al*, 2002).

Na análise de agrupamentos não foi possível supor a existência de uma relação entre a proximidade geográfica dos habitats e a sua similaridade genética, pois não houve a tendência dos habitats mais próximos localmente serem também os mais próximos geneticamente. Os dendrogramas obtidos quer para os habitats, quer para os distritos, evidenciam a formação de diferentes grupos relacionados entre si geneticamente, mas não geograficamente.

Com base nas características físicas de cada habitat, os 19 habitats foram agrupados em temporários e permanentes, cujos resultados evidenciaram elevada diferenciação genética para ambos os tipos físicos. Contudo, os habitats do tipo temporário apresentam uma diferenciação genética (G_{st}) ligeiramente mais elevada dos que os habitats do tipo permanente (0,4971 e 0,4044, respectivamente). Estudos semelhantes, demonstraram que os moluscos provenientes de habitats permanentes de águas correntes apresentam altos níveis de similaridade entre a sua população. Em contraste as populações de moluscos provenientes de habitats temporários (semipermanentes) foram geneticamente distintas e a diversidade genética entre os moluscos foi relativamente elevada (Webster *et al*, 2001). Estes padrões podem reflectir, em parte, os altos níveis de migração da população de moluscos dos habitats permanente e a migração limitada entre os moluscos dos habitats temporários.

A variabilidade genética encontrada nos moluscos *P. metidjensis* poderá determinar diferenças na susceptibilidade à infecção com *Schistosma* spp (*vide* Capítulo IV) ou ter

implicações em estudos experimentais onde é necessário uma uniformidade genética dos organismos (Campos *et al*, 2002 e Mulvey & Vrijenhoek, 1981).

A probabilidade de que a diversidade genética dos moluscos hospedeiros intermediários possa afectar a transmissão da schistosomose em áreas endémicas e a possibilidade de se usarem moluscos refractários como um método de controlo têm sido discutidos em zonas endémicas, nomeadamente no Brasil (Spada *et al*, 2002 e Coelho *et al*, 2004). Contudo, sem que haja um método que determine a frequência dos genes de resistência em populações naturais de moluscos, poderá ser extremamente difícil ter acesso a resultados fiáveis que permitam tornar este método eficaz (Abdel-Hamid *et al*, 1999 e 2006).

A alta variabilidade observada entre as populações de moluscos em cada um dos distritos, poderá ser influenciada pelas distâncias geográficas. Estudos recentes, confirmaram a existência de uma alta variabilidade genética associada às distâncias geográficas entre os habitats das populações de moluscos e que quanto mais afastada se encontrar a população mais baixo é o fluxo de genes, fenómeno que leva ao aumento da diferenciação genética entre as populações (Viard *et al*, 1997 e Cardoso *et al*, 2006).

Porém, os nossos resultados mostraram que a elevada variabilidade genética entre os distritos não é influenciada pelas distâncias geográficas existentes entre eles. Jarne & Delay (1991) consideraram que as distâncias geográficas por si só não reflectem a distância genética entre as populações e, além disso, os moluscos podem ficar sujeitos a alguma dispersão.

Nas últimas décadas, a análise de sequências de ADN dos marcadores moleculares COI e 16S, 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 COI e 16S considerados no presente estudo, parecem ter desempenhado um papel relevante na reconstrução das relações filogenéticas e posição sistemática de *P.*

metidjensis de Portugal e de outras espécies de diferentes regiões, com responsabilidade na transmissão de *Schistosoma* spp e de outros tremátodes

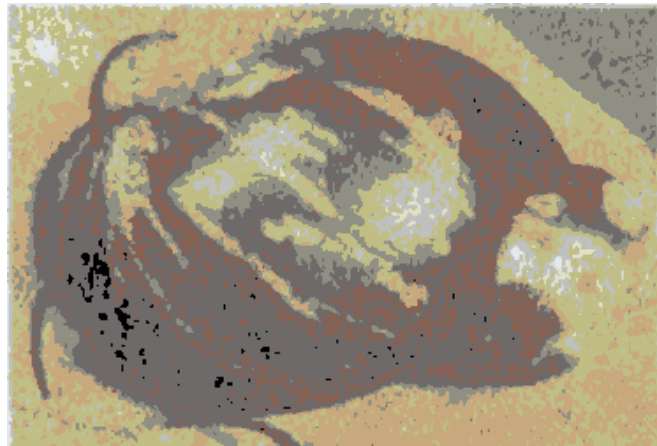
A reconstrução filogenética entre *P. metidjensis* e as diferentes espécies de moluscos é suportada por valores de “bootstrap” estatisticamente significativos para ambas as árvores filogenéticas.

A classificação das espécies do género *Biomphalaria* em dois grupos distintos, em que as espécies de origem africana formaram o grupo africano e as espécies do novo mundo formaram o grupo Neotropical está de acordo com outros estudos já realizados para os mesmos marcadores genéticos (Campbell et al, 2000, Dejong et al, 2001 e Morgan et al, 2002). A relação muito próxima entre a *B. glabrata* (neotropical) e as restantes espécies do género *Biomphalaria* de origem africana, parece sugerir que esta espécie é genealogicamente mais próxima das espécies africanas do que das espécies neotropicais (Mavarez et al, 2002). Uma das hipóteses sobre a sua origem aponta para que esta espécie seja ancestral das espécies africanas. Esta hipótese é corroborada com os registos de fósseis encontrados na América e também com a grande variação morfológica dentro das espécies neotropicais (Bandoni et al, 1995; Dejong, et al, 2001 e Vidigal et al, 2004). Outros dados sugerem que as espécies *B. sudanica*, *B. pfefferii* e *B. alexandrina*, tiveram origem a partir de um ancestral comum (prot-*B. glabrata*) proveniente do continente americano há 2 milhões de anos (Campbell et al, 2000).

A posição de *P. metidjensis* nas árvores surge associada à espécie *Planorbarius corneus* com valores de “bootstrap” estatisticamente significativos. Tradicionalmente, *P. metidjensis* surge agrupado ao género *Helisoma*, como consequência de apresentar características morfológicas semelhantes, diferindo apenas nas características do aparelho reprodutor masculino (Morgan et al, 2002). Posteriormente, resultados de estudos moleculares em que foram utilizados os mesmos marcadores moleculares permitiram sustentar a relação existente entre *Helisoma* e *Planorbarius* na mesma família e interligá-los com *Biomphalaria* (com um valor de “bootstrap” de 92%) (Jørgensen, et al, 2004).

Capítulo 5

Face aos resultados obtidos podemos concluir que a análise usada no presente estudo parece ter contribuído para o esclarecimento das relações filogenéticas desta espécie de moluscos com outras espécies homólogas com implicações na transmissão de *Schistosoma* spp e de outros tremátodes.



Capítulo 6

Contribuição para a caracterização molecular
de *Bulinus truncatus* de Portugal

6.1 - Introdução

Várias espécies de moluscos do género *Bulinus* (Müller, 1781) desempenham um papel importante como hospedeiros intermediários de tremátodes do género *Schistosoma*, nomeadamente do grupo *S. haematobium*. Cada espécie de *Schistosoma* é compatível com um número limitado de espécies de moluscos ou só com uma única. Como se compreende, uma correcta identificação dos hospedeiros intermediários torna-se essencial para um completo conhecimento da epidemiologia da schistosomose em cada foco de transmissão do parasita.

Porém, a identificação dos moluscos do género *Bulinus* é difícil, especialmente quando são jovens, devido aos caracteres morfológicos da concha apresentarem uma grande variabilidade intra-específica. Por outro lado, a anatomia dos órgãos reprodutivos pode ser útil na identificação das espécies, mas não é a técnica mais rápida quando se necessita de examinar um grande número de moluscos, dado que exige a dissecação dos moluscos e a montagem dos referidos órgãos para posterior observação (Brown, 1994).

O uso de técnicas isoenzimáticas tem sido bastante útil na distinção de espécies pertencentes ao género *Bulinus* e na determinação das suas relações filogenéticas (Rollinson, 1979 e Jelnes, 1986). Porém, estas técnicas mostraram-se bastante difíceis quando se tratava de exemplares muito pequenos (Lagand, *et al*, 1993) e não conseguiam dar dados concretos sobre a estrutura genética da população de *B. truncatus*, devido à grande dificuldade na interpretação dos zimogramas específicos (Njiokou *et al*, 1993a e Njiokou *et al*, 1993b). Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular têm sido usadas no estudo da variabilidade de moluscos que desempenham papel importante como hospedeiros intermediários. Por exemplo, Vidigal *et al* (2004) usaram a análise das sequências da Região Interna Transcrita (ITS) do ADN ribossomal na detecção de polimorfismos entre algumas espécies do género *Biomphalaria* (Preston, 1910) e Langand, *et al*, (1999) que quantificaram a diversidade genética entre populações de *Biomphalaria glabrata* através da técnica de RAPD. Várias abordagens moleculares, têm sido realizadas

na identificação e caracterização das espécies pertencentes ao género *Bulinus*, das quais se destacam a utilização da técnica de RAPD, a análise da região interna transcrita através de PCR-RLFP (Stothard *et al*, 1996) e a análise sequencial de genes do ADNmt (Jørgensen *et al*, 2007 e Rollinson, *et al*, 1998).

O presente trabalho, teve como objectivo o estudo da diferenciação genética e variabilidade entre as populações de *Bulinus truncatus* de Portugal, com a amplificação aleatória de polimorfismos de ADN (RAPD) (Williams *et al*, 1990) e a caracterização molecular aplicada ao gene COI do ADNmt e à Região Interna Transcrita (ITS) do ADN ribossomal contribuindo assim para um melhor entendimento sobre a genética destes moluscos que como já foi referido anteriormente, podem ser hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp.

6.2 - Material e métodos

Os exemplares de *B. truncatus* utilizados na extracção de ADN foram provenientes do laboratório de Malacologia da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, colhidos e gentilmente cedidos pela Professora Doutora Maria Amélia Grácio. As populações estudadas encontram-se descritas no Quadro 6.1.

Tabela 6.1 – Populações de *Bulinus truncatus* estudadas.
(n = número de amostras).

Distrito	Habitats
Coimbra	• Coimbra (n=13)
Faro	• Pontinha (n=10) • Ribeira de Arade (n=10) • Ribeira de Estói (n=10) • Silves (n=10) • Vale Judeu (n=10)

Capítulo 6

Dos moluscos, que se encontravam em etanol, retiraram-se o pé e a cabeça para extracção do ADN total, a qual foi realizada de acordo com o protocolo utilizado pela Divisão de Parasitologia Biomédica do Museu de História Natural de Londres (**Anexo 5**).

Na amplificação aleatória de polimorfismos de ADN (RAPD) utilizou-se o kit “Ready-To-Go RAPD Analysis Beads” (Amersham Pharmacia) que é comercializado e preparado para RAPD, e dois oligonucleótidos que fazem parte do kit e que se encontram descritos no capítulo anterior. Nas amplificações com dois oligonucleótidos (os que apresentaram melhores resultados do conjunto de seis oligonucleótidos que constituíam o kit) foi seguida a metodologia indicada no protocolo que acompanha o kit. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler® (Eppendorf). As condições de amplificação foram as mesmas que se descreveram no capítulo anterior.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% suplementado com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Para estimar o peso molecular dos fragmentos amplificados utilizou-se um marcador de massa molecular “HyperLadder II” de 2000 pares de bases. A migração ocorreu a 160V durante duas horas. As bandas de ADN foram visualizadas numa cabine “Eagle Eye® II” (Stratagene).

Na análise da similaridade genética foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados codificados em sistema binário, atribuindo-se (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas. Foram consideradas as bandas visíveis, enquanto que as de difícil resolução, não foram incluídas. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo “Coeficiente de Jaccard” que gerou a matriz de similaridade.

O cálculo de similaridade entre os indivíduos foi realizado utilizando o Coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) conforme a expressão:

$$S_{ij} = a/a+b+c$$

Capítulo 6

- a** – número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;
- b** - número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *i*;
- c** – número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*.

A matriz de similaridade foi construída com o auxílio do programa SPSS (versão 12). Posteriormente, a matriz de similaridade foi transformada em matriz de distâncias (d) usando a fórmula $d=1-S$, a qual foi sujeita a análise com o auxílio do pacote de programas PHYLIP (versão 3.5; Felsenstein, 1993). A matriz foi testada usando o programa Neighbor do PHYLIP e do qual foram gerados vários “clusters”, pelo método de UPGMA (Método de média aritmética não ponderada), que foi expresso na forma dendrograma.

Para a análise inter e intrapopulacional das populações de *B. truncatus* foi usado o programa POPGENE 1.31 (Yeh *et al*, 1999), utilizando os parâmetros para dados haplóides dominantes. Foram estimados os seguintes parâmetros: a variabilidade genética determinada pelo índice de Shannon (H_o) (Lewontin, 1972) e a diversidade genética de Nei (1973) (H_e). A diferenciação genética entre e dentro da população foi determinada pela Diversidade Genética de Nei (1987) (G_{st}). Para o nível de diferenciação estabeleceu-se a definição proposta por Wright (1978) em que os valores de 0,00 a 0,05 representam pequena diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 diferenciação moderada, valores entre 0,15 e 0,25 alta diferenciação e maiores que 0,25 elevada diferenciação genética.

A amplificação do ADN genómico dos moluscos foi realizada por reacção de PCR, aplicada aos genes COI (Cytochrome oxidase sub-unit I) do ADN mitocondrial e à Região Interna Transcrita (ITS) dos operões de ADN ribossomal. No primeiro caso, os fragmentos foram amplificados utilizando os oligonucleótidos universais descritos por Folmer *et al* (1994) e para o segundo os fragmentos foram amplificados com os oligonucleótidos ETTS1 e ETTS2 (Kane & Rollinson, 1994), os quais se encontram descritos na **Tabela 6.2.**

Tabela 6.2 - Oligonucleótidos utilizados na amplificação e sequenciação.

Gene a ser amplificado	Sequência dos oligonucleótidos (Fwd)
COI	Folmer 1 (Folmer <i>et al</i> , 1994)
ITS (ETTS1)	5' -TGCTTAAGTTCAGCGGGT- 3'
Sequência dos oligonucleótidos (Rvs)	
COI	Folmer 2 (Folmer <i>et al</i> , 1994)
ITS (ETTS2)	5' -TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3'

As reacções de amplificação do gene COI do ADN mitocondrial e ITS foram efectuadas em volumes de 25 µl, utilizando o kit “puREtaq ready-To-Go PCR beads” comercializado pela “AMersham Biosciences”. Em cada reacção de PCR foi também incluída uma amostra negativa (sem ADN) que serviu de controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Mastercycler ® (Eppendorf). A ampliação de COI foi realizada com os oligonucleótidos CO1 e CO2, cujo volume das amostras para PCR foi de 25 µl. As amplificações do gene COI e da região ITS foram realizadas com um passo de desnaturação a 95° C durante 5 minutos, seguindo-se 37 ciclos de ampliação a 95° C durante 15 segundos, a 58° C durante 30 segundos e 72° C durante 90 segundos e uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos de ADN foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato 40mM EDTA 1mM; pH 8,3), onde foi incorporado brometo de etídio, numa concentração de 0,5 µg/ml. Juntamente com os produtos de PCR foi também adicionado um marcador de massa molecular “HyperLadder II (Bioline). Cada 6 µl de produto de PCR foi depositado no gel de agarose aos quais se

Capítulo 6

adicionou 1 µl de tampão de aplicação. A migração foi feita a 120 V durante, aproximadamente, trinta e cinco minutos. Os fragmentos de ADN amplificados foram visualizados sob radiação ultravioleta (UV) por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado do ADN, numa cabine “Eagle Eye® II” (Stratagene).

Para a realização da sequenciação, os produtos de PCR foram purificados usando as colunas de purificação Qiaquick PCRTM comercializadas pela Qiagen Inc. Todos os produtos de PCR foram sequenciados em ambos os sentidos utilizando o kit de sequenciação SequiTherm ExcellTM ADN comercializado pelo Cambio (UK) seguindo o protocolo indicado. Os produtos de PCR, depois de purificados, foram submetidos a reacção de sequenciação num sequenciador automático (MWG Biotech, UK). As sequências foram determinadas em ambas as sentidas, usando *e-seq*TM e alinhadas com o auxílio de Align IR (vers. 1.2).

As sequências nucleotídicas parciais obtidas para o gene COI e para a região ITS foram analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (Blast) (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), o que permitiu a pesquisa de sequências semelhantes depositadas nas bases de dados de acesso público e que estão depositadas no GenBank (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). As sequências obtidas, quer as de *B. truncatus*, quer as que se obtiveram com recurso ao Genbank foram alinhadas com o apoio do programa ClustalW (Thompson *et al*, 1994), ainda que alguns ajustes tenham sido introduzidos manualmente, à posterior (**Anexo 12, Tabela A12**).

Os estudos de inferência filogenética para os diferentes haplotipos foram realizados com o auxílio do programa MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2004), onde se calcularam as matrizes de distância genética pelo modelo de dois parâmetros de Kimura e construídos os respectivos dendrogramas pelo método UPGMA, para a observação do agrupamento das populações de acordo com os polimorfismos encontrados.

Capítulo 6

A estimativa do número médio de diferenças nucleotídicas (K), da diversidade nucleotídica (π) e a diversidade de haplotipos (HD) foram analisados com o apoio do programa DnaSP 4.10.7 (Rozas *et al*, 2003).

A análise estatística da genética populacional foi realizada através das análises das frequências e distribuição de haplótipos utilizando também o mesmo programa. Os níveis de estruturação das populações foram inferidos pela análise da divergência genética entre populações de (F_{st}), (Hudson *et al*, 1992) e o fluxo gênico através do número de migrantes por geração (Nm).

A análise filogenética foi conduzida através do programa MEGA version 3.1 (Kumar *et al*, 2004), incluindo o cálculo da composição nucleotídica e a distância genética. Também, com o auxílio do programa MEGA e pelo método “neighbour-joining” (junção de vizinhos) foi construída uma árvore filogenética, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo método de dois parâmetros de Kimura, para o gene COI e para a região ITS. Os valores de confiança, para os ramos individuais da árvore, foram determinados por análise de “bootstrap” obtidos com 1.000 réplicas aleatórias dos dados.

6.3 Resultados.

6.3.1. - Amplificação Aleatória de Polimorfismos de ADN (RAPD)

6.3.1.1. - Variabilidade genética entre as populações de *B. truncatus*

Dos cinco oligonucleótidos que constituem o kit, apenas dois (P1 e P2) foram os que apresentaram os dados passíveis de interpretação, reproduzindo polimorfismos cujo tamanho variou de 300 bp a 650 bp, (Figura 6.1). Ambos os oligonucleótidos apresentaram 7 loci polimórficos, para um total de 63 amostras.

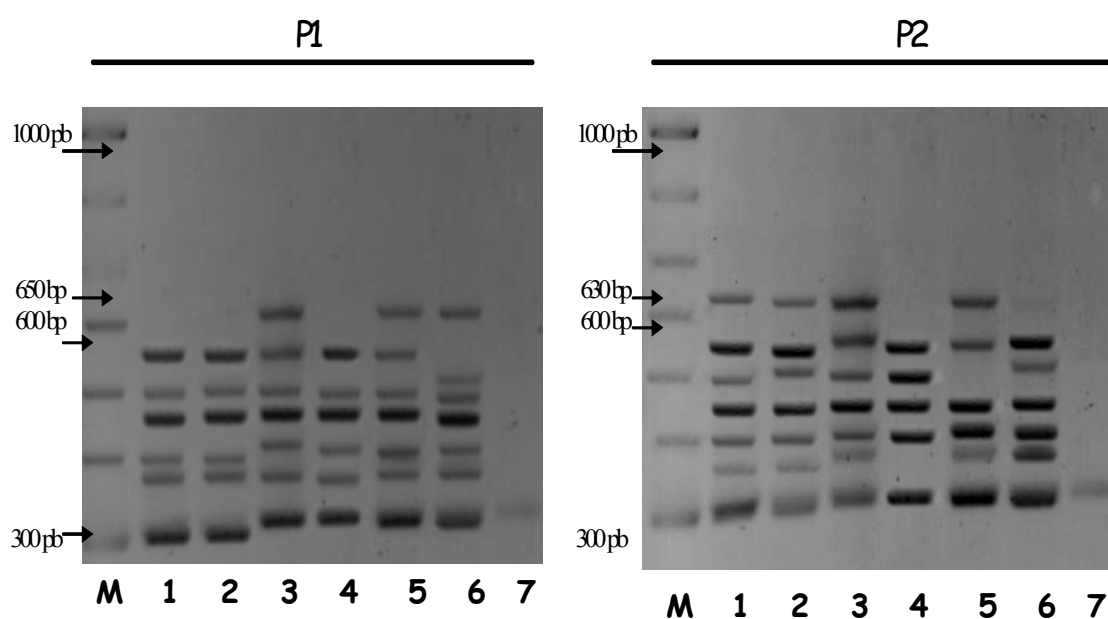


Figura 6.1 - Gel de agarose a 1% mostrando os perfis de RAPD de *B. truncatus* de diferentes habitats usando os oligonucleótidos 1 (P1) e o 2 (P2). M - marcador de massa molecular, ilves; 2-Arade; 3-Estói; 4- Pontinha; 5-Vale Judeu; 6- Coimbra; 7-controlo.

Os valores estimados para os índices de diversidade genética intrapopulacional estão descritos na Tabela 6.3. A diversidade genética de Nei (H_e) variou entre 0,2240 (para a Ribeira de Estói) e 0,2851 (para Pontinha), evidenciando diferentes níveis de

variação intraespecífica. Os valores estimados para o Índice de Shannon (H_o) variaram de 0,3302 a 0,4038. Os resultados evidenciaram alta variabilidade genética dentro dos habitats, ou seja, alta variabilidade intrapopulacional ($H_o=0,5294$ e $H_e=0,3559$).

Tabela 6.3 - Índice de Shannon e diversidade genética nos seis habitats de *B. truncatus*. () desvio padrão.

Habitats	Distritos	Índice de Shannon (H_o)	Diversidade genética (H_e)
Coimbra	Coimbra	0,3719 (0,3347)	0,2415 (0,2415)
Pontinha		0,4038 (0,3422)	0,2851 (0,2454)
Ribeira do Arade		0,3302 (0,3556)	0,2344 (0,2539)
Ribeira de Estói	Faro	0,3340 (0,3049)	0,2240 (0,2159)
Silves		0,3504 (0,3219)	0,2396 (0,2323)
Vale Judeu		0,4011 (0,3419)	0,2830 (0,3194)
Total		0,5294 (0,1787)	0,3559 (0,1498)

6.3.1.2. - Similaridade genética intrapopulacional.

A similaridade genética estimada pelo Coeficiente de Jaccard (Tabela 6.4), indicou que os moluscos colhidos na Ribeira de Arade apresentaram maior similaridade com os moluscos colhidos na Pontinha (0,857), sugerindo uma maior proximidade genética entre estes dois habitats. Por outro lado, a menor similaridade verificou-se com os moluscos colhidos em Coimbra (0,417). Os moluscos colhidos na Ribeira de Estói apresentaram maior similaridade com os moluscos colhidos em Silves (0,625), seguindo-se Vale de Judeu (0,556), Pontinha (0,400) e, por fim, Coimbra com 0,500. As maiores

distâncias genéticas observadas ocorreram entre os moluscos colhidos em Coimbra e os colhidos na Pontinha (0,333), seguindo-se a Ribeira do Arade (0,417) (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 - Matriz de similaridade estimada pelo “Coeficiente de Jaccard” para os habitats de *B. truncatus* estudados, baseada nas bandas obtidas para os dois oligonucleótidos (P1 e P2).

Habitats	Coeficiente de Jaccard					
	Coimbra	Rib.Arade	Rib. Estói	Pontinha	Silves	Vale Judeu
Coimbra	1,000					
Rib. Arade	0,417	1,000				
Rib. Estói	0,500	0,500	1,000			
Pontinha	0,333	0,857	0,400	1,000		
Silves	0,500	0,500	0,625	0,375	1,000	
Vale Judeu	0,455	0,625	0,556	0,500	0,571	1,000

Com base nos resultados óbitos pelo Índice de Similaridade de Jaccard, foi construído o dendrograma pelo método UPGMA, (Figura 6.2.).

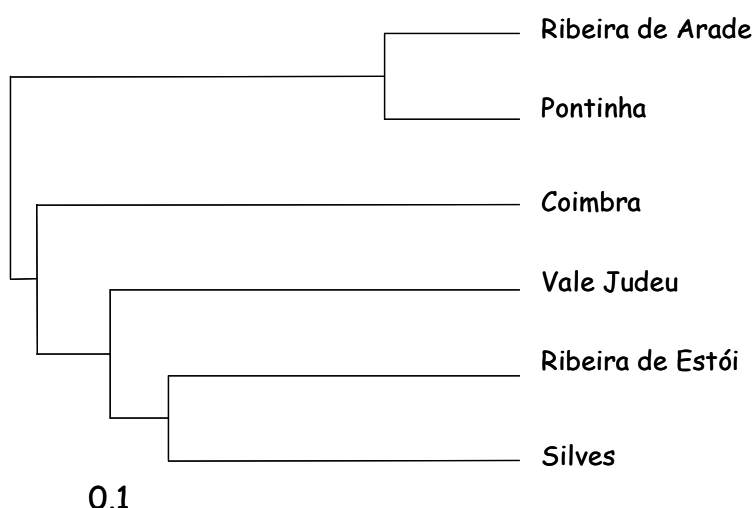


Figura 6.2 – Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA (da média aritmética não ponderada) para o coeficiente de Jaccard para os perfis de RAPD representativo da similaridade genética entre os habitats de *B. truncatus*.

O dendrograma evidência a formação de um grupo separado, formado pelos habitats Ribeira de Arade e Pontinha que apresentaram uma similaridade elevada (0,857). A análise de agrupamento não permitiu suportar a existência de uma relação entre a proximidade geográfica dos habitats e a sua similaridade genética, ou seja, indivíduos mais próximos localmente serem também os mais próximos geneticamente.

6.3.1.3. - Caracterização da variabilidade genética.

A diferenciação genética entre e dentro dos habitats foi calculada de acordo com *Nei* (1973) e encontra-se descrita na Tabela 6.5.

Tabela 6.5. – Diversidade genética de *Nei* (1973) para os seis habitats de *B. truncatus*.

	(Ht)	(Hs)	(Gst)	(Nm)
Média	0,3555	0,2541	0,2845	1,05
Desvio padrão	0,0225	0,0176	—	—

Ht – Diversidade genética total; Hs – diversidade genética entre habitats; Gst – Coeficiente de diferenciação genética (relação entre a diversidade genética entre habitats e a diversidade genética total); Nm – fluxo génico ($Nm = 0.5 (1 - Gst)/Gst$).

A média da diversidade genética total (Ht) foi de 0,3555 (0,0225), enquanto dentro dos habitats a diversidade genética encontrada foi de 0,2541 (0,0176) (Hs). A diversidade genética entre as populações (Gst) foi de 0,2845, demonstrando que 28,5% da variabilidade genética se encontra entre os habitats e 71,5% dentro dos habitats. O valor obtido para Gst sugere uma elevada diferenciação genética segundo definição de Wright (1978). O fluxo génico (Nm) estimado para os seis habitats em estudo foi de 1,05 migrantes por geração,

6.3.2. Diversidade molecular de *Bulinus truncatus*

6.3.2.1. Polimorfismo do gene COI do ADN mitocondrial

Em todos os habitats analisados, observou-se a amplificação de um fragmento com aproximadamente 520 bp, sem que houvesse variação do produto de PCR. A Figura 6.3 mostra 6 dos 48 produtos de PCR amplificados para o gene COI do ADN mitocondrial.

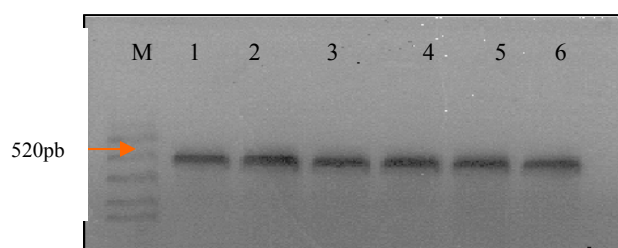


Figura 6.3 - Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene COI.
1-Estoi; 2- Pontinha; 3-Silves; 4- Arade; 5-Vale Judeu;
6 – Coimbra e M- marcador de massa molecular.

6.3.2.2 - Variabilidade nucleotídica

Dos seis habitats, cujas amostras foram sequenciadas, a Pontinha foi retirada da amostra por não ter apresentado bons resultados após sequenciação, tendo ficado para este estudo os habitats de Coimbra, Estói, Vale de Judeu, Arade e Silves. O fragmento amplificado por PCR do gene COI, apresentou uma média de bases nucleotídicas de 14,76 % para a citosina (C), 41,55 % para a timina (T); 26,43 % para adenina (A) e 17,26 % para a guanina (G). (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Distribuição da percentagem dos nucleótidos nas sequências analisadas nos seis habitats. (n = amostra/área).

	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
Rib. Arade (n=8)	14,2	41,83	26,63	17,34
Rib. Estói (n=8)	15,1	41,65	26,08	17,08
Silves (n=8)	16,3	40,46	26,1	17,14
Vale Judeu (n=8)	14,91	41,35	26,57	17,17
Coimbra (n=8)	13,21	42,46	26,81	17,52
Média	14,76	41,55	26,43	17,26

6. 3. 2.3. - Distribuição e análise dos haplotipos

As sequências parciais que foram analisadas apresentaram nove haplotipos diferentes, com exceção do haplotipo 4 (Hap 4) que foi encontrado em dois dos cinco habitats estudados (Ribeira de Estói (**Anexo 13, Tabela A13**)). Todos os habitats apresentaram a mesma frequência relativa (0,5) (**Tabela 6.7**).

.

Tabela 6.7 – Número e frequência relativa dos haplotipos identificados do gene COI nos diferentes habitats. () - frequência relativa dos haplotipos.

Coimbra	Ribeira de Arade	Ribeira de Estói	Silves	Vale Judeu
Hap 1 (0,5)	Hap 5 (0,5)	Hap 4 (0,5)	Hap 3 (0,5)	Hap 4 (0,5)
Hap 2 (0,5)	Hap 6 (0,5)	Hap 9 (0,5)	Hap 7 (0,5)	Hap 8 (0,5)

Na **Tabela 6.8**, estão descritos o número de zonas polimórficas (S), número médio de diferenças nucleótídicas (K), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica. Os polimorfismos de nucleótidos simples (“Single nucleotide polymorphism”) do gene

COI mostrou, através do cálculo da diversidade nucleotídica, que os habitats de *B. truncatus* analisados, apresentaram um nível de polimorfismo médio, ($\pi = 0,02965$), ou seja, o número de polimorfismos em sequências de COI de *B. truncatus* em cada um dos habitats analisados, apresentou uma média de 29 SNPs por 1000 bp. A diversidade haplotípica ($Hd=1,0$) apresentada foi igual para todos os habitats.

Tabela 6.8 – Índice de polimorfismos do gene COI nos diferentes habitats de *B. truncatus* analisados.

Habitats	Nº de haplotipos	K	π	Hd
Coimbra	2	6,00	0,01604	1,00
Ribeira de Arade	2	8,00	0,02139	1,00
Ribeira de Estói	2	30,00	0,08021	1,00
Silves	2	5,00	0,01337	1,00
Vale Judeu	2	15,00	0,0401	1,00
Total	9	11.088	0,02965	0,98

K – número médio de diferenças nucleotídicas; π - Diversidade nucleotídica; Hd– Diversidade haplotípica.

Com base no cálculo de distância genética par a par entre os haplotipos e usando o modelo de Kimura 2-parâmetros, foi obtida uma matriz de distância e posteriormente construído o dendrograma que mostra as relações entre os haplotipos encontrados no gene COI (Figura 6.4). Os haplotipos 8 e 9 mostraram ser os mais diferenciados comparando com os demais, com valores que variaram entre 0,69 e 0,008 (Tabela 6.9). A disposição geral dos haplotipos na árvore parece evidenciar uma ligeira diferenciação genética entre os habitats estudados. Um agrupamento externo, com um valor de “bootstrap” de 78%, unia dois agrupamentos internos com valores de “bootstrap” de 51% evidenciando a igualdade entre os haplotipos Hap 2, Hap 1 e Hap 4, e outro agrupamento a unir os haplotipos Hap 5 e Hap 6 (“bootstrap” de 60%).

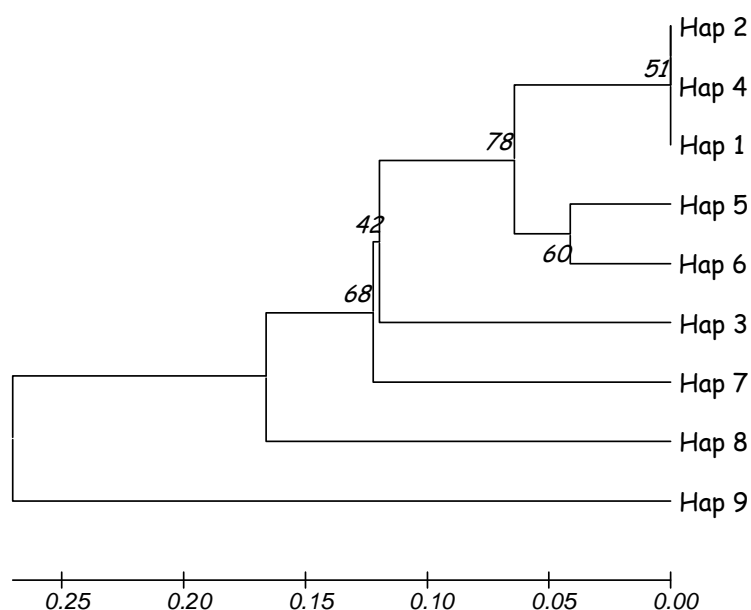


Figura 6.4 – Dendrograma, calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os nove haplotipos do gene COI. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-parâmetros.

Tabela 6.9 - Matriz da distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplotipos do gene COI de *B. truncatus*.

	Hap 1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7	Hap 8	Hap 9
Hap 1	**								
Hap 2	0,00	**							
Hap 3	0,23	0,23	**						
Hap 4	0,00	0,00	0,23	**					
Hap 5	0,08	0,08	0,31	0,08	**				
Hap 6	0,08	0,08	0,23	0,08	0,08	**			
Hap 7	0,23	0,23	0,54	0,23	0,23	0,08	**		
Hap 8	0,31	0,31	0,08	0,31	0,54	0,38	0,69	**	
Hap 9	0,69	0,69	0,23	0,69	0,54	0,54	0,92	0,54	**

Na **Figura 6.5** está representado o dendrograma evidenciando, a disposição dos cinco habitats e os haplotipos encontrados em cada um delas. Formaram-se dois grupos distintos com valores de “bootstrap” de 57% e 73%, respectivamente. As localizações Ribeira de Estói e Silves no dendrograma estão associadas aos haplotipos Hap 9, Hap, 3 e Hap 7 por serem também os mais distantes, quando comparados com os restantes (**Figura 6.4**).

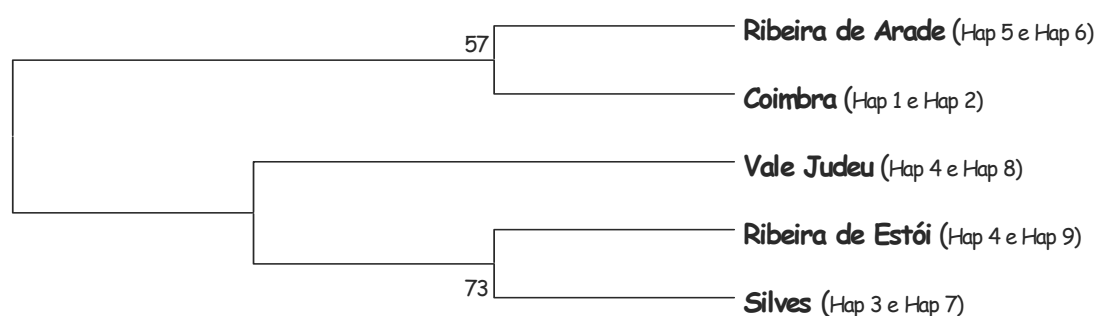


Figura 6.5 – Dendrograma, calculado a partir do método UPGMA, mostrando as relações filogenéticas entre os cinco habitats e os haplotipos encontrados em cada um deles. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.

O índice F_{st} (índice de Fixação) Wright ($F_{st} = -0,169$), parece ter evidenciado que entre as populações não houve diferenciação genética e que a variação intrapopulacional parece ser superior à interpopulacional, indicando que estamos perante a mesma população.

6.3.3. - Polimorfismo da Região Interna Transcrita (ITS) do ADN ribossomal

Os extractos de ADN total, preparados a partir de *B. truncatus* colhidos em todos os habitats em estudo, permitiram a amplificação de um fragmento com aproximadamente 750 bp, não havendo variação do produto de PCR. A Figura 6.6 mostra 6 dos 48 produtos de PCR amplificados para a região ITS.

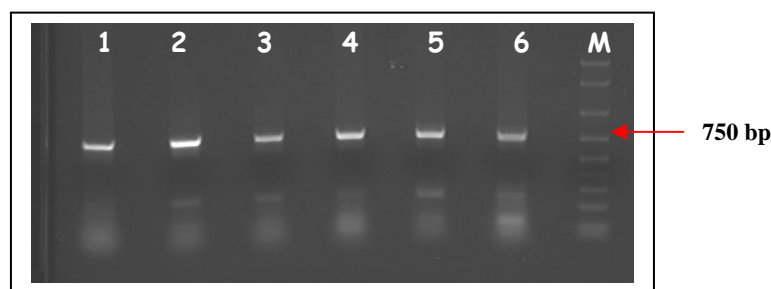


Figura 6.6- Gel de agarose 1% dos produtos de PCR da região ITS.

1-Estoi; 2- Pontinha; 3-Silves; 4- Arade; 5-Vale Judeu;
6 – Coimbra; M- marcador molecular.

6.3.3.1 - Variabilidade nucleotídica

A média de bases nucleotídicas calculada foi de 29,3 % para a citosina (C), 21,6 % para a timina (T); 21,8 % para adenina (A) e 27,3 % para a guanina (G). O par C+T apresentou uma percentagem de 56,6% (Tabela 6.10.)

Tabela 6.10. – Percentagem de bases nucleotídicas das sequências da região ITS encontradas nos diferentes distritos estudados. (n = amostra/área).

	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)
Arade (n=8)	29,2	20,2	22,3	28,3
Estói (n=8)	28,8	22,2	20,8	28,2
Silves (n=8)	29,4	25,4	21,6	23,6
Vale Judeu (n=8)	29,6	19,6	22,5	28,3
Coimbra (n=8)	29,5	20,6	21,8	28,1
Média	29,3	21,6	21,8	27,3

6.3.3.2. - Distribuição e análise dos haplotipos

Nas sequências parciais analisadas foram identificados sete haplotipos diferentes (Anexo 14, Tabela A14). O haplotipo dois (Hap 2) foi encontrado em três dos cinco habitats estudados. Das populações analisadas, Estói foi o único habitat monomórfico por apresentar um único haplotipo. A frequência relativa dos haplotipos foi igual para todos os habitats (0,5), com exceção para Estói em que a frequência foi 1,0 (Tabela 6.11).

Tabela 6.11. – Número e frequência relativa dos haplotipos identificados nas Sequências parciais da região ITS nos diferentes habitats.

() - frequência relativa dos haplotipos.

Coimbra	Ribeira de Arade	Ribeira de Estói	Silves	Vale Judeu
Hap 1 (0,5)	Hap 2 (0,5)	Hap2 (1,00)	Hap 2 (0,5)	Hap 3 (0,5)
Hap6 (0,5)	Hap 5 (0,5)		Hap 7 (0,5)	Hap 4 (0,5)

Na **Tabela 6.12** estão descritos o número de zonas polimórficos (S), o número médio de nucleótidos diferentes (K), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica (Hd). Os polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) da região ITS calculados através da diversidade nucleotídica, demonstraram que os habitats de *B. truncatus* analisados, apresentaram um nível de polimorfismo alto, ($\pi = 0,366$), ou seja, o nível de polimorfismo apresentou uma média de 366 SNP por 1000 bp. A diversidade haplotípica apresentada foi igual para todos os habitats (1,0).

Tabela 6.12. – Índice de polimorfismos das sequências parciais da região ITS nos diferentes habitats de *B. truncatus* analisados.

Habitats	Nº de haplotipos	K	π	Hd
Coimbra	2	40,3	0,566	1,00
Ribeira de Arade	2	40,3	0,566	1,00
Ribeira de Estói	1	—	—	—
Silves	2	43,7	0,613	1,00
Vale Judeu	2	40,4	0,567	1,00
Total	7	26,0	0,366	0,964

K – número médio de diferenças nucleotídicas; π - Diversidade nucleotídica;
Hd– Diversidade haplotípica.

Baseado na distância genética entre os haplotipos par a par, foi construído um dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA), que mostra as relações entre os haplotipos encontrados para a região ITS (**Figura 6.6**). A maioria dos haplotipos encontrados apresentou uma diversidade genética com valores que variaram entre 0,00 e 0,18. No entanto o haplotipo 4 (Hap 4) apresentou um elevado índice de diferenciação genética comparando com os demais haplotipos, com valores que variaram entre 0,25 e 0,18, apresentando-se como o mais basal relativamente aos restantes

(Tabela 6.13). Dois agrupamentos internos com valores de “bootstrap” elevados foram observados unindo os haplotipos Hap 5, Hap 7, Hap 6 e Hap 3 (“bootstrap”= 85%) e os haplotipos Hap 1 e Hap 2 (“bootstrap”= 71%) (Figura 6.7).

Tabela 6.13 - Matriz da distância genética baseada no modelo de Kimura 2 - parâmetros (1980) entre os diferentes haplotipos da região ITS de *B. truncatus*.

	Hap1	Hap 2	Hap 3	Hap 4	Hap 5	Hap 6	Hap 7
Hap1	**						
Hap 2	0,00	**					
Hap 3	0,06	0,06	**				
Hap 4	0,25	0,25	0,18	**			
Hap 5	0,06	0,06	0,00	0,18	**		
Hap 6	0,06	0,06	0,06	0,18	0,00	**	
Hap 7	0,06	0,06	0,00	0,18	0,00	0,00	**

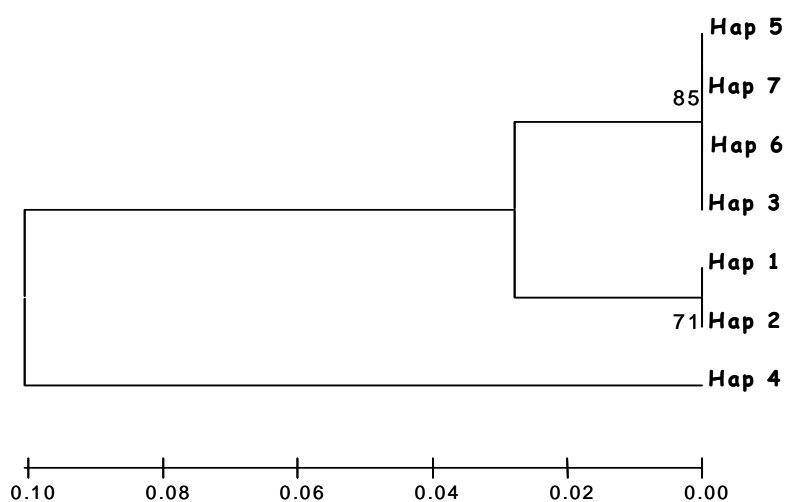


Figura 6.7 - Dendrograma calculado a partir do método UPGMA, mostrando as relações filogenéticas entre os sete haplotipos da região ITS. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2- parâmetros.

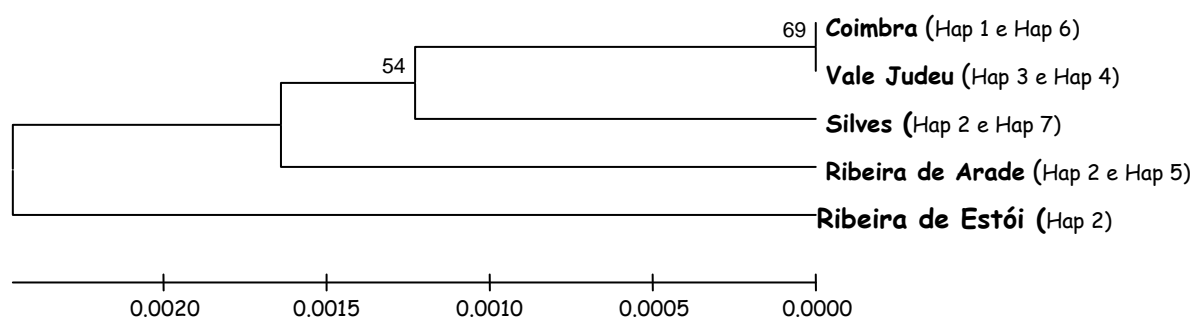


Figura 6.8. – Dendrograma, calculado a partir do método UPGMA, mostrando as relações filogenéticas entre os cinco habitats e os haplotipos encontrados em cada um deles. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um “bootstrap” de 1000 réplicas usando o modelo de distância genética de Kimura 2-pâmetros.

A **Figura 6.8** mostra, a disposição dos cinco habitats e os haplotipos encontrados em cada um delas. Formaram-se dois grupos distintos com valores de “bootstrap” de 69% e 54%, respectivamente. A Ribeira de Estói por apresentar um único haplotipo foi o habitat mais distante quando comparado com os demais. Coimbra e Vale Judeu por apresentarem quatro haplotipos distintos dos demais habitats formaram um grupo separado com um valor de “bootstrap” de 69% (Figura 6.8).

O Índice de Fixação F_{st} não foi significativo ($F_{st} = -0,746$), evidenciando que não houve diferenciação genética entre as populações dos diferentes habitats, indicando que estamos perante a mesma população, tal como já se tinha verificado nos resultados obtidos para o gene COI.

6.3.4. - Análise filogenética

A análise filogenética das sequências parciais de *B. truncatus* obtidas para os genes que codificam a enzima citocromo oxidase (COI), localizada no ADN mitocondrial, e para a Região Interna Transcrita (ITS) do ADN ribossomal, 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, para ambas as sequências analisadas, a formação de cinco e quatro grupos distintos, respectivamente. Na árvore filogenética obtida para o gene COI, foi adicionada a espécie *Choanomphalus annuliformis* como um grupo externo (“outgroup”) (Figura 6.9), enquanto a espécie *Albinaria forbesiana* funciona como que um grupo externo para a árvore filogenética para a região ITS (Figura 6.10).

Na análise do gene COI, a árvore é constituída por três ramos principais. O primeiro é formado pelos grupos I e II onde se agrupam as diferentes espécies de moluscos pertencentes ao género *Biomphalaria*, agrupado segundo a origem das espécies, destacando-se as espécies do velho continente, ou africanas (grupo I), do qual fazem parte as espécies *B. alexandrina*, *B. choanomphala*, *B. angulosa*; *B. sudanica*, *B. pfefferii* e *B. camerunensis* e as espécies do novo continente, ou neotropical (grupo II), que engloba as espécies *B. glabrata*, *B. obstructa*, e *B. straminea*.

O segundo ramo principal é formado pelos grupos III e IV. O primeiro grupo é formado por uma única espécie (*Indoplanorbis exutus*) e o quarto grupo, pela espécie de *B. truncatus* de Portugal e a única sequência de moluscos pertencente ao género *Bulinus* (*B. tropicus*) encontrado nas bases de dados (Genbank). Este ramo é suportado por um valor de “bootstrap” bastante elevado (97%) e estatisticamente significativo. Ambas as espécies pertencem ao complexo *B. truncatus/tropicus*.

A associação entre a espécie *Indoplanorbis exutus* e o grupo de moluscos pertencente ao género *Bulinus* é sugerida pela formação de um grupo monofilético. No

entanto, o valor de “bootstrap” associado a este ramo encontra-se no limite do estatisticamente significativo (76%). Por fim, o terceiro ramo principal é formado pela espécie *Laevapex fuscus* (género *Laevapex*), suportado por um valor de “bootstrap” de 79% (Figura 6.9).

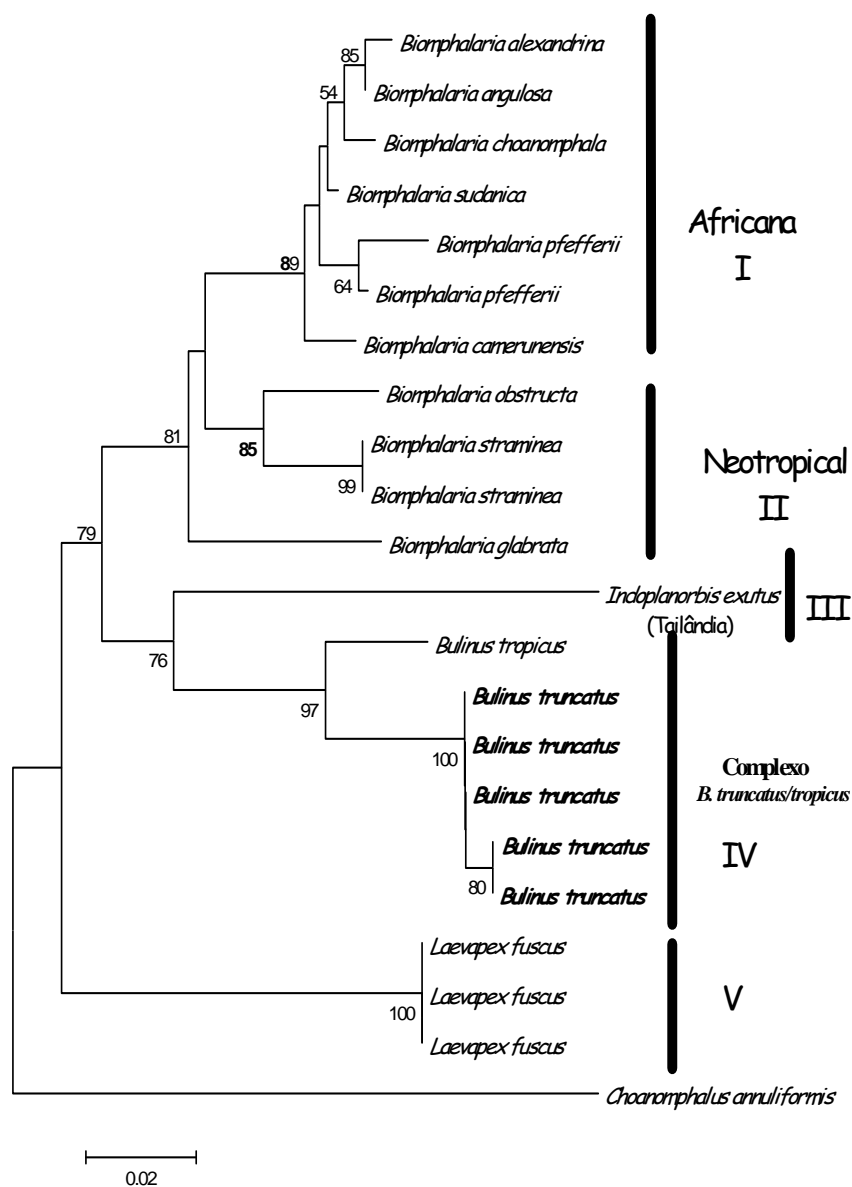


Figura 6.9. – Relação filogenética entre as várias populações de *Bulinus truncatus* de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de *Schistosoma spp* e de outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais do gene COI através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de Kimura 2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. As amostras dos moluscos de Portugal estão assinaladas a negrito.

Capítulo 6

Relativamente à análise da região ITS (Figura 6.10), a árvore obtida apresenta uma topologia semelhante à anterior, registando-se a formação de três ramos principais. O primeiro, semelhante ao já descrito anteriormente, é formado pelos Grupos I e II do qual fazem parte as espécies africanas (*Biomphalaria sudanica* e *B. pfefferi*) e as espécies neotropicais (*Biomphalaria glabrata*, *B. prona*, *B. tenagophila*, *B. obstructa*), formando um grupo heterogéneo, com um suporte de “bootstrap” máximo (100%). Associado a este grupo encontra-se a espécie *Helisoma trivolvis*.

O segundo ramo é formado pela espécie *Bulinus truncatus* (Portugal) e a única sequência hómologa encontrada no Genbank (*B. truncatus* - Sudão) formando um grupo monofilético, com alto suporte de “bootstrap” (99%). O terceiro ramo é formado pelas espécies *Stagnicola elodes*, *S. emarginata* e *S. caperata*.

A espécie *Biomphalaria glabrata* (gene COI) e a espécie *Helisoma trivolvis* (Região ITS) parecem constituir um ramo basal, relativamente às restantes espécies de *Biomphalaria*, separados com um valor de “bootstrap” de 78% e 99%, respectivamente.

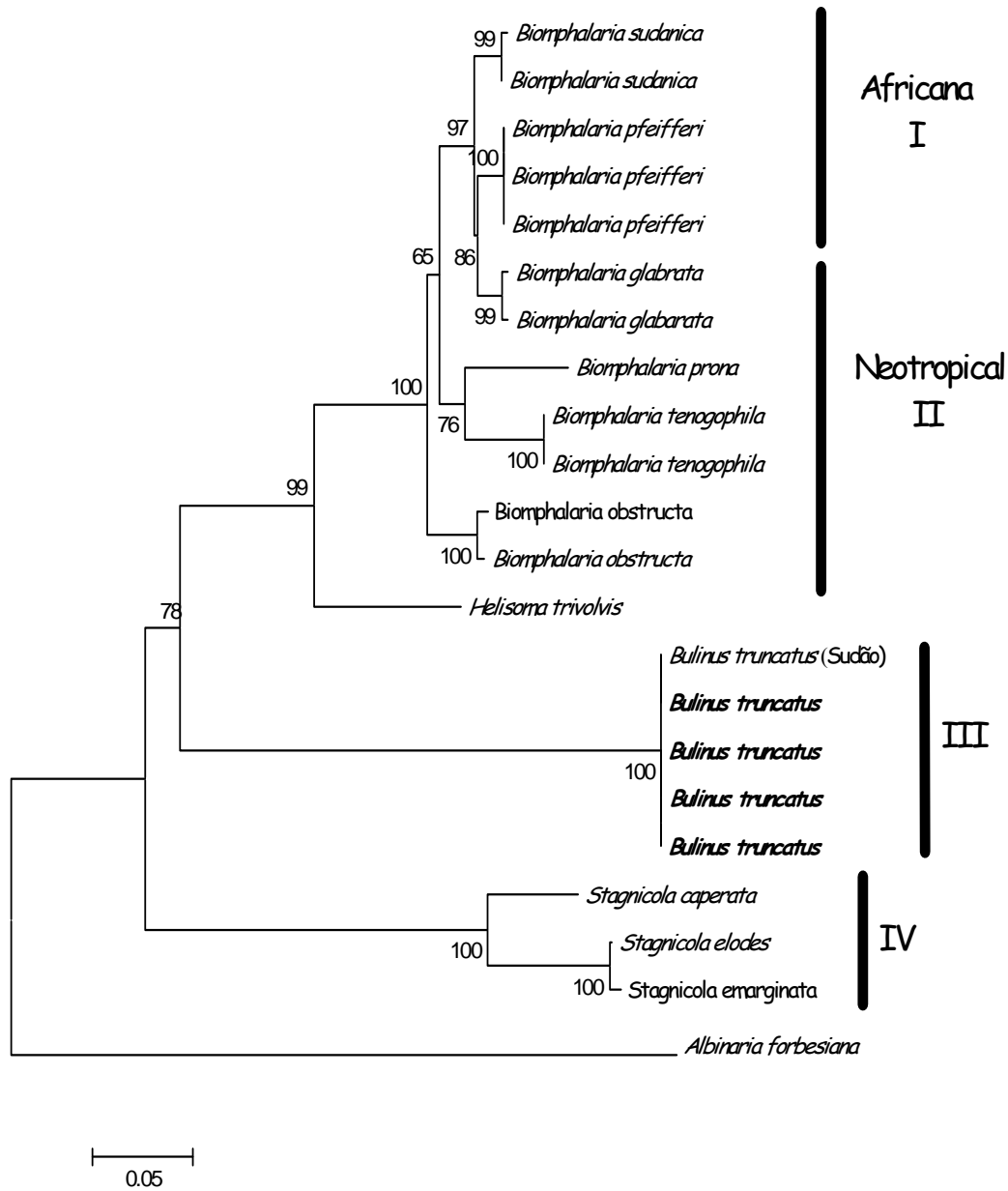


Figura 6.10. – Relação filogenética entre as várias populações de *Bulinus truncatus* de Portugal e outras espécies de moluscos hospedeiros de *Schistosoma spp* e outros tremátodes, inferidas pela análise das sequências parciais da região ITS através do método “neighbor joining”, tendo por base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de Kimura 2-parâmetros. Os números que se encontram sobre os ramos indicam os valores de confiança, determinados por análise de “bootstrap” com 1000 réplicas. As amostras dos moluscos de Portugal estão assinaladas a negrito.

6.4 - Discussão e conclusões

Apesar do número de amostras e de oligonucleótidos utilizados neste estudo não terem sido elevados, a técnica molecular RAPD-PCR parece-nos ter revelado ser um meio adequado para analisar a variação genética de *Bulinus truncatus*. As amplificações de ADN por esta técnica resultaram num número suficiente de fragmentos polimórficos que possibilitou fazer um primeiro estudo do material genético desta espécie de moluscos.

É importante salientar que embora os marcadores de RAPD não representem a melhor ferramenta para definir e diferenciar populações, pois os polimorfismos de RAPD caracterizam-se pela ausência ou presença de produtos amplificados, sendo portanto um marcador dominante, com o qual não é possível a distinção entre homozigotos e heterozigotos, limitando a inferência estatística feita com RAPDs, especialmente em organismos diplóides (Lacerda *et al*, 2002).

Os resultados do nosso estudo obtidos pela técnica de RAPD, evidenciaram uma alta variabilidade genética intrapopulacional determinada pelo Índice de diversidade genética de Shannon que variou de 0,4038 a 0,3302. Com base no nível de diferença genética proposta por Wright (1978), em que valores de 0,00 a 0,05 apresentavam pequena diferenciação genética, valores entre 0,05 a 0,15, entre 0,15 a 0,25 e maiores que 0,25, apresentavam moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente, o valor de G_{st} (0,28) obtido indica uma elevada diferenciação genética entre as populações, ou seja, 28% da variabilidade genética encontra-se entre as populações e 72% dentro das populações.

Estes valores foram semelhantes aos obtidos em outros estudos, nomeadamente em populações de *Biomphalaria glabrata* (Langand *et al*, 1993 e 1999), cujos valores para o índice de Shannon variaram de 0,571 a 0,303 e as populações apresentaram uma elevada variabilidade intrapopulacional. Por vezes, populações com um alto nível de diversidade genética são como um tampão contra as alterações nos habitats a que estão sujeitos os moluscos e que poderão levar à sua extinção (Mukaratirwa *et al*, 1996).

Capítulo 6

Porém, outros estudos realizados utilizando a electroforese de proteínas, evidenciaram que populações naturais de *Bulinus truncatus* apresentavam uma baixa variabilidade genética (Wright & Rollinson, 1981, Jelnes, 1986 e Njiokou *et al*, 1993a e 1993b) em que a causa provável dessa baixa variabilidade estava relacionada com a deriva genética, a qual ocorre ao acaso em pequenas populações naturais (Woolkouse & Chadiwana, 1989 e Jarne & Delay, 1991). Também estudos mais recentes em que a técnica de RAPD foi utilizada para determinar a variabilidade genética da *Biomphalaria glabrata* (Campos *et al*, 2002), da *Lymnaea columella* (Cardoso *et al*, 2006), concluíram que as populações naturais destas duas espécies de moluscos, apresentavam alta variabilidade genética entre as populações e baixa dentro das populações.

Também Jarne & Delay, (1990, 1991) e Cardoso *et al*, (2002), concluíram que os níveis de variabilidade entre as populações varia com o valor estimado para o fluxo génico, em que baixa diferenciação genética entre as populações traduz um alto fluxo génico e vice versa.

A diferenciação genética encontrada entre as populações parece não ter sido influenciada pelo número de migrantes por geração o qual foi ligeiramente superior a 1 ($Nm=1,05$). Segundo Mukaratirwa *et al*, (1996 e 1998) um baixo fluxo génico não é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, a qual é muitas vezes gerada pelo isolamento das populações naturais devido à sua fragmentação

Segundo Wrihgt (1943 *cit* Mukaratirwa *et al*, 1996) se o número de migrantes por geração for menor que 1 sugere um largo impacte na deriva genética. Porém, um fluxo génico baixo não significa que haja ausência de fluxo de genes (Coutllec-Vreto, *et al*, 1994). Ocasionalmente o fluxo de genes pode ser promovido através de uma dispersão passiva que possa ocorrer durante o período de chuvas ou pelo transporte dos ovos pelos pássaros (Jarne & Delay, 1991). A obstrução na dispersão dos moluscos e a do acasalamento aleatório está entre as causas que promove a diferenciação e estruturação dos moluscos (Mukaratirwa *et al*, 1996).

Capítulo 6

Por outro lado, um fluxo génico limitado causado pela falta de intercomunicação entre diferentes populações, leva ao aparecimento de uma variabilidade interpopulacional (Carvalho *et al*, 2001). A variabilidade restrita encontrada nos moluscos de água doce tropicais também pode ser atribuída ao balanço entre as variações ambientais (deriva genética), à migração entre as populações e ainda pelo método de acasalamento nas populações (Jarne & Delay, 1991 e Jarne *et al*, 1994).

Tendo em conta que os exemplares utilizados neste estudo são mantidos em condições laboratoriais há vários anos, os nossos resultados podem ser justificados com outros estudos aplicados ao estudo da variabilidade genética entre populações de *B. glabrata*, onde se verificou um notável polimorfismo entre as populações mantidas em condições laboratoriais há mais de 10 gerações, sugerindo que a manutenção prolongada das espécies em laboratório pode favorecer o aparecimento de génotipos heterozigóticos, mantendo desta maneira o polimorfismo (Mulvey & Vrijenhoek, 1981).

Outros dois aspectos a ter em conta estão relacionados com a biologia de *B. truncatus*. O primeiro, com os diferentes tipos de habitats mais ou menos temporários em que a distribuição da população é desigual e está dependente da disponibilidade de água e temperatura (Vera *et al*, 1990).

O segundo aspecto, prende-se com o tipo de reprodução comum a esta espécie. O género *Bulinus* tende a reproduzir-se por fecundação cruzada e/ou por autofecundação (Brown, 1994). Nas espécies de moluscos estritamente eufálicas (que apresentam um órgão reprodutor masculino funcional e órgão reprodutor feminino), como por exemplo *B. globosus*, a autofecundação poderá ser sazonal, induzida por alterações ecológicas produzidas durante o período das chuvas ou pela dessiccação (Njiokou *et al* 1993). Também, os descendentes resultantes da autofecundação apresentam um elevado grau de homozigotia, enquanto que os descendentes resultantes da fecundação cruzada apresentam um elevado grau de heterozigotia (Ostrowski *et al*, 2002). Outros trabalhos, concluem que a produção de gerações sucessivas de moluscos por autofecundação poderá reduzir a quantidade de heterogeneidade genética através da endogamia (Abdel-Hamid *et al*, 2006).

Capítulo 6

Os moluscos da espécie *B. truncatus* são tetraplóide e a frequência dos indivíduos afálicos (desprovidos do órgão copulador masculino) é altamente variável entre as populações naturais (Larambergue, 1939 e Jarne, *et al*, 1992, 1994) e fortemente influenciada por factores ambientais (Schrang *et al*, 1992 e Doums *et al*, 1996, 1998). Esta característica morfológica poderá estar associada ao baixo fluxo génico e à elevada variabilidade genética encontrados entre as populações de moluscos dos diferentes habitats (Njiokou *et al*, 1993b e Jarne & Delay, 1991). Além disso, com base nos nossos resultados poderemos concluir que a produção sucessiva de gerações de *B. truncatus* em laboratório parece ter ocorrido por fecundação cruzada tendo em conta a variabilidade genética encontrada nestas populações. Também a ausência ou o baixo nível de fluxo génico entre as populações de moluscos, parece estar associado à capacidade que os moluscos têm em desenvolver estirpes resistentes/susceptíveis ao *Schistosoma* spp (Campos *et al*, 2002).

Considerando que a diversidade haplotípica é um índice que reflecte a probabilidade de dois haplotipos escolhidos ao acaso numa determinada 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), neste trabalho, nove haplotipos diferentes foram detectados para o gene COI e sete haplotipos para a região ITS.

A média da diversidade nucleotídica (π) encontrada em todos os haplotipos das populações analisadas para o gene COI foi de 0,02965. Para a região ITS, o valor de π encontrado foi de 0,366. A alta diversidade nucleotídica da região ITS pode ter ocorrido devido à presença do haplotipo quatro (Hap 4) que no dendrograma se apresentou bastante divergente, quando comparado ao demais haplotipos. Neste estudo encontramos também uma variação nucleotídica de 29 polimorfismos de sítio único (SNP) por 1000bp ($\pi=0,02965$) para o gene e COI e de 366 SNPs por 1000 pb ($\pi=0,366$) para o gene ITS, dado que nos seis habitats estudados apenas foi encontrado para a região ITS um único haplotipo, evidenciando uma frequência elevada. (1,00).

Capítulo 6

Os resultados obtidos na análise do grau de diferenciação genética entre populações (Fst), mostraram que para o gene COI e para a região ITS, eles foram extremamente baixos (- 0,169) e (-0,746), respectivamente. Estes resultados parecem indicar uma ausência de substruturação populacional, significando que as populações de *B. truncatus* apresentam-se de forma panmítica.

Os genes COI do ADN mitocondrial e a região ITS do ADN ribossomal usados no presente estudo, parecem ter desempenhado papel relevante na reconstrução das relações filogenéticas e posição sistemática dos moluscos da espécie *B. truncatus* de Portugal com outras espécies de diferentes regiões, responsáveis pela transmissão de *Schistosoma* spp e outros trematódes. Estes resultados estão em concordância com os trabalhos de Raahauge, & Kristensen (2000) ao aplicar os mesmos marcadores na identificação de três espécies de moluscos do género *Bulinus*.

A reconstrução filogenética entre as diferentes espécies de moluscos e a espécie de *B. truncatus* de Portugal é suportada por valores de “bootstrap” estatisticamente significativos para ambas as árvores.

A associação entre o género *Bulinus* e o género *Indoplanorbis* pertencentes à família Bulininae (com um valor de “bootstrap” de 76%), apesar de apresentarem características conchiológicas diferentes, deve-se ao importante papel como hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp. (Rollinson & Southgate, 1987). Algumas das 37 espécies do género *Bulinus* são hospedeiras de parasitas pertencentes ao grupo *S. haematobium*, enquanto *I. exustus* é hospedeiro intermediário de parasitas do grupo *S. indicum* (Stothard *et al*, 2001 e Jørgensen *et al*, 2004).

A aplicação destes marcadores genéticos no estudo de espécies do género *Biomphalaria* permitiu a sua classificação em dois grupos distintos: as espécies de origem africana e as de origem neotropical (Campbell *et al*, 2000; DeJong *et al*, 2001 e Vidigal *et al*, 2004).

As árvores filogenéticas resultantes da análise das sequências parciais para os dois genes, foram muito semelhantes, diferindo em algumas sequências homólogas encontradas

Capítulo 6

no GeneBank. A análise de COI permitiu evidenciar a similaridade genética entre as populações de *B. truncatus* de Portugal e *B. tropicus* (espécie diploide) ambas pertencentes ao mesmo complexo. Resultados similares foram obtidos por Ndassa *et al* (2007) ao compararem as relações filogenéticas entre três populações de *Bulinus* sp oriundas dos Camarões, cuja filogenia molecular foi inferida a partir das sequências parciais do gene COI.

A relação filogenética entre espécies de moluscos do género *B. truncatus* de Portugal com espécies pertencentes ao mesmo complexo, parecem mostrar que as populações de Portugal são geneticamente semelhantes para os dois genes em estudo.

Estudos recentes, mostraram que as populações diploides de moluscos que pertencem ao complexo *B. truncatus/tropicus*, baseados nas sequências parciais dos genes COI do ADN mitocondrial divergem muito pouco entre si (Ndassa *et al*, 2007).

A análise usada no presente estudo constituiu um contributo para o conhecimento da ligação filogenética da espécie *B. truncatus* de Portugal com outras espécies de moluscos pertencentes ao mesmo complexo. Infelizmente, o número de sequências homólogas encontradas na base de dados não nos permitiu obter mais conclusões sobre esta espécie.

Conclusões finais



Conclusões Finais

O presente trabalho procurou, ser um contributo para o estudo de *P. metidjensis* e de *B. truncatus* de Portugal

Da comparação dos resultados obtidos no decurso deste trabalho podemos concluir que:

- 1) dos trinta e oito habitats analisados, 18 (48 %) foram do tipo natural, 13 (34%) do tipo misto e 7 (18%) do tipo antrópico e nos quais se colheram um total de 3219 exemplares de *P. metidjensis*;
- 2) o segundo trimestre foi o período onde se recolheu o maior número de moluscos (n=1344). No ano de 2004 foi colhido um total de 1067 exemplares;
- 3) o ribeiro (a) foi o tipo físico presente em 22 habitats, tendo-se colhido um total de 2365 exemplares;
- 4) *P. metidjensis*, apresentou, nos nove distritos, alta variabilidade nas características morfométricas da concha;
- 5) *P. metidjensis*, mostrou-se bem adaptado aos tipos de habitats permanentes e temporários, estando presentes durante todo o ano nos diversos distritos estudados, havendo nas suas populações heterogeneidade de dimensões que permitem que desempenhem o papel de hospedeiros intermediários de tremátodes;
- 6) a infecção experimental de *P. metidjensis* e *B. truncatus* com *S. haematobium* veio confirmar a não susceptibilidade destas espécies de moluscos ao *S. haematobium* (estirpe de Angola), contudo, a infecção com *S. mansoni*, mostrou que apesar de não terem eliminado cercárias, alguns exemplares de *P. metidjensis* desenvolveram infecção até à fase de esporocisto;
- 7) as populações de *P. metidjensis* apresentaram alta variabilidade genética intra e interpopulacional revelada quer pela técnica de RAPD quer pela análise dos genes do

Conclusões finais

ADN mitocondrial, a qual poderá estar relacionada com o tipos físico dos habitats e pelo número de migrantes inferior a um sugerindo um isolamento reprodutivo;

- 8) as populações de *Bulinus truncatus*, apresentaram uma moderada a alta variabilidade genética intrapopulacional, uma característica comum às espécies mantidas em laboratório durante várias gerações;
- 9) o Índice de Fixação (*Fst*) global para cada um dos marcadores em estudo, não apresentou diferenciação genética entre as populações de *B. truncatus*, indicando tratar-se da mesma população panmitica;
- 10) os genes COI, 16S e a região ITS, permitiram a reconstrução filogenética de *P. metijensis* e *B. truncatus*, contribuindo para um melhor esclarecimento das relações filogenéticas destas espécies com as espécies homólogas.

Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Abdel-Hamid, A.H.Z., Molest, J.B., Fernandez, V. & Rodriguez, V., 1999. Genetic variations between susceptible and nonsusceptible snails to *Schistosoma infections* using Random Amplified Polymorphic DNA analysis (Rapids). *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo*. 41 (5): 291-295.
- Abdel-Hamid, A.H.Z., Rawi, S.M. & Arafa, A. F., 2006. Identification of genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using random polymorphic DNA analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **101** (8): 863-868.
- Adema, C. M. & Loker, E. S., 1997. Specificity and immunobiology of larval digenean snail associations. In *Advances in trematode biology*. Edited by B. Fried and T. K. Graczyk, CRC. Press: 230-253.
- Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D. & Loker E.S., 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasited-derived molecules in produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94** (16):8691-8696.
- 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.
- 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.
- 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 MedicinaTropical*, **5**:175-222.
- 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 MedicinaTropical.*, **XI** (2): 231-240.
- Azevedo, J. F. & Medeiros, L. C. M., 1955. Moluscos de água doce do Ultramar Português: I- Introdução. Generalidades. *Junta de Investigação do Ultramar., estudos, ensaios e documentos.*, **XXXI**: 116 págs.
- Azevedo, J. F., Medeiros, L. C. M. & Costa Faro, M. M., 1957. Moluscos de água doce do Ultramar Português: II- Moluscos do sul do Save (Moçambique). *Junta de Investigações do Ultramar, estudos, ensaios e documentos*; **88**:398 págs.
- Azevedo, J. F., Medeiros, L.C. Costa Faro, M.M. Xavier, M. L., Franco, A., & Tito de Morais, 1961. Os moluscos de água doce do ultramar português: III moluscos de Moçambique. *Junta de Investigações do Ultramar, estudos, ensaios e documentos*; **88**:398 págs.
- Azevedo, J. F. & Xavier, M.L.S., 1965. Um novo potencial do *Schistosoma haematobium* em Portugal. *Anais do Instituto de Higiene e MedicinaTropical*, **22** (1-2): 35-37.

Referências Bibliográficas

- Azevedo, J. F., Xavier, M. L., & Pequito, M. M., 1966. The importance of biometrical observations concerning schistosomiasis vector snails. *Sep. Garcia de Orta*, **14** (3): 325-342.
- Azevedo, F. F., Xavier, M.L.S., Santos, M. A. M. & Avelino, I. C., 1969. O significado do estudo no laboratório de *Schistosoma haematobium*. *J. Soc. Ciên. Med. Lisboa*, **133**(8):607-622.
- Bandoni, S., Mulvey, M., Koech, D. K. & Loker, E. S., 1990. Genetic structure of Kenyan populations of *Biomphalaria pfefferi* (Gastropoda:Planorbidae). *J. Moll. Studies*, **56** (3): 383-391.
- Bandoni, S. M., Mulvey, M. & Loker, E. S., 1995. Phylogenetic analysis of eleven species of *Biomphalatia* Preston, 1910 (Gastropoda:Planorbidae) based on comparisons of allozymes. *Biol. Journal of the Linnean Society*, **54** (1): 1-27.
- Barbosa FS, Carneiro E & Barbosa I., 1961. On the morphology of *Planorbarius metidjensis* of Morocco and of Portugal and its sensitivity to infection by *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasitol Hum Comp.*, **36** (1): 69-75.
- Barbosa, F.S., Barbosa, I., & Morais Rego, A., 1959. Laboratory infections of the snails *Planorbarius metidjensis* (Forbes) from French Morocco with Brazilian strain of *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **53** (4):314-315.
- Bayne, C. J. & Loker, E. S., 1987. *Survival within the snail host, in the Biology of Schistosomes*. From Genes to Latrines, Eds. D. Rollinson & A.J.C. Simpson, Academic Press, London:321-346.
- 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.
- Biocca, F., Bullini, L., Chabaud, A., Nascetti, G., Orecchia, P. & Paggi, L., 1979. Subdivisions su base morfologia e genética del genere *Bulinus* in tre generi: *Bulinus* Müller, *Physopsis* Krauss e *Mandahlnarhia* gen., *Accademia Nazionale dei Lincei*, **66** : 276-282.
- Branco, J.A., 2004. Uma introdução à análise de clusters. Sociedade Portuguesa de Estatística, 148 ppg.
- Brown, D., 1994. *Freshwater snails of Africa and their Medical Importance*. 2nd Edition, Taylor & Francis, London, 456 págs.
- Calienes, A. F., Fraga, J., Pointier, J.P., Yong, M., Sanchez, J., Coustau, C., Gutiérrez, A. & Théron, A., 2004. Detection and genetic distance of resistance population of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca:Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda :Digenea) using RAPD. *Acta Tropica*, **92** (1): 83-87.

Referências Bibliográficas

- Campbell, G. Jones, C.S., Lockyer, A.E., Hughes, S., Brown, D., Noble, L.R. & Rollinson, D., 2000. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **267** (3): 2351-2358.
- 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.
- Cardoso, P.C.M., Caldeira, R.L., Lobato, M.B., Coelho, P.M.Z., Berne, M.E., Müller, G. & Carvalho, O.M., 2006. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea collumella* (Gastropoda:Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda:Digenea). *Acta Tropica*, **97** (3): 339-345.
- Carvalho, G.A.M., Veta, M.T. & Andrade, C.F.S., 2001. Estudios morfológicos y biológicos de xifidiocercarias (Trematoda) provenientes de la infección natural de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Basommatophora, Lymnaeidae) y *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835 (Basommatophora, Planorbidae) recolectados en Miaracatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Bol. Chil. Parasitol.*, **57** (3-4): 59-65.
- 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.):197-207
- Cavalcanti, J.M., 2005. Mantel for Windows. !! HYPERLINK "http://www.maurobio.gb.net" ¶¶ http://www.maurobio.gb.net¹ .
- Charbonnel, N., Angers, Rasatavonjizay, R., Bremond, P., Debain, C. & Jarne, P., 2002. The influence of mating system, demography, parasites, and colonization on the structure of *Biomphalaria pfefferi* in Madagascar. *Molecular Ecology.*, **11**: 2213-2218.
- Charbonnel, N., Rasatavonjizay, R., Sellin, E., Brémonts, P. & Jarne, P., 2005. The influence of genetic factors and population dynamics on the mating system of the hermaphroditic freshwater snail *Biomphalaria pfefferi*. *Oikos*, **108** (2): 283-296.
- Coelho, M. V., 1962. Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*, **4** (3)289-295.
- Coelho, P. M. Z., Carvalho, O.S., Andrade, Z, Z.A., Martins-Souza, R.L., Rosa, F. M., Barbosa, L., Pereira, C.A.J., Caldeira, R.L., Jannotti-Passos, L.K., Godars, A.L.B., Moreira, L. A., Oliveira, G. C., Franco, G.R., Teles, H. M. & Negrão-Corrêa, D., 2004. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: Premises for a new approach to biological control for schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (suppl. 1): 109-111.
- Connors, V. A., Buro, I., Jourdane, J., Théron, A., Agner, A. & Granath, E.O. jr., 1998. Recombinant Human Interleukin-1-Mediated Killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, **84** (5): 920-926

Referências Bibliográficas

- Coutellec-Vreto, M. A., Guller, A. & Daguzan, J., 1994. Allozyme variation in some population of the freshwater snails *Lymnaea peregra*, *L. auricular* and *L. stagnalis* (Gastropoda:Pulmonata). *J. Moll. Studies*, **60** (3): 393-403.
- Crews, A.E. & Yoshino, T.P., 1989. *Schistosoma mansoni*: effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, **68** (3): 326
- Cristo, M.I., 1967. Considerações sobre a posição sistemática do “*Bulinus (B) contortus*” (Michaud) de Portugal. *Sep. Garcia de Orta*, **15** (2): 159-166.
- Dabo. A., Durand, P., Morand, S., Diakite, M., Languard, J., Imbert-Establet, D., Doumbo, O. & Jourdane, J., 1997. Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali. *Acta Tropica*, **66** (1): 15-26.
- 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., Mimpfoudi, 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.
- Dejong, R.J., Morgan, J.A.T., Wilson, W. D., Jaser, M. H., Appleton, C. C., Coulibaly, G., D' Andrea, P. S., Doenhoff, M. J., Haas, W., Idris, M. A., Magalhães, L. A., Moné, H., Mouahind, G., Mubila, L., Pointier, J.P., Webster, J. P., Zanotti-Magalhães, M., Paraense, W. L., Mkoji, M. & Loker, E. S., 2003. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfefferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. *Molecular Ecology*, **12** (11):3041-3056.
- Doums, C., Bremond, P., Delay, B. Jarne, P., 1996. The genetical and environmental determination of phenotypic polymorphism in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics*, **142**(2): 217-225.
- Doums, C., Perdieu, M.A. & Jarne, P., 1998. Resource allocation and stressful conditions in the aphalic snail *Bulinus truncatus*. *Ecology*, **79** (2): 720-733.
- Felsenstein, J. 1993. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* **27** (4):401-410.
- 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.

Referências Bibliográficas

- Frandsen, F. & Cristensen, N. Ó., 1984. An introductory guide to the identification cercarias from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species *Acta Tropica*, **41** (2): 181-202.
- Gaud, J., 1958. Rhythmes biologiques des mollusques vecteurs des bilhrrziosis: Facteurs saisoniers et climatiques influençant le cycle de reproduction de *Bulinus truncatus* et de *Planorbis metidjensis* en Afrique du Nord. *Bulletin of the World Health Org*, **18** (5-6) : 751-769.
- Gibodat, M., 2000. Editorial, *Acta Tropica*, **77** (1): 3-7.
- Gow, J.L., Noble, L.R., Rollinson, D., Mimpfoundi, R. & Jones, C.S., 2004. Breeding system and demography shape populatios 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.
- 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., 1983. Distribution and habitats of six species of freshwater pulmonate snails in Algarve, Southern Portugal. *Malacological Review*, **16** (1/2): 17-23.
- Grácio, M. A. A., 1988. A comparative laboratory study of *Bulinus (Physopsis) globosus* . Uninfected and infected with *Schistosoma haematobium*. *Malacological Review*, **21** (1-2): 123-127.
- Grácio, M. A. A. & Guerreiro, M. G. R., 1993. Estudo da susceptibilidade de *Biomphalaria pfefferi* da Guiné Bissau a *Schistosoma mansoni* do Brasil. I-Produção de cercarias. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1** (1): 65-68.
- Grácio, M.A..A 2001. Sumário das aulas de Helminologia Médica II (Cursos de Mestrados em Parasitologia Médica).
- Grande, C., Templato, J., Cervera, J.L.; & Zardoya, R., 2004. Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca:Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution.*, **22** (2): 303-313.
- Gutiérrez, A., Pointier, J.P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Pérez, R.T., Yong, M., Sanchez, J., Loker, E.S. & Théron, A., 2003. *Fasciola hepática*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. . *Experimental Parasitology*, **105** (2): 211-218.
- Hudson, M.M., Slatkin, M. & Maddinson, W.P., 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, **132** (2): 583-589.
- Ivanchenko, M. G., Lerner, J. P., McCormick, R. S., Toumadje, A., Allen, B., Fisher, K., Hedstron, O., Helmrich, A. Barnes, D. W. & Bayne, C. J., 1999. Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures of intramolluscan stages of human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (2): 4965-4970.

Referências Bibliográficas

- Jarne, P. & Delay, B., 1991. Population genetics of freshwater snails. *Trends in Ecology & Evolution*, **6** (12): 383-386.
- Jarne, P., Finot, L., Bellec, C. & Delay, B., 1992. Aphally versus euphally in self-fertile hermaphrodite snails from species *Bulinus truncatus* (Pulmonata:Planorbidae). *American Naturalist*, **139** (2):424-432.
- Jarne, P., Viard, F., Delay, B. & Cuny, G., 1994. Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora:Planorbidae). *Molecular Ecology*, **3** (3): 527-528.
- Jelnes, J. E., 1979. Taxonomic studies of *Bulinus* using isoenzymes electrophoresis with special reference to the *africanus* group on the Kano plain, Kenya. *Malacologia*, **18** (2): 121-122.
- Jelnes, J. E., 1986. Experimental taxonomy of *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae): the west and North African species reconsidered, based upon an electrophoretic study of several enzymes per individual. *The J. of the Linnean Soc. of London*, **87** (1): 1-26.
- Jones, C., Noble, R., Lockyer, A. e., Brown, D. & Rollinson, D., 1997. Species-specific primers discriminate schistosome intermediate hosts:unambiguous PCR diagnosis of *Bulinus forskalii* group taxa (Gastropoda:Planorbidae). *Molecular Ecology*, **6** (9): 843-849.
- Jørgensen, 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.
- Jørgensen, A., Gersdorff Jørgensen, L.V., Kristensen, T.K., Madsen, H. & Stothard, R.J., 2007. Molecular phylogenetic investigation of *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae) in Lake Malawi with comments on the topological incongruence between DNA loci. *Zoologia scripta*, **36** (6):577-585.
- 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.
- Kechemir N. & Combes, C., 1988. Up to what point are cercariogenesis and sporocystogenesis reversible in schistosomes ?. *J. Helminthology*, **62** (3) 261-264.
- Kloos, H. Passos Janotti, L. K., LoVerde P., Oliveita R. C. & Gazzinelli, A., 2004. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural área in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (7): 673-681.
- Kloos, H. , Souza, C., Gazzinelli, A., Soares Filho, B. S., Temba , P., Bethony, J., Kristen, P., Grzywacz, C., Lewis, F., Minchella, D., LoVerde, P. & Oliveira, R. C., 2001. The distribution of *Biomphalaria* spp in different habitats in relation to physical, biological, water contact and cognitive factors in a rural Área in Minas Gerais , Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96** (Suppl.): 56-66.

Referências Bibliográficas

- Kloos, H. & Davis, R., 2002. The Paleoepidemiology of Schistosomiasis in Ancient Egypt. *Human Ecology Review*, **9** (1): 14-25.
- Knihgt, M., Miller, A.N., Patterson, C.N., Rowe, C.G., Michaels G., Carr, D., Richards, C.S., & Lewis, F.A., 1999. The identification of markers segregation with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Genetics*, **96** (4):1510-1515.
- Knihgt, M., Ongele, E. & Lewis, F.A., 2000. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, **30** (4): 535-541.
- Kristensen, T.K., Yousif, F. Raahauge, P., 1999. Molecular characterisation of *Biomphalaria* spp in Egypt. *J. Moll. Studies.*, **65** (1) 133-136.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, N., 2004 MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**:150-163.
- Lacerda, D.R., Acedo, M.D.P., Lemos Filho, J.P. & Lovato, M.B., 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, **3**(2):87-92.
- Langand, J., Barral, V., Delay, B. & Jourdane, P., 1993. Detection of genetic diversity within snail intermediate host of the genus *Bulinus* by using Random Amplified Polymorphic DAN markers (RAPDs). *Acta Tropica*, **55** (4): 205-215.
- Langand, J., Théron, A., Pointier, J.P., Delay, B. & Jourdane, J., 1999. Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe Island using RAPD markers. *J. Moll. Studies.*, **65** (4): 425-433.
- Larambergue, M., 1939. Étude de l'autofécondation chez les gastéropodes pulmonés: recherches sur l'aphallie et la fécondation chez *Bulinus* (*Isidora*) *contortus* Michaud. *Bulletin Biologique de France et Belgique* **73** (IV) :19-231.
- Larson, S. E., Anderson, P., Miller, A., Cousin, C. E., Richards, C. S., Lewis, F. A. & Knight, M., 1996. Use of RAPD_PCR to differentiate genetically defined lines of an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, **82** (2): 237-244.
- Lewis, F., a., Knight, M. & Richards, C. S., 1997. A Laboratory-based approach to biological control of snails. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **92** (5): 661-662.
- Lewis, F. A., Patterson, C. N. & Grzywac, C., 2003. Parasite-susceptibility phenotypes of F1 *Biomphalaria glabrata* progeny derived from interbreeding *Schistosoma mansoni* resistant and susceptible snails. *Parasitology. Research*, **89** (2): 98-101.

Referências Bibliográficas

- Lewontin, M., 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, New York, **6**: 381-382.
- Lie, K. J., Basch, P. F. & Umathey, T., 1965. Antagonism between two species of larval trematodes in the same snail. *Nature*, **206** (2):422-423.
- 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.
- Malek, E. A. & Cheng, T. C., 1974. Medical and Economic Malacology. Academic PRESS, New York , pp.383.
- Malek, E.A., 1980. Snail-transmitted parasitic diseases. Volume I, CRC Press, pp. 334.
- Mandhal-Barth, G., 1957. Intermediate hosts of *Schistosoma*. *Bulletin of the World Health Org.*, **5** (2): 153-165.
- Mandhal-Barth, G., 1965. The species of the genus *Bulinus*, intermediate hosts of *Schistosoma*. *Bulletin of the World Health Org*, **33** (.1): 33-44.
- Mavarez, J., Steiner, C., Pointier, J. P. & Jarne, P., 2002. Evolutionary history and phylogeography of schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Heredity*, **89** (4): 266-272.
- McPherson, M. J., Quirke, P. & Taylor, G.R., 1992. PCR- a practical approach. Oxford University Press, 247 págis.
- Medeiros, L. & Simões, 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.
- Minchela, D. J., Sollenberger, K. M. & Pereira de Sousa, C., 1995. Distribution of schistosome genetic diversity within molluscan intermediate hosts. *Parasitology*, **111** (1):217-220.
- Mkoji, G.M., Hofkin, B.V., Kuris, A.M., Mungai, B., Kihara, J.H., Mungai, F., Yundu, J., Mbui, J., Rashid, J.R., Kariuki, J.H., Ouma, J.H., Koech, D.K. & Loker, E.S., 1999. Impact of the crayfish *Procambarus clarkii* on *Schistosoma haematobium* transmission in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **61** (5): 751-759.
- Moné, H., Mouahid, G. & Morand, S., 2000. The distribution of *Schistosoma bovis* , Sonsino, 1876 in relation to intermediate host molusc-parasit relationships. *Adv. Parasitology*, **44**:100-139.
- Morand, S., Manning, S.D. & Woolhouse, M.E.J., 1996. Parasite host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **263** (1366):119-128:
- Morel, C., 2000. Editorial, *Acta Tropica*, **77** (1): 3-7.

Referências Bibliográficas

- 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.
- Morgan, J.A.T., DeJong, R.J., Snyder, S.D., Mkoji, G.M., & Loker, E.S., 2001. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, **123** (Suppl.): S211-S228.
- Morrison, D.A., 2002. How improve statistical analysis in parasitology research publications. *International Journal for Parasitology*, **32** (3): 1065-1070.
- Moukrin, A., Zekhnini, A. & Rondelaud, d., 1993. Observations écologiques sur les hôtes intermediaries de *Schistosoma haematobium* (Bilharz) dans la province D'Agadir (Maroc), *Bull. Soc. Française de Parasit.*, **11**(2) :223-229.
- Moukrin, A., Zekhnini, A. & Rondelaud, d., 1996. *Schistosoma haematobium*: influence of the number of miracidia on several characteristics of infection in newborn *Planorbarius metidjensis*. *Parasitology Research*, **82** (4): 267-269.
- Mukaratirwa, S., Kristensen, T. K., Siegismund, H. R. & Chandiwana, S. K., 1996. Genetic structure and parasite compatibility of *Bulinus globosus* (Gastropoda:Planorbidae) from two areas of different endemicity of *Schistosoma haematobium* in Zimbabwe. *Int. Journal of Parasitology*, **26** (3): 269-280.
- Mukaratirwa, S., Kristensen, T. K., Siegismund, H. R. & Chandiwana, S. K., 1998. Genetic and morphological variation pf population belonging to the *Bulinus truncatus /tropicus* complex (Gastropoda:Planorbidae) in south western Zimbabwe. *J. Moll. Studies* **64** (4): 435-446.
- Mulvey, M. & Vrijenhoek, C.R., 1981. Genetic variation, among laboratory strains of the planorbid snails *Biomphalaria glabrata*. *Biochemical Genet.*, **19** (1): 169-182.
- Mulvey, M. & Vrijenhoek, C.R., 1982. Populations structure in *Biomphalaria glabrata*: examination of an hypothesis for the patchy distribution of susceptibility to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31** (6): 1195-1200.
- Ndassa, A., Mimpfoundi, R. & McClymont, E., 2007. Molecular phylogeny of diploid *Bulinus* sp. (Gastropoda: Planorbidae) populations in Cameroon crater lakes. *Infection, Genetics and Evolution*, **7** (1): 103-109.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Am.Nat.* **106** (3): 283-286.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70** (12-I):3321-3323
- Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York,
- Nei, M. & Li, W. S., 1979. Mathematical model for studding genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. of Nat. Acad. Of Sciences of USA*, **76**:5269-5273.

Referências Bibliográficas

- Neto, E. D., Pereira –Souza, C., Rollinson, D., Katz, N., Pena, S., D. & Simpson, A. J.G., 1993. The random amplification of polymorphic DNA allows the identifications of strains and species of schistosome. *Molecular and Bioch. Parasitology*, **57** (1): 83-88.
- Njiokou, F., Bellec, C., Barrebi, P., Delay, Bernard & Jarne P., 1993a. Do self-fertilization and genetic drif promove a very low genetic variability in the allotetraploid *Bulinus truncatus* (Gastropoda : Planorbidae) populations ?. *Genet. Research*, **62** (1):89-100.
- Njiokou, F., Bellec, C., Jarnes, P., Finot, L. & Delay, B., 1993b. Mating system analysis using protein electrophoresis in the self-fertile hermaphrodite species *Bulinus truncatus* (Gastropoda:Planorbidae). *J. Moll. Studies*, **59** (2):125-133.
- Nobre, A., 1941. Fauna malacológica de Portugal-moluscos terrestres e fluviais. *Mem. Estudos do Museu Zool. Univ. Coimbra*. **124**: 278 págs.
- Oliveira, L.S., Simões, M. & Azevedo, J.F., 1974. Comparative study of the behaviour between the *Planorbarius metidjensis* and the *Bulinus contortus* towards infection by *Schistosoma haematobium*. *An. Inst. Hig. Med. Trop.*, **2** (1-4), 541-544.
- Ostrowski, M.F., Jarne, P., Berticat, O. & David, P., 2002. Ontogenic reaction norm for binary traits: the timing of phallus development in the snails *Bulinus truncatus*. *Heredity*, **88** (5): 342-348.
- Page, A., 1998. Taxonomy and Systematics; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/>
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R., 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to strain of *Schistosoma mansoni*, *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **5** (3): 127-130.
- Paraense, W. L. & Corrêa, L. R., 1978. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, **64** (5)822-826.
- Paraense, W. L., 1955. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **53** (.2):277-284.
- Preston, T.M. & Southgate, V.R., 1994. The species specificity of *Bulinus-Schistosoma* interactions. *Parasitology Today*, **10** (2): 69-73
- Raahauge, P. & Kristensen, T. K., 2000. A comparison of *Bulinus africanus* group (Planorbidae:Gastropoda) by use the internal spacer I region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica*, **75** (1): 85-94.
- Raghavan, N. & Knight, M., 2006. The snail (*Biomphalaria glabrata*) genome project. *Trends in Parasitology*, **22** (4): 148-151.

Referências Bibliográficas

- Ramajo-Martin, V. & Simon-Vicente, F., 1988. Variaciones estacionales de *Planorbarius metidjensis* en un arroyo de corriente temporal e infección 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.
- Richards, C. S., 1975. Genetic studies on variation in infectivity of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, **61** (2): 233-236.
- Richards, C. S., 1984. Influence of snail age on genetic variations of in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*, *Malacologia* **25** (2): 493-502.
- Richards, C. S. & Merritt, J. W., 1972. Genetics factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Amer. Journal of Tropical Med. and Hyg.* 21 (3): 425-434.
- Richards, C.S., Knight, M., & Lewis, F.A., 1992. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection, *Parasitol. Today*, **8** (5): 171-174.
- Rollinson, D., 1979. The use of enzymes in taxonomy of *Bulinus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. And Hygiene*, 73(5): 601-602.
- 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,
- Rollinson, D., Clerq, D., Sacko. M., Traoré, M., Sene, M., Southgate, V. R., & Vercruyse, J., 1997. Observations on compatibility between *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in the Senegal River Basin. *Annals of Trop. Med. And Parasitology*, **91** (4): 371-378.
- Rollinson, D. & Southgate, V .R., 1987. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In *The Biological of Schistosomes: Genes to Latrines* (eds. Rollinson, D. & Simpson, A.J. G.): 1-49.
- Rollinson, D., Stothard, J.R., Jones, C.S., Lockyer, A.E., Pereira de Souza, C. & Noble, L.R., 1998. Molecular characterisation of intermediate snails hosts the search for resistance genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93** (Suppl.1): 111- 116.
- Rollinson, D, Stothard, J.R., & Southgate, V.R., 2001. Interactions between intermediate hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology*, **123** (Suppl.): S245-S260.

Referências Bibliográficas

- Rozas, J, Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19** (1): 2496-2497.
- Schrag, S. J., Rollinson, D., Keymer, A.E. Read, A., 1992. Heritability of male outcrossing ability in the simultaneous hermaphrodite, *Bulinus truncatus* (Gastropoda:Planorbidae). *J. Zool.* **226** (2): 311-319.
- Seiça, T., 2002. Desenvolvimento Larva intramolusco no Género *Schistosoma*: conhecimento actual e perspectivas futuras. Tese de Mestrado, *Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 90 págs.
- Semyenova, S., Morozova, E., Chrisanfova, G., Asatrin, A.M., Movsession, O. & Ryskov, A., 2003. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica*, **48** (2): 125-130.
- Serrano, J. L. & Garcia-Lobo, J. M., 1992. Manual de genética molecular. Editorial Sintesis, A.A., Madrid, 277 págs.
- Sesen, R., 2004. A study on the conchological features of two populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda:Pulmonata) in Turkey. *Turk. J. Zool*, **28** (4): 145-148.
- Siegel, S. & Castellan, J., 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Science. ed. McGraw-Hill, 422 págs.
- Silva O. L., Simões M, & Azevedo J. F. 1974, Comparative study of the behaviour between the *Planorbarius metidjensis* and the *Bulinus contortus* towards infection by *Schistosoma haematobium*. *Anais Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 2 (1-4): 541-544.
- Simões, M., Grácio, M.A A. & Azevedo, J. F., 1974. Effects of the populacional density on the growth and fecundity of specimens of the *Bulinus* sp. *Sep. Anais Instituto de. Higiene e Medicina Tropical.*, **II** (1-4): 535-539.
- Simões, M. & Medeiros, L., 1980. Verificação de susceptibilidade de *Planorbarius metidjensis* e *Bulinus contortus* de Portugal ao *Schistosoma haematobium* de Angola. *Garcia de Orta, Ser. Zool.*, **9** (1-2): 67-70.
- Sire, C., Durand, p., Pointier, J. P. & Théron, A., 1999. Genetic, diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* population: a field study using random amplified polymorphic DNA markers. *J. Parasitology*, **85** (3):436-441.
- Sire, C., Languard, J., Barral, V. & Théron, A., 2001. Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: population structure in a fragmented landscape. *Parasitology*, 122 (4): 545-554.
- Slatkin, M., 1985. Gene flow in natural population. *Annual review of ecological Systematics*, **16**:393-430.

Referências Bibliográficas

- Sneath, P.M. & Sokal, R.R., 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco.
- Spada, R.G.M., Abdel-Hamid, A. Z., Sobral-Hamaguchi, S.S., Zuim, N.R.B., Zanotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A., Ribeiro-Paes, J.T., 2002. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (Suppl. 1): 53-58.
- 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.
- Southgate, V. R., 1997. Schistosomiasis in the Senegal river basin. Before and after the construction of the dams, Senegal and Manatali, Mali and futures projects. *J Helminthology*, **71** (2): 125-132.
- Souza, P. C., Borges, C. C., Guimarães, A.S. & Zilton, A. A., 1997. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **92** (4): 517-522.
- 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., Brémond, P., Andriamaro, L., Sellin, B., Sellin, E. & Rollinson, D., 2001. *Bulinus* species on Madagascar: molecular evolution genetics markers and compatibility with *Schistosoma haematobium*. *Parasitology*, **123** (Suppl1): S261-S275.
- 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™ analysis of single nucleotide polymorphisms within the Cytochrome Oxidase Subunit I. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (suppl.):31-36.
- Stothard, J.R., Loxton, N.J. & Rollinson, D., 2002. Freshwater snails on Mafia Island, Tanzania with special emphasis upon the genus *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae). *J. Zool.*, **257** (3):353-364.
- Tchuenté, L.A.T., Southgate, V. R., Théron, A., Jourdane, J., Ly, A. & Gryseels, B., 1999. Compatibility of *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria pfefferi* in Northern Senegal, *Parasitology* , **118** (6): 595-603
- Théron, A., Pages, J.R. & Rognon, A., 1997. *Schistosoma mansoni*: Distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Experimental Parasitology*, **85** (1): 1-9.

Referências Bibliográficas

- 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.
- Thompson, S. N., 1997. *Physiology and Biochemistry of Snail-larval Trematode relationships* in Advances in Trematode Biology. Eds Bernard Fried & Thaddeus K. Graczyk, CRC Press: 149-195.
- 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.
- Van der Knaap, W.P.W. & Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, **6** (6): 175-182.
- Vera, C., Jourdane, J., Selin, B. & Combes, C., 1990. Genetic variability in the compatibility between *Schistosoma haematobium* and its potential vector in Niger. *Tropical Medicine and Parasitology*, **41** (2):143-148.
- Viard, F., Justy, F. & Jarne P., 1997. The influence of self-fertilization and population dynamics on the genetics structure of subdivided population: a case study using microsatellites markers in the freshwater snails *Bulinus truncatus*. *Evolution*, **51** (5): 1518-1528.
- Vidigal, T.H., Dias Neto, E., Carvalho, S.O. & Simpson, E.D., 1994. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by Random Amplified Polymorphic DNA analysis, *Experimental Parasitology*, **79** (2): 187-194.
- Vidigal, T.H., 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., Montessor, 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.H., Spatz, L., Kissinger, J., Redondo, R.A.F., Pires, E.C.R., Simpson, A.J.G. & Carvalho, O.S., 2004. Analysis of the First and Second Internal Transcribed Spacer sequences of Ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca:Planorbidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (2):153-158.
- Webster, J.P., 2001. Compatibility and sex in a snail-schistosome system. *Parasitology*, **122** (4): 423-432.
- Webster, J.P. & Davies, C.M., 2001. Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system, *Parasitology*, **123** (Suppl.): S41-S56.

Referências Bibliográficas

- Webster, J.P. & Woolhouse, M.E., 1999. Cost of resistance: relationship between reduced fertility and increased resistance in a snail schistosome host-parasite system. *Proc. R. Soc. London B*, **266** (5):391-396.
- Webster, J.P., Davies, C.M., Hofman, J.I., Ndamba, J., Noble, L.R. & Woolhouse, M.J., 2001a. Population genetics of the schistosome intermediate host *Biomphalaria pfeifferi* in the Zimbabwean highveld: implications for co-evolutionary theory. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **95** (2): 203-214.
- Webster, J.P., Davies, C.M., Ndamba, J., Noble, L.R., Jones, C. S. & Woolhouse, M.E. J., 2001b. Spatio-temporal genetic variability in the schistosome intermediate host in *Biomphalaria pfeifferi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **95** (5): 515-527.
- Welsh, J & MvClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18** (3): 7213-7218.
- Wibaux-Charloi, M., Yelnik, A., Ibrahim, H., Same-Ekobo, A. & Ripert, C., 1982. Étude épidémiologique de la bilhrziose a *S. haematobium* dans le périmètre rizicole de Yagoua (Nord-Cameroun). *Bull. Soc. Path. Ex.*, **75**(1): 72-93.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalki, J. A., & Tingey, V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218 (3): 704-740.
- Williams, J.G.K., Kubelick, A. R., Livak, K. J., Rafalski, A.A., & Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18** (5): 6531-6535.
- Williams, S. A., (The Filarial Genome Project) & Johnstn, D. A., (The schistosome Genome Project), 1999. Helminth genome analysis: the current status of the filarial and schistosome genome projects. *Parasitology*, 118 Suppl): S19-S38.
- Woolhouse , M.E.J. & Chadiwana, S.K., 1989. Spatial and temporal heterogeneity in the population dynamics of *Bulinus globosus* and *Biomphalaria pfeifferi* and in epidemiology of their infection with schistosoma . *Parasitology*, **98** (1): 21-34.
- Woolhouse , M.E.J., Chadiwana, S.K., & Bradley, m., 1990. On the distribution of schistosome infections among host snails. *International Journal of Parasitology*, **20** (3) 325-32.:
- Woolhouse, M. E. J. & Webster, J. P., 2000. In search of the Red Queen, *Parasitology Today*, **16** (2):506-508.
- Wright, C. A. & Rollinson, D., 1981. Analysis of enzymes in the *Bulinus tropicus/truncatus* complex (Mollusca:Planorbidae). *Journal of Nat. Hyst.* **15** (2):611-620.
- Wright, S., 1943. Evolution in Medilian populations. *Austin*, 28 (2):114-138.

Referências Bibliográficas

- Wright, S., 1978. Evolution and genetics populations. Chicago. University of Chicago Press: 511.págs.
- Yacoubi, B.; Zekhnini, A., Moukrin, A., & Randelaud, 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.
- Yacoubi, B., Zekhnini, A., Rondelaud, D., Vignoles, P., Cabaret, J., & Moukrin, A., 2007. Habitats of *Bulinus truncatus* e *Planorbarius metidjensis*, the intermediate hosts of urinary schistosomiasis, under a semiarid or an arid climate. *Parasitology Research*, **101** (2): 311-316.
- Yeh, F.C., Boyle, T.Y.Z. & Xiyang, J.M., 1999. PopGene version 13.1. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and center for International Forestry Research.
- Yoshino, T. P., Coustau, C., Modat, S. & Castillo, M. G., 1999. The *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) molluscan cell line: establishment of an in vitro cellular model for the study of snail host-parasite interaction. *Malacologia*, **41**: 331-343.
- Xavier, M. L. S., 1972. Estudos sobre a esquistossomíase vesical em Portugal. Susceptibilidade do *Bulinus (b.) contortus* de Portugal à estirpe de *Schistosoma haematobium* de Angola e Moçambique. *Arquivos do Inst. Nacional de Saúde*. Tomo **1**: 195-205.
- Xavier ML, de Azevedo JF., 1965. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* (Forbes) from the south of Portugal (Algarve) and *Bulinus (Ph.) africanus* from Portuguese Guinea to *Schistosoma haematobium* from the same overseas province. *An. Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **22**(1):57-63.
- 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.
- Zekhnini, A., Yacoubi, B., Moukrin, A. & Rondelaud, D., 2002. Effect of a short period of desiccation during the patent period on cercarial shedding of *Schistosoma haematobium* from *Planorbarius metidjensis*. *Parasitology Research*. **88** (8): 768-71.

Anexos



Anexo 1

Moluscos de Água Doce – Ficha de Campo

Observação nº _____ Data ____/____/____ Hora ____ : ____

Localização do criadouro

Localidade mais próxima _____ Concelho _____ Distrito _____

Altitude _____ Latitude _____ Longitude _____

Formação e Manutenção do criadouroRio Ribeiro Pequeno caudal de água Lago Lagoa Canal de Irrigação Charco Poça _____ **Carácter do criadouro**Permanente Temporário Área de superfície da colecção de água _____**Ecologia e Biologia do criadouro**Vegetação na colecção de água: Emergente Flutuante Imersa Nula Vegetação na margem, projectada sobre o criadouro: muita pouca nenhuma Quantidade de vegetação aquática: Leve Densa _____

Tipo de vegetação na água: _____

Tipo de vegetação na margem do criadouro: _____

Exposição solar: Total Fraca Escassa Mínima Nula **Substrato**Rochas Areia Argila Humus Matéria em composição

Contacto com o HomemDistância à habitação _____ Uso da colecção de água pela pop. local: Sim Não **Outras características do criadouro**Aves aquáticas: Sim Não Mamíferos: Sim Não **Características físico-químicas da água do criadouro**Cor: Incolor Escura Cheiro: Inodora Fétida Limpidez: Límpida Turva Dureza Total: _____ Dureza (CaCO₃): _____Profundidade: <50 cm >50cm

Temperatura da água (à superfície): _____ pH _____ Condutividade _____

Oxigenação: _____ mg/L

Laboratório

Espécies colectadas	Jovens	Adultos	Total

Densidade dos moluscos

Pequena <input type="checkbox"/>	Média <input type="checkbox"/>	Nula <input type="checkbox"/>
----------------------------------	--------------------------------	-------------------------------

Infecção

Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>
------------------------------	------------------------------

Cercárias

Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>
------------------------------	------------------------------

Observações.

Anexo 2

Tabela A2 - Grupos e origem de *P. metidjensis* sujeitos a diferentes doses de miracídios.

Grupos	Nº de moluscos	5 miracídios	8 miracídios	10 miracídios
Grupo controlo	30	—	—	—
Grupo I	9	3	3	3
Grupo II	10	2	3	5
Grupo III	12	2	3	7
Grupo IV	20	4	8	8
Grupo V	15	4	4	7
Grupo VI	10	3	3	4
Grupo VII	10	3	4	3
Grupo VIII	8	3	3	2
Grupo IX	6	2	2	2
Grupo X	10	3	4	3
Grupo XI	5	2	2	1
Grupo XII	5	2	2	1

Grupo I - Ribeira de Eiras

Grupo II - Ribeira de S. Paulo de Frades

Grupo III - Ribeira de Souselas

Grupo IV - Ribeira de Valverde

Grupo V - Ribeira de Boina

Grupo VI - Ribeira de Estói

Grupo VII - Sesimbra

Grupo VIII - Santiago do Cacém

Grupo IX - Vale de Lobo (Sintra)

Grupo X - Ribeira do Escoural

Grupo XI - Sabugal

Grupo XII - S. Cassurões

Anexo 3

Tabela A3 - Grupos e origem de *P. metidjensis* sujeitos a diferentes doses de miracídios.

Grupos	Nº de moluscos	5 miracídios	8 miracídios	10 miracídios
Grupo controlo	15	-	-	-
Coimbra	10	3	3	4
Ribeira de Arade	10	3	3	4
Ribeira de Estói	10	3	3	4
Pontinha	10	3	3	4
Silves	10	3	3	4
Vale Judeu	10	3	3	4

Anexo 4

Tabela A4. – Mortalidade global de *P. metidjensis* sujeitos a diferentes doses de miracídeos de *S. mansoni*.

	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana	8ª semana	9ª semana	10ª semana
5 miracídeos	10	14	4	8	0	0	0	0	0	0
8 miracídeos	27	5	3	0	1	0	0	0	0	1
10 miracídeos	17	30	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	54	49	7	8	1	0	0	0	0	1

Anexo 5

Protocolo para extracção do ADN genómico total dos moluscos. (Stothard, 1998)

Preparação de CTAB (tampão de extracção).

Para 200 mls:

- 2,4 g de Tris
- 16,4 g de NaCl
- 1,2 g de EDTA
- 4g de CTAB
- 0,4 ml mecaptopetanol.

Método de extracção:

1. Colocar o tampão de extracção CTAB na estufa a 60° C para o equilíbrio térmico;
2. Retirar a zona cefalopodal do molusco do tubo com etanol e colocá-lo num novo tubo;
3. Adicionar 0,5 ml de azoto líquido;
4. Após evaporação do azoto adicionar 0,75 ml do tampão CTAB que foi previamente aquecido a 60° C;
5. Adicionar 4 µl de proteinase K e homogenizar muito bem até que os tecidos fiquem completamente dissolvidos no tampão;
6. Seguidamente vai a incubar durante 1 hora;
7. Após o período de incubação adicionar 0,75 ml de chloroform/isoamylalcohol (24:1) e misturar manualmente durante dois minutos;
8. Centrifugar rapidamente para que haja separação da zona aquosa da zona orgânica;
9. Pipetar a camada aquosa para um tubo novo e adicionar 1 ml de Etanol absoluto a 4° C e misturar;

10. Centrifugar durante 15 minutos a 16 000 rpm a 4° C;
11. Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 0,5 ml de etanol a 70% para a lavagem da “pellet” e voltar a centrifugar nas mesmas condições anteriormente descritas;
12. Decantar fora novamente o sobrenadante e retirar cuidadosamente todo o excesso de etanol. Colocar na estufa, no máximo durante 10 minutos, para que haja a evaporação total do etanol.
13. Adicionar 50 µl de tampão TE e agitar o tubo de modo a que a “pellet” se dissolva. As amostras devem ser guardadas em aliquotas a -20 ° C.

Anexo 6

Tabela A6. – Nº de acesso ao Genbank para as seqüências dos genes COI e 16S usados na análise filogenética de *Planorbarius metidjensis*

Espécies	Nº de acesso ao Genbank	
	COI	16S
<i>Anisus vortex</i>		AY577478
<i>Bulinus liratus</i>		AY029543
<i>Bulinus nasutus</i>		AY029547
<i>Bulinus truncatus</i>		AY029548
<i>Bulinus truncatus</i>		AY0295549
<i>Biomphalaria angulosa</i>	DQ84846	
<i>Biomphalaria camerunensis</i>		AY030199
<i>Biomphalaria choanophala</i>		AY030250
<i>Biomphalaria choanophala</i>	DQ084828	
<i>Biomphalaria choanophala</i>		AY030202
<i>Biomphalaria glabrata</i>		AY198085
<i>Biomphalaria glabrata</i>	AF199091	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	AF199093	
<i>Biomphalaria kuhniana</i>		AY030212
<i>Biomphalaria kuhniana</i>		AY030211
<i>Biomphalaria obstructa</i>		AY030229
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	AY199105	
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	DQ084831	
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	AF199104	
<i>Biomphalaria peregrina</i>		AY030231
<i>Biomphalaria obstructa</i>	AY651207	
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	AF199090	
<i>Biomphalaria obstructa</i>		AY030228
<i>Biomphalaria sudanica</i>		AY126608
<i>Biomphalaria sudanica</i>		DQ084861
<i>Biomphalaria sudanica</i>	DQ084843	
<i>Biomphalaria sudanica</i>	DQ084844	
<i>Biomphalaria temascalensis</i>		AY030227
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		AY030219
<i>Ferrissia rivularis</i>	DQ328261	
<i>Helisoma trivolvis</i>	AY227371	
<i>Helisoma trivolvis</i>		AY030234
<i>Indoplanorbis exutus</i>		AY577471
<i>Planorbarius corneus</i>	AY350524	AY577473
<i>Planorbarius corneus</i>	AY282590	
<i>Planorbarius sp</i>	AY227370	

Anexo 7

Tabela A7 - Polimorfismos observados nos nove haplotipos identificados nas sequências parciais do gene COI de *P. metidjensis* nos cinco distritos estudados.

MATRIX
 [10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140]
 [* * * * * * * * * * * * * *]

Hap_1
 TCATTTAATGTTTAATTAGGACTACTTAGTTTATAGACGAACTTTTATAGTAATATTTTATTTATAAAGTG
 AAATTTTATCTAGTAATAATCTGTCTGTTTGTAGTAAGA
 TGGTGTATTGTTCTTAGTGTCCAATTCGGGAGT

Hap_2TA.....

Hap_3C.....A..C.

Hap_4CC.....CC.....C.CCT.....

Hap_5C.....C.....A.....T.....

Hap_6C.....T.....

Hap_7C.....A.....T.....

Hap_8 .A.A.AC...AA.T.C.CTAC.AGG.C.T..CGGGAGA..T.A..A..ACTCA.CACATACCTAGTTCAACCCCCAC
 AACGCACTCCGAGCACTAAAGAAATTCTGCGCAAACCAAA.A
 .AATCAAAAATCAA.CTCT.C

Hap_9
 AATGACCTCAACC.G.C.TTGGG.GGATCAA.TATA.TACTTGAA.ACTCGCA.CACATACCTAGTTCAACCCC
 CCACAACGCACTCCGAGCACTAAAGAAATTCTGCGCAA
 ACCAAA.A.AATCAAAAATCAA.CTCT.C

Anexo 8

Tabela A8 - Matriz de distâncias genéticas emparelhadas entre os diferentes haplotipos do gene COI.

Haplotipos	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
H1	*								
H2	0,04	*							
H3	0,00	0,004	*						
H4	0,12	0,17	0,12	*					
H5	0,00	0,04	0,00	0,12	*				
H6	0,00	0,04	0,00	0,12	0,00	*			
H7	0,00	0,04	0,00	0,12	0,00	0,00	*		
H8	0,51	0,59	0,51	0,59	0,51	0,51	0,51	*	
H9	0,89	1,03	0,89	0,88	0,89	0,89	0,89	1,03	*

Anexo 9

Tabela A9 - Matriz das distâncias entre os distritos a partir do Coeficiente de diferenciação génica de Nei, **Gst** (1973).

Distritos	Coimbra	Lisboa	Faro	Évora	Setúbal
Coimbra	*				
Lisboa	0,36	*			
Faro	0,087	0,290	*		
Évora	0,55	0,333	0,008	*	
Setúbal	0,36	1,00	0,29	0,33	*

;

Anexo 10

Tabela A10 - Polimorfismos observados nos quatro haplotipos identificados nas sequências parciais do gene 16S nos cinco distritos estudados para as populações de *P. metidjensis*.

[10 20 30 40]
 [* * * *]

Hap_1 AAAGTTTATAATGATCCAGTAAATTAAGAATGGATTATTG

Hap_2 ..T.....

Hap_3 .TT.....T.....T

Hap_4 T..AAAAGATTAAGAAATTGTGTCGTTATTAATACTAA.

;

Anexo 11

Tabela A.11. – Identidade genética de Nei (acima da diagonal) e distância genética de Nei (abaixo da diagonal) para os 19 habitats de *P. metidjensis* estudados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	****	0.7666	0.8944	0.9990	0.9150	0.9553	0.9468	0.9344	0.8940	0.9344	0.9919	0.9643	0.7681	0.5598	0.8811	0.9100	0.9129	0.9666	0.8940
2	0.2657	****	0.5620	0.7285	0.6756	0.7006	0.6991	0.6991	0.5824	0.6991	0.6882	0.6835	0.4269	0.5856	0.5576	0.7871	0.6266	0.7447	0.5824
3	0.1116	0.5762	****	0.8776	0.9049	0.8874	0.8768	0.8865	0.8636	0.8865	0.9065	0.8446	0.9430	0.6202	0.8859	0.8539	0.9351	0.7887	0.8636
4	0.0010	0.3168	0.1306	****	0.8797	0.9650	0.9091	0.9281	0.9194	0.9281	0.9993	0.9970	0.7911	0.6029	0.8803	0.8696	0.9188	0.9584	0.9194
5	0.0888	0.3922	0.0999	0.1282	****	0.8296	0.9713	0.9093	0.8287	0.9093	0.8822	0.8745	0.7262	0.6191	0.9605	0.9488	0.8532	0.8764	0.8287
6	0.0457	0.3558	0.1194	0.0356	0.1868	****	0.8468	0.8960	0.9144	0.8960	0.9351	0.9350	0.8617	0.5900	0.8556	0.8425	0.9655	0.9111	0.9144
7	0.0546	0.3580	0.1315	0.0953	0.0291	0.1663	****	0.9184	0.8884	0.9184	0.9268	0.9083	0.7103	0.4657	0.8892	0.8785	0.8689	0.9128	0.8884
8	0.0679	0.3580	0.1205	0.0746	0.0951	0.1098	0.0852	****	0.8076	1.0140	0.9177	0.9083	0.7357	0.6448	0.8892	0.9184	0.9676	0.8114	0.8076
9	0.1121	0.5406	0.1467	0.0840	0.1879	0.0895	0.1184	0.2137	****	0.8076	0.9297	0.9586	0.8835	0.4536	0.8160	0.7163	0.8752	0.9146	1.0227
10	0.0679	0.3580	0.1205	0.0746	0.0951	0.1098	0.0852	-0.0139	0.2137	****	0.9177	0.9083	0.7357	0.6448	0.8892	0.9184	0.9676	0.8114	0.8076
11	0.0081	0.3736	0.0982	0.0007	0.1254	0.0671	0.0760	0.0859	0.0729	0.0859	****	0.9850	0.8153	0.5670	0.8715	0.8427	0.9092	0.9419	0.9297
12	0.0363	0.3805	0.1689	0.0030	0.1341	0.0672	0.0961	0.0961	0.0423	0.0961	0.0151	****	0.7855	0.5916	0.8779	0.8242	0.8967	0.9516	0.9586
13	0.2638	0.8512	0.0587	0.2343	0.3200	0.1488	0.3420	0.3069	0.1239	0.3069	0.2043	0.2414	****	0.5463	0.7433	0.6751	0.8772	0.6969	0.8835
14	0.5801	0.5352	0.4778	0.5061	0.4795	0.5277	0.7642	0.4388	0.7904	0.4388	0.5674	0.5250	0.6047	****	0.7239	0.6355	0.6285	0.4661	0.4536
15	0.1266	0.5841	0.1212	0.1275	0.0403	0.1560	0.1174	0.1174	0.2034	0.1174	0.1375	0.1303	0.2966	0.3231	****	0.8472	0.8779	0.8384	0.8160
16	0.0943	0.2394	0.1579	0.1397	0.0525	0.1713	0.1296	0.0851	0.3336	0.0851	0.1712	0.1933	0.3930	0.4534	0.1658	****	0.8448	0.8274	0.7163
17	0.0911	0.4675	0.0671	0.0847	0.1588	0.0352	0.1406	0.0329	0.1333	0.0329	0.0952	0.1090	0.1311	0.4644	0.1303	0.1686	****	0.7993	0.8752
18	0.0340	0.2948	0.2374	0.0425	0.1320	0.0932	0.0913	0.2090	0.0893	0.2090	0.0598	0.0496	0.3612	0.7633	0.1763	0.1895	0.2240	****	0.9146
19	0.1121	0.5406	0.1467	0.0840	0.1879	0.0895	0.1184	0.2137	-0.0225	0.2137	0.0729	0.0423	0.1239	0.7904	0.2034	0.3336	0.1333	0.0893	****

Anexo 12

Tabela A12. – N° de acesso ao Genbank para as sequências dos genes COI e ITS usados na análise filogenética de *Bulinus truncatus*.

Espécies	N° de acesso ao Genbank	
	COI	ITS
<i>Albinaria forbesiana</i>		AY382065
<i>Ancylus sp</i>	AY350521	
<i>Ancylus fluviatilis</i>	AY282582	
<i>Ancylus fluviatilis</i>	DQ328270	
<i>Biomphalaria alexandrina</i>	AF199110	
<i>Biomphalaria angulosa</i>	DQ084826	
<i>Biomphalaria choanophala</i>	DQ084828	
<i>Biomphalaria glabrata</i>		AJ278512
<i>Biomphalaria glabrata</i>		AJ278513
<i>Biomphalaria obstructa</i>	AY282583	AJ27876
<i>Biomphalaria obstructa</i>		AJ27877
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	AF199090	
<i>Biomphalaria pfefferi</i>	AF199101	
<i>Biomphalaria pfefferi</i>		AJ289881
<i>Biomphalaria pfefferi</i>	AF199102	
<i>Biomphalaria prona</i>		AY030391
<i>Biomphalaria straminea</i>	AF199084	
<i>Biomphalaria straminea</i>	AF199085	
<i>Biomphalaria sudanica</i>	AF199106	DQ084901
<i>Biomphalaria sudanica</i>	AF199107	DQ084900
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		AY030217
<i>Biomphalaria tenagophila</i>		AY030218
<i>Bulinus truncatus</i>		AY030354
<i>Bulinus tropicus</i>	AY282583	
<i>Choanomphalus annuliformis</i>	Y147171	
<i>Helisoma trivolvis</i>		AY030256
<i>Indoplanorbis exutus</i>	AY282587	
<i>Laevaex fuscus</i>	AY282588	
<i>Laevaex fuscus</i>	DQ328237	
<i>Laevaex fuscus</i>	DQ328239	

Tabela A12. (cont.) – Nº de acesso ao Genbank para as sequências do gene COI e da região ITS usados na análise filogenética de *Bulinus truncatus*.

Espécies	Nº de acesso ao Genbank	
	COI	ITS
<i>Stagnicola caperata</i>		U82077
<i>Stagnicola elodes</i>		U82087
<i>Stagnicola emarginata</i>		U82089

Anexo 13

Tabela A13 - Polimorfismos observados nos nove haplotipos identificados nas sequências parciais do gene COI nos seis habitats estudados para as populações de *B. truncatus* de Portugal

	10	20	30	40
	*	*	*	*
Hap_1	CATTCAATAGACATTTATAAGACTTTAGGGCTTGTGTTTAGTA			
Hap_2	...T....GAC.....			
Hap_3C.....C.....C..			
Hap_4	...T....AC.....			
Hap_5	...T.TA..GAC.....			
Hap_6TAGA.AC.....CA.....CC....			
Hap_7	...TG...GG.....			
Hap_8G....A..CC.....ATC..C.GC..TC.			
Hap_9	TTAA.G.....CC.CCTTAGAC.C..C.T.CC.C.C.CTCC			

;

Anexo 14

Tabela A14. - Polimorfismos observados nos sete haplotipos identificados nas sequências parciais da região ITS nos seis habitats estudados para as populações de *B. truncatus* de Portugal.

MATRIX	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
[
170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	
330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	
490]																
[*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Hap_1

AGCATACAACAGAATGGTCATATGTGCAGAGGCATGAGCTCGTCGTTGCCCTTTGTACCTAGCCATCTTGCGTACGGTA
 TGCTCTACGCTCGCGTCAAGGTTCAAATGGCTCTCTCGCCCTTTTTTCGCTGATGTATTGCGGCTGTCTGGTATACCGG
 GGAAGCTCCTCCTCCGGGCCAGTTAAGAGCCGAAGCGGCGCTTGGCTCGCCGACCGGGCGCCAAGATTTTCGTTTTTT
 TTACAACGCATCAATTGCTTGTTCATGTGACTAAAATCGTCGCGCTGACGAAAACAAAAACAAGAGGGGGACACTCG
 GTCGAGAGAGCACATGCTGATTAATGTGACAGAACACAGACACGACTCTTACGATGGGGCTCGGGTCATCCCGGGG
 CACCCCGTGAGGGTGGTTGGCTAAGATCCTAGAAATTAATATGTTCTGGAGGGCGGTCCGCTCCGCCTCACGAAGA
 GAAACGGGAACGCCAACGAGGTGC

Hap_2

.....
G.....

Hap_3

.....
GA.GA...G.....

Hap_4

...ATTCCACT.GTTGCATAACCGC.....CCTGGAGACTGCCGAGGTTATACCAGACACTCCTGCCCTGGAGAGATCCGTA
 ACGGAGGGCGGAAGGAGACGGCATCCTGT.GCAGGGATCTC.GGACGGGCA.AGAGCAGCAA.G.AAACCA....AAAAGC
 .A....CTTCG..GTTC.....TCCTTGAGC.GCGA.GACGA.C.....AGAA.TATTAATGTTGT..GA.C.TTAGCCACCCT.....G..GG
 CGGGCCC.GG.GGACCAG.C.C.TGTCGT....AA.AG.T..GTTCA..TGTT.TGTCAATAAT...G.A.CTCTCTCGA..G.C.A..TCC.CC.
 AAGT.CTTTTGTTT.G.AGGCGACTTTG...CACATGAAA.A.G.AATTA.ATG.TTT.GAA...TAAAAACGA.AA.TTTGG.GGC
 GGG.CGCGGACGC.A.ACAA...CCGT.TCG.TTAA.C..G.CC...C.AA.G.ACTT.C.CC..GAT

Hap_5

GATTCCACT.GTTGCATAACCGCCTGGAGACTGCCGAGGTTATACCAGACACTCCTGCCCTGGAGAGATCCGTAACG
 GAGGGCGGAAGGAGACGGCATCCTGT.GCAGGGATCTC.GGACGGGCA.AGAGCAGCAA.G.AAACCAAAAAAGC.A..CTT
 CG..GTTC.TCA.TCCTTGAGC.GCGA.GACGA.C..CTGAA..AGAA.TATTAATGTTGT..GA.C.TTAGCCACCCT..G..GGCGGG
 CCC.GG.GGACCAG.C.C.TGTCGT..AA.AG.T..GTTCA.TGTT.TGTCAATAAT..G.A.CTCTCTCGA..G.C.A..TCC.CC.AAGT.C
 TTTTGT.TT.G.AGGCGACTTTG.CACATGAAA.A.G.AATTA.ATG.TTT.GAA.TAAAAACGA.AA.TTTGG.GGCGGG.CGCG
 GACGC.AAACAA...CCGT.TCG.TTAA.T.CGGCC...C..A.G.ACTT.C.CC..GAT

Hap_6

GATTCCACT.GTTGCATAACCGCCTGGAGACTGCCGAGGTTATACCAGACACTCCTGCCCTGGAGAGATCCGTAACG
 GAGGGCGGAAGGAGACGGCATCCTGT.GCAGGGATCTC.GGACGGGCA.AGAGCAGCAA.G.AAACCAAAAAAGC.A..CTT
 CG..GTTC.TCA.TCCTTGAGC.GCGA.GACGA.C..CTGAA..AGAA.TATTAATGTTGT..GA.C.TTAGCCACCCT..G..GGCGGG
 CCC.GG.GGACCAG.C.C.TGTCGT..AA.AG.T..GTTCA.TGTT.TGTCAATAAT..G.A.CTCTCTCGA..G.C.A..TCC.CC.AAGT.C
 TTTTGT.TT.G.AGGCGACTTTG.CACATGAAA.A.G.AATTA.ATG.TTT.GAA.TAAAAACGAAAA.TTTGG.GGCGGG.CTGC
 GACGC.CAACAA...CCGC.TCG.TTAA.T..GCCCC..G..A.GGGC.T.C.CC..GAT

Tabela A14 (cont.) - Polimorfismos observados sete haplotipos identificados nas sequências parciais da região ITS nos cinco distritos estudados para as populações de *B. truncatus* de Portugal.

Hap_7

GATTCCACTGTTCATAACCGCCCTGGAGACTGCCGAGGTTATACCAGACTCCTGCCCTGGA.AGATCCGTAACG
GAGGGCGGAAGGAGACGGCAT.CTGTTGCAGGGATCTTT.GACGGGCAAAAACCAGCAAAGTAAACC.ACTAGAG.AA
CTTCCTT.TTCATCGTTCC.TTCCCTCGATT.T.AACTT.TCAAAAA.TAGTTCTACCGC..TTTTAA.C.TGGC.AC.CTATTTTT
.CATGC.TT..C.AACCAATCTCTTTTCGCCAAAC.CCTTA.TTCGGTCCTGGGCCCA...ATGGTAAACT.TTTTGTGTGACA
CA.G.CTCA.CGT.TTTCGTC.ATTAGA.T.CTTTCCACTGGCTAGACGTT.TTTATTTAT.TGCATAAAACC.AAATCGTC
.C.TCTT.G.A.TGC.ACG.TCAATTATACA.ACTACAATT..TT...TTTTTT.TCAA.G.C.TCCATCCTCCT
