

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Liana Konovaloff Jannotti Passos

Seqüenciamento do DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)
(Mollusca: Gastropoda)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e
Molecular

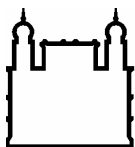
Orientador (es): Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Prof. Dr. Omar dos Santos Carvalho

Belo Horizonte
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em

Liana Konovaloff Jannotti Passos

**Seqüenciamento do DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila*
(Orbigny,1835) (Mollusca: Gastropoda)**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Prof. Dr. Omar dos Santos Carvalho**

Aprovada em: 26/04/2007

EXAMINADORES:

**Prof. Dr. Presidente: Silvana A.R. Carvalho Thiengo
Prof. Dr. Elio Hideo Babá
Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amor, amigo, e companheiro Zorô, e a minha filha Fernanda pelo constante apoio e carinho, por serem pessoas tão especiais e por não me deixar desistir nunca. Aos meus queridos pais pelo carinho, amor e apoio sempre presentes.

Ao Omar agradeço pela amizade, paciência, convivência, confiança e por ter me oferecido a oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Roberta pela amizade, companheirismo, colaboração e apoio nos momentos difíceis, mostrando-se sempre disponível em ajudar.

Ao Jerônimo que apareceu no momento certo, estando sempre disponível para ajudar nas análises das seqüências. Muito obrigada.

Ao Paulo Marcos pela confiança e por ter aceitado ser meu orientador.

As meninas do Moluscário, Sueleny, Delza, Dilcia, Lidiane, que sempre me apoiaram.

As colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular por sempre terem me recebido no seu laboratório com muito carinho. Agradeço principalmente a Silvane pela ajuda na clonagem dos fragmentos, a Elisângela e Luciana pelo suporte técnico no processo de seqüenciamento, ao Anderson pela ajuda na parte de informática e ao Guilherme.

Aos amigos do Laboratório de Helminthoses Intestinais, Pollanah, Tatiana, Cristiane Lafetá, Simone, Sandra, Christiane Goveia, Paula, Janaína, Cristiano, Zezinho, Ronaldo, Cíntia, Ricardo pelos agradáveis momentos que passamos juntos.

A amiga Héliida pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

A família Konovaloff Jannotti por sempre torcerem pelo meu sucesso e a família Passos pelos belos finais de semana de descontração e por me deixar fazer parte dela.

Ao pessoal do setor de informática e do setor administrativo do IRR pela ajuda para solucionar os problemas que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Segemar pela disponibilidade em ajudar nas referências bibliográficas.

A todos os meus amigos do Instituto René Rachou.

A Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao Instituto René Rachou na pessoa de seu diretor Alvaro Romanha.

A Deus e ao meu anjo da guarda....

“Que o tempo, senhor da razão, lhe dê a calma necessária para entender que seus problemas, vistos com calma e com razão, poderão sempre transformar-se em novas chances para o seu desenvolvimento humano e profissional, para que você encontre paz e atinja o seus objetivos”

Zorô

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1-INTRODUÇÃO	1
1-1- POSIÇÃO SISTEMÁTICA DO GÊNERO <i>BIOMPHALARIA</i> NO FILO MOLLUSCA	1
1-2- IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>BIOMPHALARIA</i>	4
1-3 - <i>BIOMPHALARIA TENAGOPHILA</i> E A ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	5
1-4-DNA MITOCONDRIAL	10
1-4-1- SEQÜENCIAMENTO DO DNÁ MITOCONDRIAL DE MOLUSCOS	15
1-5- UMA HIPÓTESE INFERINDO A FILOGENIA DE MOLUSCOS.....	18
2 - JUSTIFICATIVA	23
3 - OBJETIVO GERAL	24
3-1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 – METODOLOGIA.....	25
4.1 – MOLUSCOS	25
4.2 - EXTRAÇÃO DE DNA	25
4.3 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	25
4-4 - CLONAGEM MOLECULAR DOS PRODUTOS DE PCR	28
4-5 - SEQÜENCIAMENTO AUTOMÁTICO	29
4-6 - ANÁLISE DO GENOMA E FILOGENOMAS	32
4-7 - ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA SEQUENCIAMENTO DO DNAMT DE <i>BIOMPHALARIA</i> <i>TENAGOPHILA</i>	36
4-8 - SUBMISSÃO AO GENBANK	37
5 – RESULTADOS	38

5-1- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE PARTE DO COI.....	38
5-2- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE PARTE DO 16S	38
5-3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE PARTE DO CYTB.....	39
5-4- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE PARTE DO 12S	40
5-5-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DOS 4 FRAGMENTOS DO DNA MITOCONDRIAL	40
5-6- PCR DE COLÔNIA DOS FRAGMENTOS CLONADOS	41
5-6-1- REGIÃO COI-16S	41
5-6-2- REGIÃO 16S-CYTB	42
5-6-3- REGIÃO CYTB-12S	43
5-6-4- REGIÃO 12S-COI	44
5-7-CONTEÚDO DO MTDNA	45
5-7-1- GENES PARA PROTEÍNAS	48
5-7-1-1- ATP F0 SINTASE SUBUNIDADE 6 (ATP6).....	48
5-7-1-2- ATP F0 SINTASE SUBUNIDADE 8 (ATP8)	49
5-7-1-3- CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE I (COI)	50
5-7-1-4- CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE II (COII)	51
5-7-1-5- CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE III (COIII)	51
5-7-1-6- CITOCROMO B (CYTB)	52
5-7-1-7- NADH 1 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 1 (NAD1)	53
5-7-1-8- NADH 2 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 2 (NAD2)	54
5-7-1-9- NADH 3 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 3 (NAD3)	55
5-7-1-10 - NADH 4 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 4 (NAD4)	56
5-7-1-11- NADH 4L DESIDROGENASE SUBUNIDADE 4L (NAD4L)	57
5-7-1-12 - NADH 6 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 6 (NAD6)	57
5-7-1-13 - NADH 5 DESIDROGENASE SUBUNIDADE 5 (NAD5)	58
5-7-2- RNA DE TRANSFERÊNCIA	60
5-7-2-1-RNAT ^{ASP}	61
5-7-2-2- RNAT ^{CYS}	61
5-7-2-3- RNAT ^{PHE}	62
5-7-2-4- RNAT ^{TYR}	62

5-7-2-5- RNAT ^{TRP}	62
5-7-2-6- RNAT ^{GLY}	63
5-7-2-7- RNAT ^{HIS}	63
5-7-2-8- RNAT ^{GLN}	64
5-7-2-9- RNAT ^{LEU}	64
5-7-2-10- RNAT ^{ASN}	64
5-7-2-11- RNAT ^{ARG}	65
5-7-2-12- RNAT ^{GLU}	65
5-7-2-13- RNAT ^{MET}	65
5-7-2-14- RNAT ^{SER}	66
5-7-2-15- RNAT ^{SER2}	66
5-7-2-16- RNAT ^{THR}	66
5-7-2-17- RNAT ^{ILE}	67
5-7-2-18- RNAT ^{LYS}	67
5-7-2-19- RNAT ^{VAL}	67
5-7-2-20- RNAT ^{LEU2}	68
5-7-2-21- RNAT ^{ALA}	68
5-7-2-22- RNAT ^{PRO}	68
5-7-3- ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS RNATS.....	70
5-7-4- GENE PARA O RNAR	72
5-7-4-1- RNA RIBOSSOMAL UNIDADE MAIOR 16S	72
5-7-4-2- RNA RIBOSSOMAL UNIDADE MENOR 12S.....	74
5-8 - ORDEM GÊNICA.....	76
5-9 - ANÁLISE FILOGENÉTICA	78
6- DISCUSSÃO	82
7- CONCLUSÕES.....	94
8- PUBLICAÇÕES DE TRABALHOS DESENVOLVIDOS PARALELAEMNTE A TESE	95
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
10- APÊNDICE.....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - MOLUSCOS DO GÊNERO <i>BIOMPHALARIA</i>	6
TABELA 1.2 - COMPONENTES BÁSICOS DO DNA MITOCONDRIAL DE ANIMAIS	12
TABELA 1.3 - TAMANHO DO DNÂMT DE MOLUSCO DA CLASSE GASTROPODA.....	17
TABELA 4.4 - INICIADORES UNIVERSAIS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR REGIÕES DO DNA MITOCONDRIAL DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	26
TABELA 4.5 – INICIADORES DESENHADOS A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTIDAS DA PRIMEIRA AMPLIFICAÇÃO	27
TABELA 4.6 - SEQÜÊNCIAS DOS INICIADORES M13F E M13R.....	29
TABELA 4.7 - SEQÜÊNCIAS DOS INICIADORES INTERNOS (“PRIMER WALKING”) UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO	31
TABELA 4.8 – MOLUSCOS UTILIZADOS NO ESTUDO FILOGENÉTICO.....	35
TABELA 4.9 - CÓDIGO GENÉTICO MITOCONDRIAL DE INVERTEBRADOS.....	35
TABELA 5.10 – REGIÕES NÃO CODIFICADORAS NO DNA MITOCONDRIAL DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	46
TABELA 5.11 – REGIÕES DE SOBREPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS NO DNA MITOCONDRIAL DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	47
TABELA 5.12 - CÓDON DE INICIAÇÃO E PARADA ENCONTRADOS EM PROTEÍNAS DO DNA MITOCONDRIAL DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	59
TABELA 5.13 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	60
TABELA 5.14 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RNÂT DE <i>B. TENAGOPHILA</i> (BT) E <i>B. GLABRATA</i> (BG)	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- CLASSIFICAÇÃO TRADICIONAL DO FILO MOLLUSCA.....	2
FIGURA 1.2 - CLASSIFICAÇÃO TRADICIONAL DA SUB-CLASSE PULMONATA	3
FIGURA 1.3 - MAPA DO BRASIL COM A DISTRIBUIÇÃO DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	8
FIGURA 1.4 - MITOCÔNDRIA.....	10
FIGURA 1.5 - DNA MITOCONDRIAL DE HUMANO	11
FIGURA 1.6- ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE UM RNA DE TRANSFERÊNCIA	14
FIGURA 1.7 – CLADOGRAMA ILUSTRANDO UMA DAS HIPÓTESES SOBRE A FILOGENIA DOS MOLLUSCA	20
FIGURA 1.8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DO FILO MOLLUSCA, BASEADA NA SEQÜÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GENOMA MITOCONDRIAL DE ALGUNS GÊNEROS (KNUDSEN ET AL. 2006).	22
FIGURA 4.9 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE “PRIMER WALKING”	30
FIGURA 4.10 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO DNAMT MOSTRANDO AS REGIÕES, ONDE FORAM DESENHADOS OS INICIADORES	37
FIGURA 5.11 - SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO COI DO DNAMT DE <i>B. TENAGOPHILA</i> ...	38
FIGURA 5.12 - SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO 16S DO DNAMT DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	39
FIGURA 5.13 - SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO CYTB DO DNAMT DE <i>B. TENAGOPHILA</i> ..	39
FIGURA 5.14 - SEQÜÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO 12S DO DNAMT DE <i>B. TENAGOPHILA</i>	40
FIGURA 5.15 - PCR DOS QUATRO FRAGMENTOS DO DNAMT DE <i>B. TENAGOPHILA</i> COM INICIADORES ESPECÍFICOS CYTBF-12SLR, 12SLF3-COIR4, COI2-16SL1, 16SL2-CYTB LR	41
FIGURA 5.16 - PCR DE COLÔNIA TRANSFORMADAS COM O INSERTO COI-16S.....	42
FIGURA 5.17 – PCR DE COLÔNIA TRANSFORMADAS COM O INSERTO 16S-CYTB	43
FIGURA 5.18 – PCR DE COLÔNIA TRANSFORMADAS COM O INSERTO CYTB-12S	44
FIGURA 5.19 – PCR DE COLÔNIA TRANSFORMADAS COM O INSERTO 12S-COI.....	45
FIGURA 5.20 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA ATP6 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	49
FIGURA 5.21 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA ATP8 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	49

FIGURA 5.22- ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA COI DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	50
FIGURA 5.23 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA COII DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	51
FIGURA 5.24 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA COIII DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	52
FIGURA 5.25 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA CYTB DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	53
FIGURA 5.26 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD1 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	54
FIGURA 5.27 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD2 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	55
FIGURA 5.28 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD3 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	55
FIGURA 5.29 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD4 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	56
FIGURA 5.30 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD4L DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	57
FIGURA 5.31 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD6 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	57
FIGURA 5.32 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NAD5 DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	58
FIGURA 5.33 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{ASP} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	61
FIGURA 5.34 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{CYS} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	61
FIGURA 5.35 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{PHE} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	62
FIGURA 5.36 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{TYR} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	62

FIGURA 5.37 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{TRP} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	62
FIGURA 5.38 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{GLY} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	63
FIGURA 5.39 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{HIS} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	63
FIGURA 5.40 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{GLN} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	64
FIGURA 5.41 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{LEU} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	64
FIGURA 5.42 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{ASN} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	64
FIGURA 5.43 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{ARG} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	65
FIGURA 5.44 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{GLU} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	65
FIGURA 5.45 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{MET} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	65
FIGURA 5.46 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{SER} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	66
FIGURA 5.47 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{SER2} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	66
FIGURA 5.48 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{THR} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	66
FIGURA 5.49 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{ILE} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	67
FIGURA 5.50 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{LYS} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	67
FIGURA 5.51 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT^{VAL} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>.....	67

FIGURA 5.52 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT ^{LEU2} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	68
FIGURA 5.53 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT ^{ALA} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	68
FIGURA 5.54- ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO RNAT ^{PRO} DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	68
FIGURA 5.55- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTURUTRAS DOS RNATS. A- RNAT ^{ASN} ; B- RNAT ^{ASP} C- RNAT ^{ALA} ; D- RNAT ^{THR} , E- RNAT ^{VAL} , F- RNAT ^{PRO}	71
FIGURA 5.56 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DO RNAR 16S DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	73
FIGURA 5.57 - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DO RNAR 12S DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	75
FIGURA 5.58 - COMPARAÇÃO DA ORDEM GÊNICA DE <i>B. TENAGOPHILA</i> E <i>B. GLABRATA</i>	77
FIGURA 5.59 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DO FILO MOLLUSCA OBTIDA APÓS ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO O MÉTODO MP	79
FIGURA 5.60 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DO FILO MOLLUSCA OBTIDA APÓS ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO O MÉTODO ML	80
FIGURA 5.61 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DO FILO MOLLUSCA OBTIDA APÓS ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO O MÉTODO NJ.....	81
FIGURA 6.62 - ESTRUTURAS SECUNDÁRIA DE RNAT DE <i>E. HERKLOTSI</i> (DIREITA), <i>C. NEMORALIS</i> (ESQUERDA)	86
FIGURA 6.63 – ORDEM DOS GENES DAS PROTEÍNAS E DOS RNAR DO GENOMA MITOCONDRIAL DE MOLUSCOS (KNUDSEN ET AL 2006)	88

LISTA DE ABREVIATURAS

A -	Adenina
Ala -	Alanina
Arg-	Arginina
Asn -	Asparagina
Asp -	Acido aspártico
ATP6 -	ATP F0 sintase subunidade 6
ATP8 -	ATP F0 sintase subunidade 8
C -	Citosina
COI -	Citocromo C oxidase subunidade I
COII -	Citocromo C oxidase subunidade II
COIII -	Citocromo C oxidase subunidade III
Cytb -	Citocromo B
Cys -	Cisteína
DNAmt -	Acido desoxirribonucléico da mitocôndria
dNTP's -	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA -	<i>Ethilenediaminetetracetic acid</i> ; ácido etilendiaminotetracético
G -	Guanina
Gln -	Glutamina
Glu -	Acido glutâmico
Gly -	Glicina
His -	Histidina
Ile -	Isoleucina
Kb -	Kilobase; unidade correspondente a mil pares de bases
Leu -	Leucina
Lys -	Lisina
ML -	<i>Maximum likelihood</i> ; máxima verossimilhança
MP -	<i>Maximum parsimony</i> ; máxima parcimônia

Met -	Metionina
NADH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ND1 -	NADH desidrogenase subunidade 1
ND2 -	NADH desidrogenase subunidade 2
ND3 -	NADH desidrogenase subunidade 3
ND4 -	NADH desidrogenase subunidade 4
ND4L -	NADH desidrogenase subunidade 4L
ND5 -	NADH desidrogenase subunidade 5
ND6 -	NADH desidrogenase subunidade 6
NJ -	<i>Neighbor-joining</i> ; vizinho próximo
OTUs -	<i>Operational taxonomic unit</i> ; unidades taxonômicas operacionais
Pb -	Pair bases; pares de bases
PCR -	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
Phe -	Fenilalanina
Pro -	Prolina
RNAr -	Acido ribonucléico ribossomal
RNAt -	Acido ribonucléico de transferência
Ser -	Serina
T -	Timina
U -	Uracila
Thr -	Treonina
Trp -	Triptofano
Tyr -	Tirosina
Val -	Valina

RESUMO

Com o advento da técnica de seqüenciamento automático de nucleotídeos tornou-se possível, em um curto intervalo de tempo, um aumento considerável de informações sobre o genoma de diversos organismos. O seqüenciamento de DNA mitocondrial de moluscos vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Do gênero *Biomphalaria*, somente uma espécie (*B. glabrata*) tinha o seu genoma mitocondrial totalmente seqüenciado. Neste trabalho foi seqüenciado e caracterizado o DNAm de *Biomphalaria tenagophila*, molusco hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* no Brasil. Esta espécie possui linhagens suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni*, bem como cepa totalmente resistente, como é o caso da linhagem geográfica da Reserva Biológica do Taim (RS), foco do presente estudo. O tamanho do genoma encontrado foi de 13.722 pb: 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e dois RNAs ribossomais (RNAr). Além do seqüenciamento, foi analisada a organização do genoma de *B. tenagophila* pelo conteúdo e localização das regiões codificantes e não codificantes, regiões de sobreposições de genes. Foi realizada a comparação das seqüências dos aminoácidos; dos códons de iniciação e de parada das seqüências nucleotídicas dos RNAt, dos RNAr12S e dos RNAr16S e da organização dos genes entre *B. tenagophila* e *B. glabrata*, hospedeira intermediária mais importante do Brasil. Além disso, foram desenhadas as estruturas secundárias de seis RNAt, de *B. tenagophila*; e estimada a relação filogenética entre moluscos que tinham seu genoma mitocondrial completo depositado no GenBank, utilizando os métodos de agrupamento de vizinho, da máxima parcimônia e da máxima verossimilhança. Foram encontradas diferenças no tamanho e na composição dos genes entre *B. tenagophila* e *B. glabrata*. A ordem gênica mitocondrial de *B. tenagophila* foi a mesma de *B. glabrata*. A seqüência completa do genoma mitocondrial de *B. tenagophila* foi depositada no banco de dados GenBank com o número de acesso EF433576.

ABSTRAT

With the advent of the automatic sequencing of nucleotides it has been possible in a short period of time to obtain a great amount of information about genomes of different organisms. The mitochondrial DNA sequencing has been considerably increasing in the last years. Just one species of the genus *Biomphalaria* – *Biomphalaria glabrata* – had its mitochondrial genome totally determined. In this study, the mtDNA of *Biomphalaria tenagophila*, a mollusc that acts as an intermediary host for *Schistosoma mansoni* in Brazil, was determined and characterized. This species presents susceptible strains to *S. mansoni* infection, as well as a totally resistant strain, e.g. the geographic strain originating from the Biological Reserve in Taim (RS, Brazil), that is the target of this study. The size of the actual genome was 13,722 bp: 13 protein coding genes, 22 transfer RNA genes (tRNAs) and two ribosomal subunit genes (rRNAs). Besides the sequencing, analysis of the genome organization of *B. tenagophila* was performed by gene alignment, contents and localization of the coding and noncoding regions. Sequences of amino acids were compared, as well as of the start and stop codons, nucleotides sequences of the tRNA, rRNA12S and of the rRNA16S and of the organization of genes between *B. tenagophila* and *B. glabrata*, the most important intermediary host in Brazil. Besides, we have assembled the secondary structures of six tRNA for *B. tenagophila*, and evaluated the phylogenetic relation among several molluscs that had their complete mitochondrial genome deposited in the GenBank, using the methods of neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood. Some differences in size and composition of genes between *B. tenagophila* and *B. glabrata* were detected. The gene order of *B. tenagophila* and *B. glabrata* was similar. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *B. tenagophila* has been submitted to GenBank, and the accession number is EF433576.

1- INTRODUÇÃO

1-1- Posição sistemática do gênero *Biomphalaria* no filo Mollusca

O filo Mollusca constitui o maior grupo de invertebrados, depois dos artrópodes. Os organismos deste filo são um dos mais fascinantes do Reino Animal, graças à extraordinária diversidade e adaptações ambientais, sendo encontrados em habitats marinhos, dulcícolas e terrestres.

Este filo é constituído por sete classes: Gastropoda, Polyplacophora, Cephalopoda, Bivalvia, Scaphopoda, Aplacophora e Monoplacophora (Fig. 1.1) (Brusca & Brusca).

A classe Gastropoda, de maior sucesso adaptativo, possui cerca de 70.000 espécies, entre as quais, espécies de importância médica e veterinária. Os representantes desta classe caracterizam-se por apresentar cabeça bem desenvolvida com um ou dois pares de tentáculos, pé achatado na superfície ventral, geralmente com concha, com abertura na região anterior do corpo, devido à torção de 180° da massa visceral. Eles podem ser monóicos (hermafroditas) ou dióicos (sexos separados).

Zilch (1959-1960) divide esta classe em duas: Streptoneura e Euthyneura. Entretanto pelo esquema clássico mais utilizado (Thiele 1929-1935 1992, Grassé 1960-1968, Hyman 1967, Gotting 1974, Rios 1994) esta classe é dividida em três subclasses: Prosobranchia, Pulmonata e Opisthobranchia. Os Prosobranchia possuem representantes exclusivamente marinhos (Archaeogastropoda e Neogastropoda) e sem interesse parasitológico, e representantes que vivem em ambientes marinho, terrestre e de água doce (Megastropoda). Os Opisthobranchia também são exclusivamente marinhos e sem interesse parasitológico. Os moluscos da subclasse Pulmonata são na maioria de água doce ou terrestre, respiram por pulmões especiais e possuem concha espiralada reduzida ou ausente. São hermafroditas e ovíparos. Esta subclasse é dividida em quatro ordens: Archaeopulmonata, Stylommatophora, Soleolifera, Basommatophora (Fig. 1.2).

A ordem Archaeopulmonata é representada pelos pulmonatas primitivos.

A ordem Stylommatophora é a maior, sendo que os seus representantes são espécies terrestres, possuindo dois pares de tentáculos (o par inferior anterior pode não ser evidente) e seus olhos situam-se em cima do par superior. A abertura genital é única tanto para o masculino como para o feminino.

A ordem Soleolifera (Systellommatophora) é representada por espécies marinhas e terrestres, desprovidas de concha, possuem dois pares de tentáculos, sendo

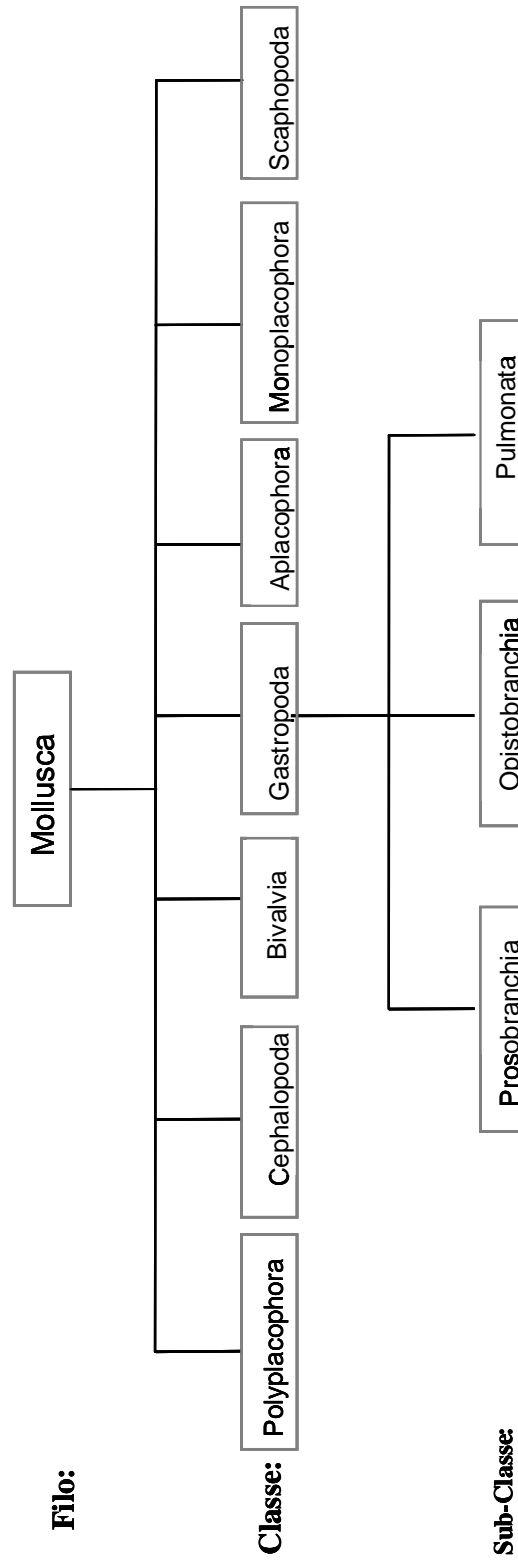
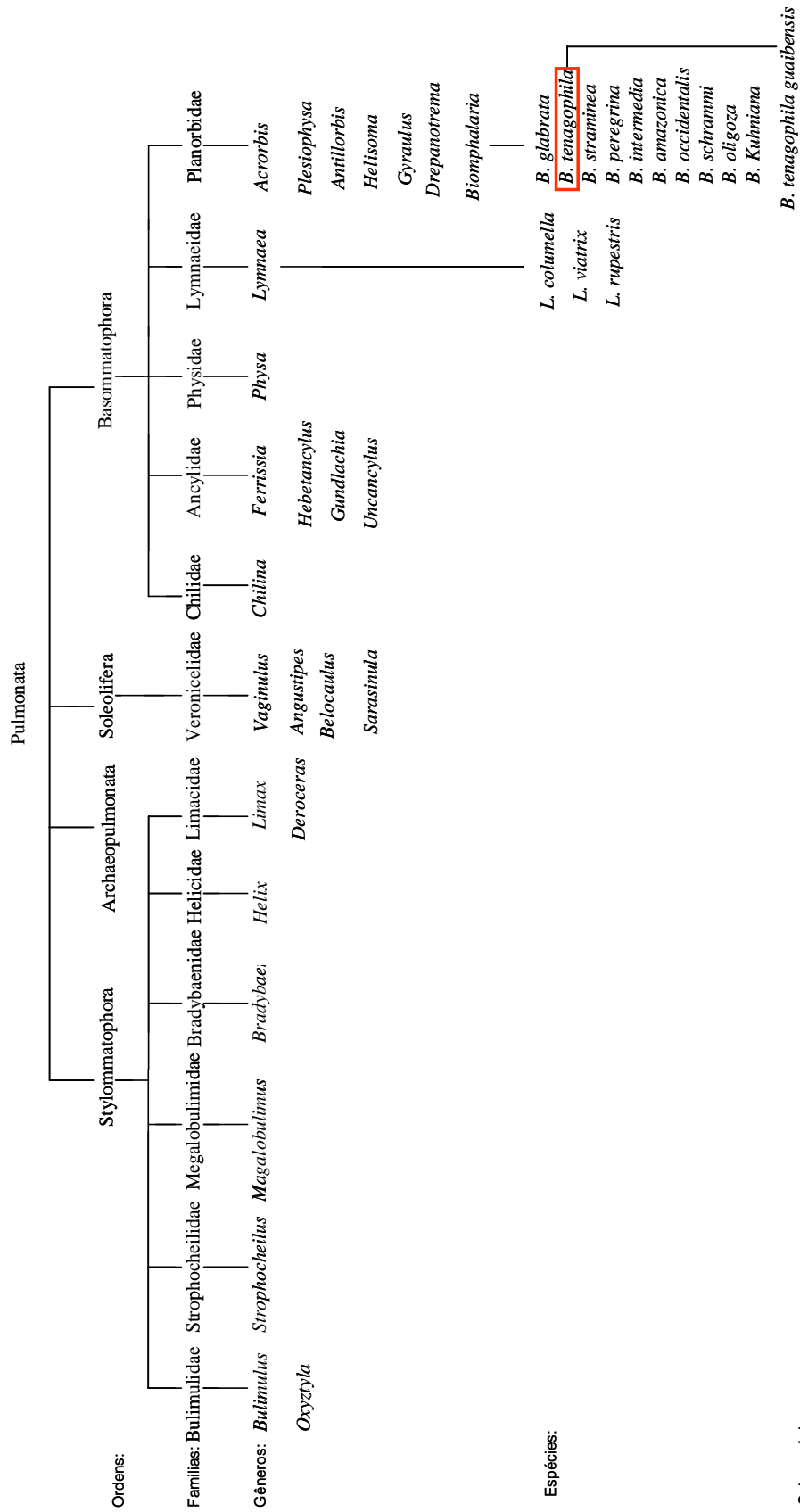


Figura 1.1 – Classificação tradicional do filo Mollusca

Fonte – Moluscos de importância médica no Brasil. Carvalho et al. 2005



Sub-espécies
 Fonte - Moluscos de importância médica no Brasil. Carvalho et al. 2005

que os olhos se localizam na extremidade dos tentáculos posteriores. Possuem duas aberturas genitais, uma feminina e outra masculina.

A ordem Basommatophora é constituída, principalmente, por moluscos de água doce, com concha cônica, discoidal e lisa, possuem um par de tentáculos, na base dos quais se localizam os olhos. Os seus ovos são depositados em cápsulas gelatinosas, e as aberturas genitais masculina e feminina são separadas. No Brasil, essa ordem é representada por 5 famílias: Lymnaeidae, Planorbidae, Physidae, Ancyliidae e Chiliniidae. Na família Planorbidae, entre vários gêneros, está a *Biomphalaria*, que possui espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*. Normalmente, estes moluscos são encontrados em água doce parada ou de correnteza, com velocidade inferior a 30cm/s, em pequenos córregos, em margens de lagoas, brejos, poços, valas, pântanos, podendo adaptar-se a diferentes condições ambientais. Eles têm preferência por locais ricos em matéria orgânica e microflora, pouca turbidez, pH entre 6 a 8 e temperatura média entre 20°C e 25°C (Paraense 1972). Estes moluscos estão sujeitos aos fenômenos de diapausa¹ ou estivação² com adaptações e aparecimento de lamelas para proteção contra a dessecação (Paraense 1957, Richards 1963). Eles podem se enterrar na lama ou no solo úmido podendo melhor resistir à dessecação e a ação de moluscidas, são hermafroditas reproduzindo-se preferencialmente por fecundação cruzada quando pareados. Quando criados isoladamente são capazes de se reproduzirem por autofecundação, sendo que apenas um indivíduo pode produzir milhões de descendentes (Paraense 1955). Em relação à oviposição os tipos de suporte preferidos são as folhas ou hastes de plantas aquáticas ou qualquer suporte sólido submerso como pedras, madeira, paredes de concreto etc.

1-2- Importância epidemiológica das espécies do gênero *Biomphalaria*

Para as Américas e a África são referidas 37 espécies de *Biomphalaria*, porém, acredita-se que entre estas, muitas estejam em sinonímia (Mandahl-Barth 1957, Malek 1985, Brown 1994, Paraense 2004) (Tabela 1.1). Entretanto, segundo Paraense (comunicação pessoal 2005), é importante salientar que várias espécies - principalmente

¹ Diapausa - brusca parada no desenvolvimento, controlada por fatores internos, mesmo quando as condições do meio são favoráveis.

² Estivação - quiescência, que é determinada diretamente por condições desfavoráveis do meio, manifestando-se na forma de parada do desenvolvimento, induzida pela elevação da temperatura.

as africanas - são mal definidas anatomicamente, o que torna impossível diferenciá-las. Quanto à susceptibilidade, oito são consideradas suscetíveis, oito infectaram-se experimentalmente, nove são refratárias e as demais não foram estudadas quanto à susceptibilidade ao *S. mansoni* (Tabela 1.1).

As três espécies hospedeiras intermediárias do *S. mansoni* no Brasil, são *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. A *B. glabrata* é a mais importante hospedeira intermediária do *S. mansoni* nas Américas, cujo organismo, devido à sua alta compatibilidade com o trematódeo, facilita a infecção e reprodução, eliminando um número elevado de cercárias (Souza et al. 1995). Experimentos de susceptibilidade utilizando *B. glabrata* originárias de diversas regiões do Brasil (20 populações) e de três populações oriundas de Porto Rico, Ilhas St. Kitts e da Venezuela, revelaram índices de infecção variando de 0 a 100%, sendo que 17 (74%) populações apresentaram taxas de infecção superiores a 50% (Paraense & Corrêa 1963). Esses experimentos foram realizados com amostra de *S. mansoni* isolada de paciente de Belo Horizonte, MG, Brasil.

B. straminea é menos suscetível que a *B. glabrata*, sendo responsável pela transmissão da esquistossomose na região Nordeste do país. Entretanto, esta espécie possui a distribuição mais abrangente entre as três espécies. De fato, estudos realizados durante os anos de 1954 e 1955 com *B. straminea*, oriundas de 17 municípios do Estado de Pernambuco (Barbosa & Coelho 1956) revelaram taxas de infecção inferiores a 1%. Entretanto, quando analisamos os dados de prevalência obtidos em 1950 (Paraense & Corrêa 1963), deparamos com taxas de infecção humana, em 14 desses municípios, superiores a 50%. Estes dados demonstram que apesar de serem encontradas no campo com baixas taxas de infecção, *B. straminea* é capaz de manter elevadas taxas de infecção humana.

B. tenagophila tem importância epidemiológica na transmissão do *S. mansoni* nos estados da região Sul e Sudeste e será a seguir, motivo de maiores considerações por ser objeto do nosso estudo.

1-3 - *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda: Pulmonata) e a esquistossomose mansoni

A esquistossomose mansonii foi introduzida no Brasil nas zonas de canaviais da região Nordeste, espalhando-se para a região Sudeste, à medida que fatores sócio-econômicos exigiram migração da mão de obra escrava para a região aurífera e de

Tabela 1.1 - Moluscos do gênero *Biomphalaria*

Espécie	Distribuição geográfica	Suscetibilidade ao <i>Schistosoma mansonii</i>
<i>B. glabrata</i> (Say, 1818)	Antigua, Brasil, Curaçao, Dominica, Egito, Guadeloupe, Guiana Francesa, Haiti, Ilhas Ts. Kitts, Martinica, Montserrat, Nigéria, Porto Rico, República Dominicana, Saint Martin, Santa Lúcia, São Cristóvão, Suriname, Venezuela, Vieques	SUSC
<i>B. pfeifferi</i> (Krauss, 1848)	Africa do Sul (localidade tipo); Algeria, Angola, Botsuana, Camarões, Chade, Congo, Daomé (atual Benin), Etiópia, Gabão, Gâmbia, Gana, Guiné, Libéria, Líbia, Madagascar, Malawi, Moçambique, Nigéria, Quênia, República Centro-Africana, Rodésia, Senegal, Serra Leoa, Somália, Suazilândia, Sudão, Tanzânia, Transvaal, Uganda, Zaire, Zâmbia	SUSC
<i>B. alexandrina</i> (Ehrenberg, 1831)	Egito, Sudão	SUSC
<i>B. sudanica</i> (Martens, 1870)	Sudão, Uganda, Etiópia, Quênia, Tanzânia, Zaire, Zâmbia	SUSC
<i>B. straminea</i> (Dunker, 1848)	Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Brasil, Paraguai, Argentina, Dominica, Granada, Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Trinidad, Uruguai, Costa Rica e China	SUSC
<i>B. tenagophila</i> (Orbigny, 1835)	Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil, Peru, Bolívia e República Democrática do Congo	SUSC
<i>B. choanomphala</i> (Martens, 1879)	Tanzânia, Uganda, Quênia	SUSC
<i>B. camerunensis</i> (Boettger, 1941)	Mongongo, Camarões, Gana, Nigéria, República Centro-Africana, Zaire	SUSC
<i>B. amazonica</i> Paraense, 1966	Brasil, Bolívia e Colômbia	IE
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835)	Equador, Bolívia, Chile, Brasil, Paraguai, Peru, Uruguai, Argentina e Colômbia	IE
<i>B. aff. straminea</i> Paraense & Corrêa, 1989	Espinillar, Uruguai	IE
<i>B. havanensis</i> (Pfeiffer, 1839)	Haiti, Porto Rico (EU A), Cuba, Venezuela	IE
<i>B. helophila</i> (Orbigny, 1835)	Peru, Cuba, Costa Rica, Guatemala, Belize, Haiti, México, Saint Thomas, Costa Rica, El Salvador, República Dominicana, Porto Rico, Barbados e Nicaragua	IE
<i>B. stanleyi</i> (Smith, 1888)	Congo, Uganda, Chade, Ruanda	IE
<i>B. sericea</i> (Dunker, 1848)	Equador	IE
<i>B. smithi</i> Preston, 1910	Uganda	IE
<i>B. obstructa</i> (Morelet, 1849)	Estados Unidos, México, Porto Rico, Guatemala, El Salvador, Belize e Cuba	REF
<i>B. intermedia</i> Paraense & Deslandes, 1962	Brasil e Argentina	REF
<i>B. occidentalis</i> Paraense, 1981	Brasil, Paraguai e Argentina	REF
<i>B. oligoza</i> Paraense, 1974	Bolívia, Brasil e Argentina	REF
<i>B. tenagophila guaibensis</i> (Paraense 1984)	Brasil, Uruguai e Argentina	REF
<i>B. kuhniiana</i> (Clessin, 1883)	Suriname, Brasil, Venezuela, Panamá e Colômbia	REF
<i>B. schrammi</i> (Crosse, 1864)	Guiana Francesa, Guadalupe e Brasil	REF
<i>B. orbignyi</i> Paraense, 1975	Argentina e Uruguai	REF
<i>B. trigyra</i> (Philippi, 1869)	Peru e Equador	REF
<i>B. hermanni</i> (Boettger, 1910)	Namibia	SI
<i>B. germani</i> (Ranson, 1953)	Algeria	SI
<i>B. gaudi</i> (Ranson, 1953)	Dakar	SI
<i>B. angulosa</i> Mandahl-Barth, 1957	Tanzânia, Malawi, Zâmbia	SI
<i>B. temascalensis</i> (Rangel-Ruiz, 1987)	México	SI
<i>B. prona</i> (Martens, 1873)	Venezuela	SI
<i>B. subprona</i> (Martens, 1899)	México e Guatemala	SI
<i>B. andecola</i> (Orbigny, 1835)	Bolívia, Peru e Chile	SI
<i>B. equatoria</i> (Cousin, 1887)	Equador	SI
<i>B. cousini</i> Paraense, 1966	Equador	SI
<i>B. nicaraguana</i> (Morelet, 1851)	Nicaragua	SI
<i>B. edisoni</i> Estrada et al. 2006	Colômbia	SI

Suscetível = SUSC; Refrataria = REF; Infecção experimental = IE; Sem informação = SI

diamantes do nordeste do estado de Minas Gerais. Apesar da importância desta doença no país, o inquérito parasitológico nacional mais abrangente refere-se ao ano de 1950, realizado por Pellon e Texeira. Este inquérito revelou uma prevalência da doença de 10%. Entretanto, Amaral et al. (2006), relatam dados disponíveis do ano de 2003, do Programa de Controle da Esquistossomose, Ministério da Saúde, onde foram realizados testes parasitológicos em 6.510.477 indivíduos. Destes, 433.950 estavam parasitados, com uma prevalência da doença de 6,7%. A doença está diretamente relacionada com a falta de saneamento básico e de educação em saúde, com a existência de moluscos suscetíveis e a presença de indivíduos infectados, completando o ciclo evolutivo do parasito.

B. tenagophila é uma espécie importante na transmissão da esquistossomose no Brasil. Esta espécie já foi notificada em 603 municípios de 10 estados brasileiros, sendo encontrada na larga faixa costeira, desde o sul da Bahia até o Chuí no Rio Grande do Sul (Fig. 1.3). Esta espécie é a única transmissora da esquistossomose em extensas áreas do Estado de São Paulo, como também é responsável por focos isolados nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro (Paraense 1986).

B. tenagophila possui populações suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni* (Paraense & Correa 1978) e populações resistentes, como a população do Taim (RS), que será o foco de nosso estudo. Os moluscos *B. tenagophila* desta população do Taim já foram desafiados por diferentes cepas de *S. mansoni* e número variável de miracídios, mostrando-se sempre resistente à infecção (Santos et al. 1979, Bezerra et al. 2003, Martins-Souza et al. 2003 e Rosa et al. 2004, Rosa et al. 2006). Vários estudos já foram realizados para melhor compreensão dessa resistência a infecção. Barbosa et al. (2006) conseguiram reverter o fenótipo de suscetibilidade à infecção, através do transplante do órgão hematopoiético da população resistente para uma suscetível. Martins-Souza et al. (2003) não tiveram sucesso na tentativa de inibição da resistência da população do Taim após inoculação de sílica. Bezerra et al. (2003) submetem esta população a diferentes doses de radiação gama, e também não tiveram sucesso na inibição da resistência.

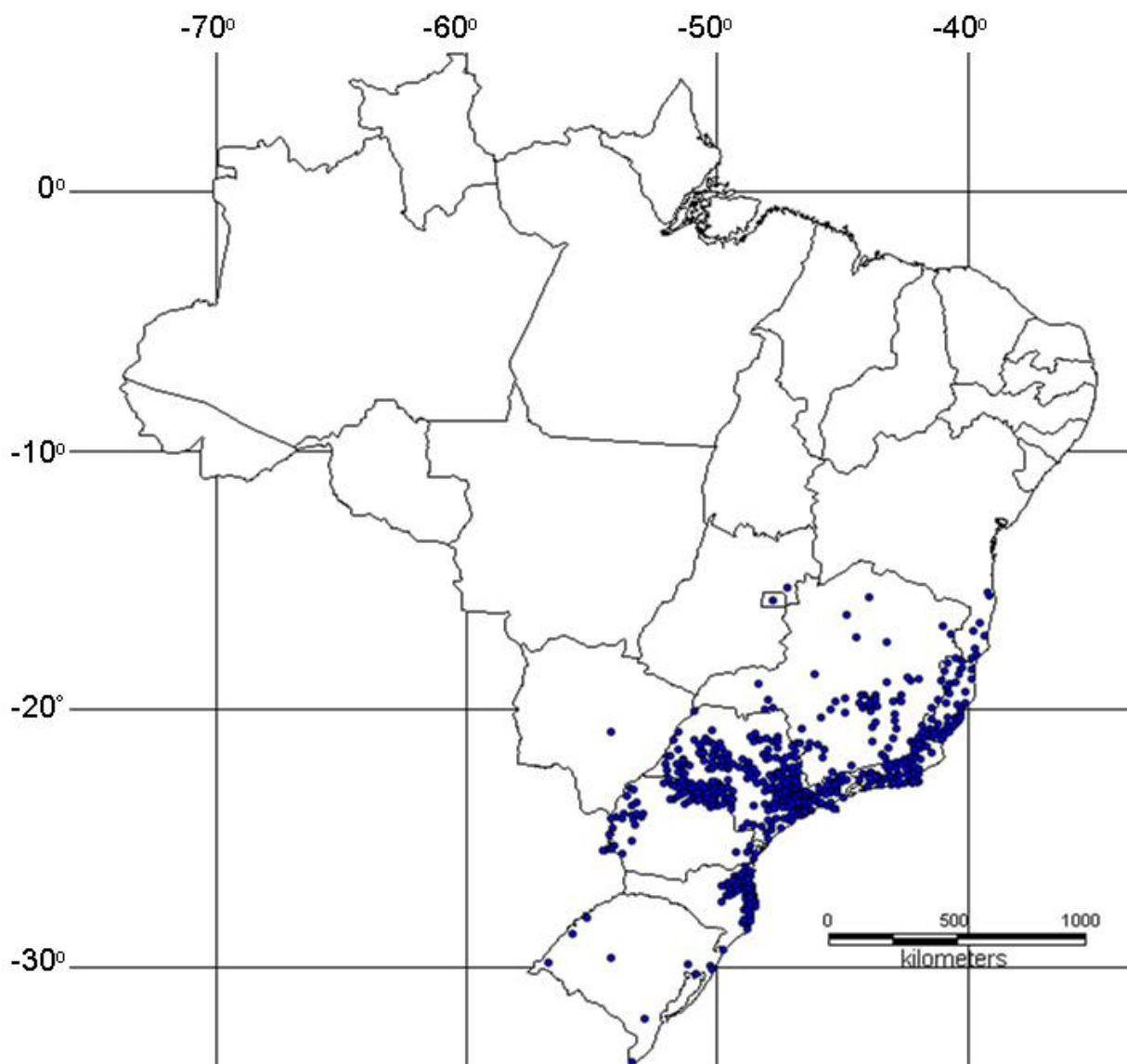


Figura 1.3 – Mapa do Brasil com a distribuição espacial de *B. tenagophila* (Carvalho et al. in press)

Pouco se sabe a respeito dos genes que conferem resistência a esta população. Santos et al. (1979) fizeram cruzamento da *B. tenagophila* do Taim com *B. tenagophila* suscetíveis, originários de Belo Horizonte, e seus descendentes (F1) tiveram uma taxa de infecção de 4,1% à cepa “SJ”. Freitas et al. (1985) fizeram cruzamentos entre *B. tenagophila* Joinville (população suscetível) e *B. tenagophila* Taim. Os descendentes (F1) mostraram taxas de infecção variando de 0 a 4,5% à cepa LE. Rosa et al. (2002), estudando os descendentes resultantes também do cruzamento entre uma *B. tenagophila* do Taim com *B. tenagophila* de Joinville (população suscetível) observou uma segregação mendeliana dominante, ou seja, os descendentes F1 foram 100% resistentes à infecção. Através da injeção de plasma de *B. tenagophila* do Taim para *B. tenagophila* Cabo Frio (suscetível) foi possível passar a resistência à infecção ao *S. mansoni* (Coelho & Bezerra 2006).

Estudos moleculares também foram realizados utilizando esta espécie. Através da LS-PCR foi possível separar a *B. tenagophila* da *B. occidentalis*, espécies que possuem a morfologia das conchas e dos órgãos internos muito semelhantes (Pires et al. 1997). Posteriormente, um estudo mais completo utilizando a PCR-RFLP da região ITS do DNAr foi possível separar o complexo *B. t. tenagophila*, *B. t. guabensis* e *B. occidentalis* (Spatz et al. 1999). Rosa et al. (2005) utilizaram a RAPD na busca de marcadores genéticos associados à resistência nos descendentes F2 resistentes e suscetíveis resultantes do cruzamento entre *B. tenagophila* do Taim (resistente) e *B. tenagophila* Joinville (suscetível), não obtendo sucesso em seus estudos. Estudos utilizando a PCR-RFLP identificaram um marcador de caráter dominante presente na região espaçadora transcrita interna do DNAr da população do Taim, desta população não ocorrendo, portanto, em outras populações (Barbosa 2001).

Até o momento estudos genéticos com *B. tenagophila* têm sido realizados utilizando o DNA nuclear. Entretanto, a importância de estudos utilizando o DNA mitocondrial vem aumentando, devido as suas propriedades únicas que serão abordadas a seguir.

1-4-DNA mitocondrial

Acredita-se que, originalmente, as mitocôndrias foram bactérias de vida livre, que durante um longo período estabeleceram uma simbiose com suas células hospedeiras eucarióticas e finalmente evoluíram para organelas dentro das células animais, trazendo consigo o seu próprio DNA. Estruturalmente a mitocôndria caracteriza-se pela presença de duas membranas (externa e interna), separadas por um espaço intermembranar. O espaço interno delimitado por uma membrana é preenchido pela matriz mitocondrial (Fig. 1.4). A matriz mitocondrial possui uma densidade moderada onde estão imersas as cadeias de DNA, ribossomos e pequenos grânulos.

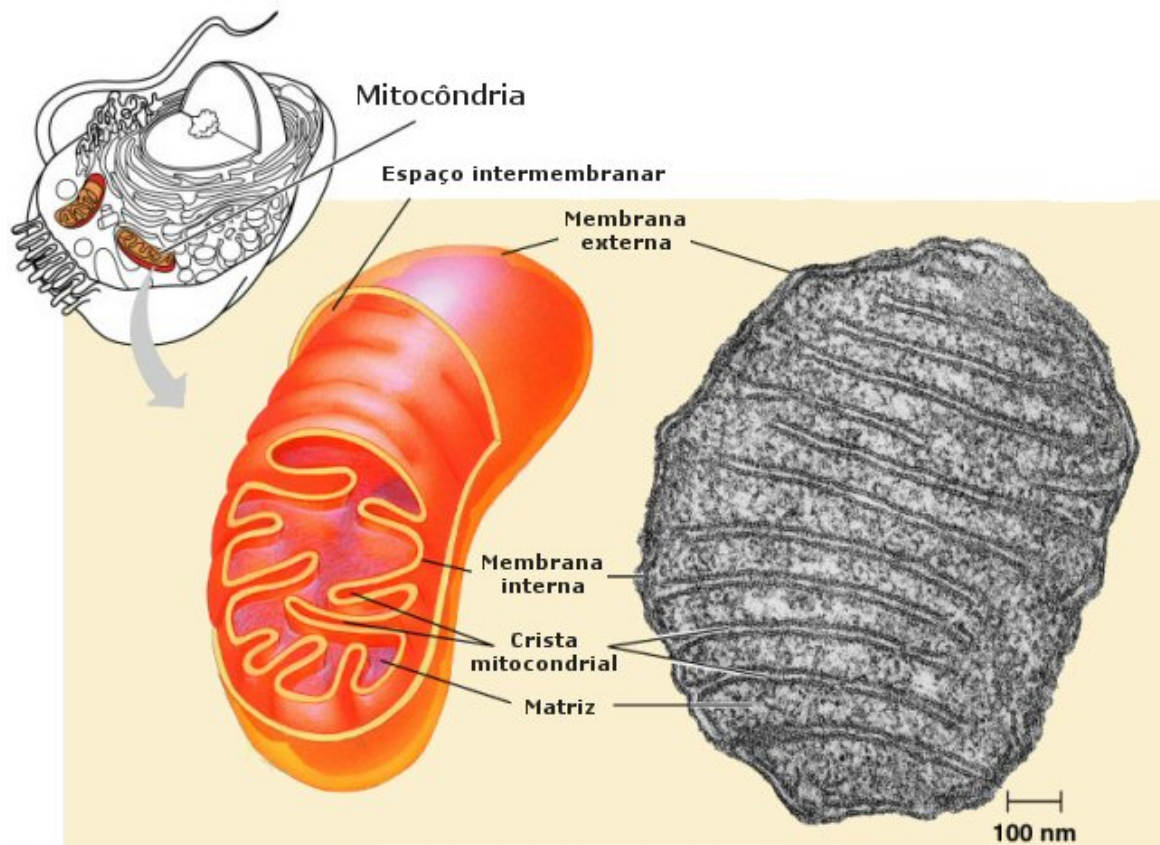


Figura 1.4- Mitocôndria (http://www.cientic.com/tema_celula_img4.html)

O DNAm^t dos animais é uma molécula circular dupla fechada, que codifica: 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e 2 RNAs ribossomais (RNAr), constituindo-se em uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (Avice 1986) (Fig. 1.5).

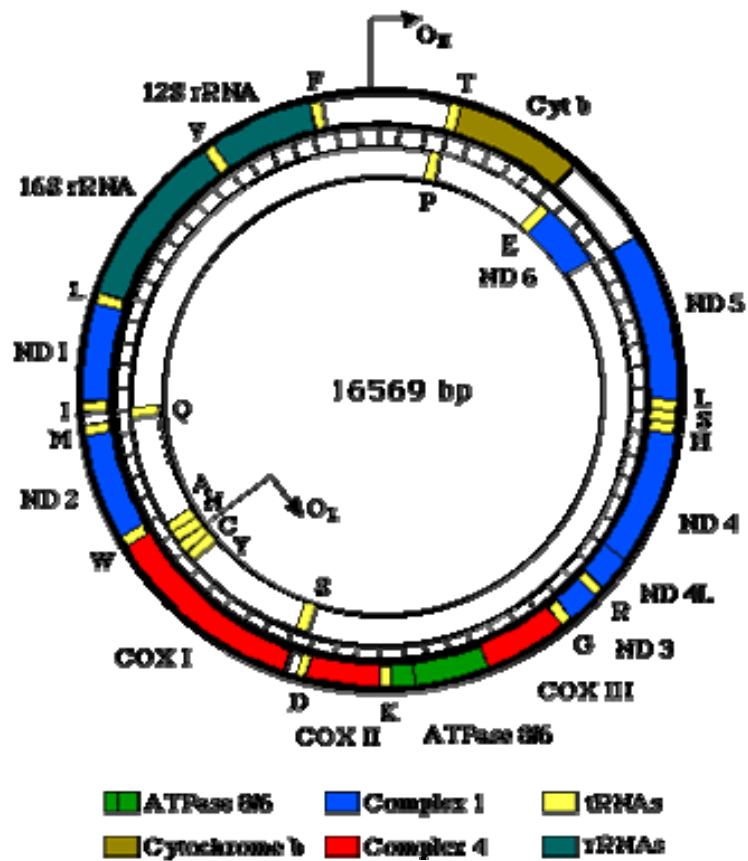


Figura 1.5 – DNA mitocondrial de humano

(<http://biologia.uab.es/biocomputacio/tutorial/sessio6/tutorialdnamit.htm>)

Boore (1999) em sua revisão sobre o DNAm (Tabela 1.2) relaciona os componentes básicos do DNAm de animais que são 13 proteínas, dois RNAr e 22 RNAt.

Tabela 1.2 - Componentes básicos do DNA mitocondrial de animais.

Codificador de proteínas	Designação do DNAm em animais	Sinônimo
Citocromo oxidase subunidades I,II e III	COI, COII, COIII	<i>cox1, cox2, cox3,</i>
Citocromo apoenzima	Cytb	<i>Cob</i>
NADH dehydrogenase 7 subunidades 1-6, 4L	ND1-6, 4L	<i>nad1-6, 4L</i>
ATP sintetase subunidade 6,8	A6, A8 ou ATP6, ATP8	<i>atp6,atp8</i>
Subunidade maior do RNA ribossomal	RNAr1	<i>Ml</i>
Subunidade menor do RNA ribossomal	RNArS	<i>Ms</i>
18 RNAs transportadores cada um especificando um aminoácido	Com a primeira letra do aminoácido correspondente	<i>trnX</i>
Dois RNAs transportadores específicos para leucina	Diferenciado pelo código reconhecido <i>L(CUN)</i> ou <i>L(URR)</i>	<i>Diferenciado pelo código</i>
Dois RNAs transportadores específicos para serina	Diferenciado pelo código reconhecido <i>S(AGN)</i> ou <i>S(UCN)</i>	<i>Diferenciado pelo código</i>

O DNAm contém regiões não codificadoras de tamanhos variáveis com sítios de iniciação para a transcrição e replicação (Wostenholme 1992). Frações dessas regiões não codificadoras, algumas vezes são duplicadas, resultando para alguns organismos, em moléculas de DNAm de tamanho variáveis.

As proteínas codificadas pelos RNAs mensageiros são componentes do sistema de fosforilação oxidativa, diretamente responsável pela função respiratória: citocromo b (Cytb), subunidades I-III da citocromo *c* oxidase (COI, COII, COIII), subunidades 6 e 8 do complexo ATPsintetase (ATP6, ATP8) e subunidades 1-6 e 4L da NADH

desidrogenase (ND1- ND6, ND4L). As demais subunidades destes complexos protéicos e todas as enzimas envolvidas na replicação e transcrição do DNAm_t são importadas do citoplasma por meio de sinais específicos de um sistema de transporte através das membranas mitocondriais (Alberts et al. 1994). O gene 8 do complexo ATPase não é encontrado no DNAm_t em nematóides (Okimoto et al. 1991), platelmintos (Le et al. 2000) e em alguns moluscos (Hoffmann et al. 1992, Milbury & Gaffney 2005, Breton et al. 2006, La Roche et al. 1990, Cao et al. 2004, Kim et al. 1999 não publicado).

Os genes codificadores de proteínas são analisados quanto ao tamanho e seqüências dos nucleotídeos, seqüências de aminoácidos e de códon. Com relação à posição das bases dos códons sabe-se que a terceira tem sido considerada neutra por alguns autores. O motivo é que as mutações que ocorrem nesta posição raramente levam a mudança de aminoácido. Para Garesse (1988) a substituição na terceira base, muda a eficiência de tradução não sendo um caráter verdadeiramente neutro.

Os RNAt são pequenas moléculas de RNA que geralmente apresentam cerca de 70 a 90 nucleotídeos (Watson et al. 1987). Um RNAt possui duas propriedades cruciais: representa um único aminoácido, e contém uma seqüência trinucleotídica, o anticódon que é complementar ao códon que representa o seu aminoácido. O anticódon reconhece o códon através do emparelhamento de bases complementares. As seqüências dos RNAt formam estruturas secundárias na forma de uma folha de trevo (Fig. 1.6) na qual o emparelhamento de bases complementares forma hastes que sustentam alças de fitas simples. As estruturas haste-alça são denominadas de braços do RNAt. Os quatro braços principais são: o braço TΨC; o braço D; o braço aceitador; o braço anticódon. O braço aceitador consiste de uma haste com bases emparelhadas que termina em uma seqüência não emparelhada cujo grupo 2' ou 3'-OH pode ser ligado a um aminoácido e o braço anticódon sempre contém a trinca do anticódon no centro da alça. Alguns RNAt possuem um outro braço chamado de braço adicional, que fica entre os braços TΨC e do anticódon. As principais variações de tamanho ocorrem na alça D, e no braço TΨC, além do braço adicional ser altamente variável (Lewin 2001).

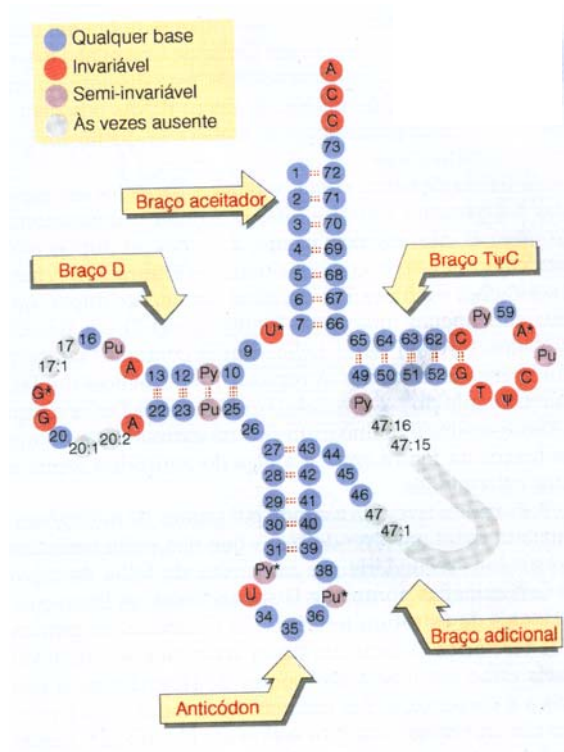


Figura 1.6 - Estrutura secundária de um RNA de transferência (Lewin 2001)

Já os RNAr têm um importante papel na síntese protéica. O genoma mitocondrial possui 2 genes para o RNAr, a subunidade maior chamada de 16S e a subunidade menor chamada de 12S. Estes genes possuem seqüências e estruturas conservadas, e por isso são utilizados em análise filogenética de diversos grupos (DeJong et al. 2003, Yoshida et al. 2006).

Embora o DNAm de animais seja conhecido por evoluir rapidamente, seu arranjo freqüentemente permanece inalterado por longo período de tempo. Como exemplo temos o arranjos dos genes entre humanos e trutas que são idênticos, além disso, os DNAm de animais tem homologia com DNAm de plantas, fungos e/ou protista (Boore 1999). Assim sendo, com algumas exceções, os arranjos dos genes são estáveis dentro dos grupos maiores e variáveis entre eles. Comparações desses arranjos gênicos têm um grande potencial para resolver algumas questões relacionadas à filogenia dos metazoários (Boore 1999). Comparações de arranjos do DNAm tem possibilitado a obtenção de uma filogenia sólida em casos onde todos os outros dados são inconclusivos, como a relação entre dois grandes grupos: equinodermos e artrópodes.

Através do DNAm é possível traçar um ancestral comum de uma espécie, produzindo informações a respeito da dinâmica e migrações de populações (Avisé

1986). Em virtude disso, muitos autores vem estudando a herança do DNAm, demonstrando resultados variados. Em humanos, por exemplo, esta herança é unicamente materna (Giles et al. 1980), enquanto no molusco *Mytilus* é biparental (Hoeh et al. 1991, Zouros et al. 1992).

Os introns estão ausentes nas seqüências dos DNAm de vários vertebrados (Anderson et al. 1981, 1982, Bibb et al. 1981) e invertebrados (Clary & Wolstenholme 1985, Wolstenholme et al. 1968). O tamanho do DNAm pode variar de 14Kb a 42Kb dependendo da espécie, com exceção de cnidários do gênero *Hydra*, cujo DNAm é uma molécula linear com 8 Kb de tamanho (Warrior & Gall 1985). Em animais o DNAm tem evoluído muito mais rápido que o DNA nuclear (Brown et al. 1979). A molécula não possui mecanismos eficientes de reparo acumulando mais mutações que o DNA nuclear (Clayton et al. 1974) e, além disso, ocorre em um grande número de cópias por célula.

O pequeno tamanho deste genoma, a alta taxa de mutação comparada com o genoma nuclear faz do DNA mitocondrial um bom marcador em estudos filogenéticos entre espécies (Harrison 1989, Boore 1999, Rawlings et al. 2001, Yamazaki et al. 1997). Além de ser uma poderosa ferramenta no estudo de genética de populações (Lansman et al. 1981, Moritz et al. 1997, Simonsen et al. 1998, Avise et al. 1979, Brown & Simpson 1981, Ferris et al. 1983, Després et al. 1991, James et al. 1997). A história evolutiva de uma grande variedade de organismos tem sido explorada devido ao polimorfismo presente em regiões do DNAm de diferentes populações da mesma espécie (Avise 1986, Bermingham et al. 1998). Entretanto, recentes pesquisas têm suscitado a questão de que análises utilizando o genoma mitocondrial são mais precisas do que as baseadas somente em um gene mitocondrial (Whelan et al. 2001). Diante disso, a seqüência completa do DNAm vem aumentando em grande escala para vários organismos. Em pesquisa recente (novembro 2006) realizada no “Genbank” (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/), identificamos dez moluscos da classe Gastropoda com seqüências completas do DNAm depositadas, sendo que do gênero *Biomphalaria* somente o DNAm de *B. glabrata* está totalmente seqüenciado

1-4-1- Seqüenciamento do DNA mitocondrial de moluscos

Os moluscos possuem uma grande variação na organização dos genes mitocondriais (Boore & Brown, 1994a) e nas seqüências (Lecanidou et al. 1994),

quando comparado com outros grupos. O DNAm_t de moluscos é uma molécula circular, cujo o tamanho varia entre o grupo (Tabela 1.3).

Hoffman et al. (1992) publicaram a primeira seqüência completa do DNAm_t de um moluscos da espécie *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia) e verificaram que a organização de seus genes foi diferente do reportado para outros metazoários, além de possuir um número de nucleotídeos não codificantes incomum, não apresentar o gene para ATP8 no DNAm_t e ter um RNAt de metionina extra. Estas características despertaram o interesse de pesquisadores em estudar moluscos. O tamanho do DNAm_t reportado para *M. edulis* foi de 17,1Kb. Posteriormente, a seqüência completa foi obtida para moluscos *Katharina tunicata* (Mollusca: Polyplacophora) e gastrópodes das espécies *Euhadra herklostsi* (Gastropoda: Pulmonata), *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata) e *Albinaria coerulea* (Gastropoda: Pulmonata). Estes pulmonados compartilham um arranjo idêntico dos genes que é altamente divergente daquele encontrado em outros animais (Boore 1999).

Lecanidou et al. (1994) e Hatzoglou et al. (1995) também pontuam que os moluscos parecem ser a grande exceção entre os metazoários por apresentarem grande variação na organização dos genes. De fato, a organização dos genes de *M. edulis* e dos moluscos terrestres mostrou-se distinta. Kurabayashi & Ueshima (2000) seqüenciaram o DNAm_t do *Pupa strigosa* (Gastropoda: Opisthobranchia) cujo tamanho foi muito semelhante ao encontrado em espécies de moluscos pulmonados terrestre do gênero *Albinaria* e *Cepaea*. O arranjo dos genes mitocondriais foi idêntico aos do molusco pulmonado terrestre do gênero *Albinaria*, mas divergente do *Littorina saxatilis* (Gastropoda: Prosobranchia). A região não codificante é pequena com apenas 46 nucleotídeos, similar aos moluscos pulmonados terrestres.

A seqüência dos nucleotídeos do DNAm_t do molusco *Roboastra europaea* (Gastropoda: Opisthobranchia) foi determinada por Grande et al. 2002. A organização dos genes foi a mesma encontrada para outros moluscos Opisthobranchia e Pulmonata. A seqüência completa do DNAm_t de *B. glabrata* (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora) foi publicada em 2004 (DeJong et al. 2004). A ordem dos genes deste molusco foi muito similar com a de *Albinaria coerulea* (Gastropoda: Pulmonata Stylommatophora) concordando com a monofilia¹ dos gastrópodes pulmonados. Os autores acharam 11 seqüências identificadas pelos EST de *S. mansoni*. Maynard et al. (2005) seqüenciaram o DNAm_t de *Haliotis rubra* (Mollusca: Gastropoda), a ordem dos

¹Monofilia – A condição de um grupo que é monofilético

Tabela 1.3 - Tamanho do DNAm de molusco da classe Gastropoda

Espécie do molusco	Tamanho do DNAm (pb)	Referência
* <i>Euhadra herklostsi</i>	14.500	Yamazaki et al. (1997)
<i>Cepaea nemoralis</i>	14.100	Terrett et al. (1996)
* <i>Albinaria turrita</i>	14.500	Lecanidou et al. (1994)
<i>Albinaria coerulea</i>	14.130	Hatzoglou et al. (1995)
<i>Pupa strigosa</i>	14.189	Kurabayashi & Ueshima (2000)
<i>Roboastra europaea</i>	14.472	Grande et al. (2002)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	13.670	DeJong et al. (2004)
<i>Haliotis rubra</i>	16.907	Maynard et al. (2005)
<i>Aplysia californica</i>	14.117	Knudsen et al. (2006)
<i>Lophiotoma cerithiformis</i>	15.380	Bandyopadhyay et al. (2006)
<i>Lottia digitalis</i>	26.836	Simison et al. (2006)
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	15.264	Simison et al. (2006)

* as seqüências destes moluscos não foram depositados no GenBank

genes desse molusco foi idêntica ao de *Katharina tunicata* diferindo somente na posição de 3 RNAs. O genoma mitocondrial completo de *Aplysia californica* (Gastropoda: Opisthobranchia) foi seqüenciado, sendo que a ordem dos seus genes foi idêntico aos de outros Opisthobranchia e semelhante aos dos Pulmonata, já seqüenciados.

1-5- Uma hipótese inferindo a filogenia do filo Mollusca

O provável ancestral comum dos moluscos era pequeno (~1mm de comprimento) com uma superfície ventral achatada, com a qual se movimentava por deslizamento auxiliado por um conjunto de cílios (semelhante a um aplacoforo diminuto) (Brusca & Brusca 2007). A figura 1.7 reflete o paradigma atual sobre a evolução dos moluscos. Para facilitar a discussão, foram colocados números no cladograma¹ indicando o conjunto de sinapomorfia² que definem cada linhagem ou clado³. Sinapomorfia do Filo Mollusca: (1) - redução do celoma e desenvolvimento de um sistema circulatório hemocélico, aberto; (2) - parede dorsal do corpo forma um manto; (3) - produção de espícula calcária por glândulas da concha e sua deposição externa ao manto; (4) - músculo da parede ventral do corpo desenvolve-se originando um pé musculoso (ou precursor do pé); (5) - rádula; (6) - coração compartimentado com átrio e ventrículo separados. Sinapomorfia da classe Aplacophora (Chaetodermomorpha+ Neomeniomorpha) definindo o nó⁴ f: (56) - corpo vermiforme; (57) - pé reduzido; (58) - cavidade do manto posterior muito reduzida; (59) - gônadas desembocando na cavidade pericárdica, os gametas sendo transferidos para a cavidade do manto por gametodutos em forma de U; (60) - nefrídios ausentes. Sinapomorfias dos Chaetodermomorpha: (7) - espículas calcárias da parede do corpo formam escamas imbricadas; (8) - perda completa do pé. Sinapomorfias dos Neomeniomorpha: (9) - extremidade posterior do sistema reprodutor com espícula copulatórias; (10) ctenídios ausentes. Sinapomorfias dos moluscos com concha definindo o nó b: (11) - concentração das glândulas da concha difusas pelo manto em um ou mais glândulas distintas, para produzir uma concha calcária sólida, constituindo uma ou várias placas; (12) - desenvolvimento da sola rastejadora em um pé ventral grande e musculoso;

¹ Cladograma - diagrama indicando as relações de parentesco filogenético entre ramos terminais, que podem ser populações, espécies ou grupos monofiléticos supra-específicos.

² Sinapomorfia - compartilhamento da condição apomórfica de um caráter por um grupo, supostamente exclusiva dele.

³ Clado - representação gráfica de um grupo monofilético.

⁴ Nó - representa unidades taxonômicas

(13) - aumento na complexidade do trato digestivo com o desenvolvimento de uma grande massa de cecos digestivos; (14) - múltiplos músculos retratores do pé; (15) - membrana rádular móvel. Sinapomorfias da classe Polyplacophora: (16) - concha exclusiva com 7 a 8 placas (e com 7-8 regiões de glândulas da concha) com camada de articulação e estetos; (17)- múltiplas brânquias (talvez não homólogas aos ctenídios de outros moluscos); (18)-cinturão do manto expandido e altamente cuticularizado, o qual se funde com as placas da concha. Sinapomorfias do grupo irmão do Polyplacophora, definindo o nó *c*: (19) - tentáculos pré-orais; (20) - perda das espículas calcárias da parede do corpo; (21) - presença de uma e bem definida glândula da concha e presença de concha larval (protoconcha); (22) - concha de uma única peça (univalve) (nota: considera-se a concha bivalve como derivada da condição univalve); (23) - concha constituída de três camadas (perióstraco, camada prismática, camada nacarada); (24) - margens livres do manto dotadas de três pregas paralelas, cada uma especializada para funções específicas; (25) - estilete cristalino; (26) – estatocistos. Sinapomorfias da classe Monoplacophora: (27) – três-seis pares de ctenídios; (28) - três-sete pares de nefrídios; (29) - oito pares de músculos retratores do pé; (30) - dois pares de gônadas; (31) - coração com dois pares de átrios. Sinapomorfias da linhagem Gastropoda-Cephalopoda, definindo o nó *d*: (32) - vísceras concentradas dorsalmente; (33) - concha enrolada; (34) - cabeça bem definida e nitidamente demarcada; (35) - cavidade do manto restrita a região anal. Sinapomorfias da classe Gastropoda: (36) - torção e condições anatômicas dela decorrentes; (37) - maior concentração dos órgãos internos, formando a corcova visceral. Sinapomorfias da classe Cephalopoda: (38) - expansão do celoma e fechamento do sistema circulatório; (39) - concha septada; (40) - saco da tinta; (41) – sifúnculo; (42) - mandíbulas em forma de bico; (43) pé modificado em braços tentáculos préenseis e funil (=sifão); (44) - ampla fusão dos gânglios nervosos formando um cérebro. Sinapomorfias da linhagem Bivalvia-Scaphopoda definindo o nó *e*: (45) - redução da cabeça; (46) - descentralização do sistema nervoso; (47) - expansão da cavidade do manto para envolver o corpo por completo; (48) - modificação do pé para uma forma mais espatulada. Sinapomorfias da classe Bivalvia: (49) - concha bivalve e modificações do manto e ctenídios a ela associadas; (50) - perda da rádula; (51) – bisso; (52) - compressão lateral do corpo. Sinapomorfias da classe Scaphopoda: (53) - concha em forma de presa de elefante com extremidades abertas; (54) - perda dos ctenídios; (55) - captáculos.

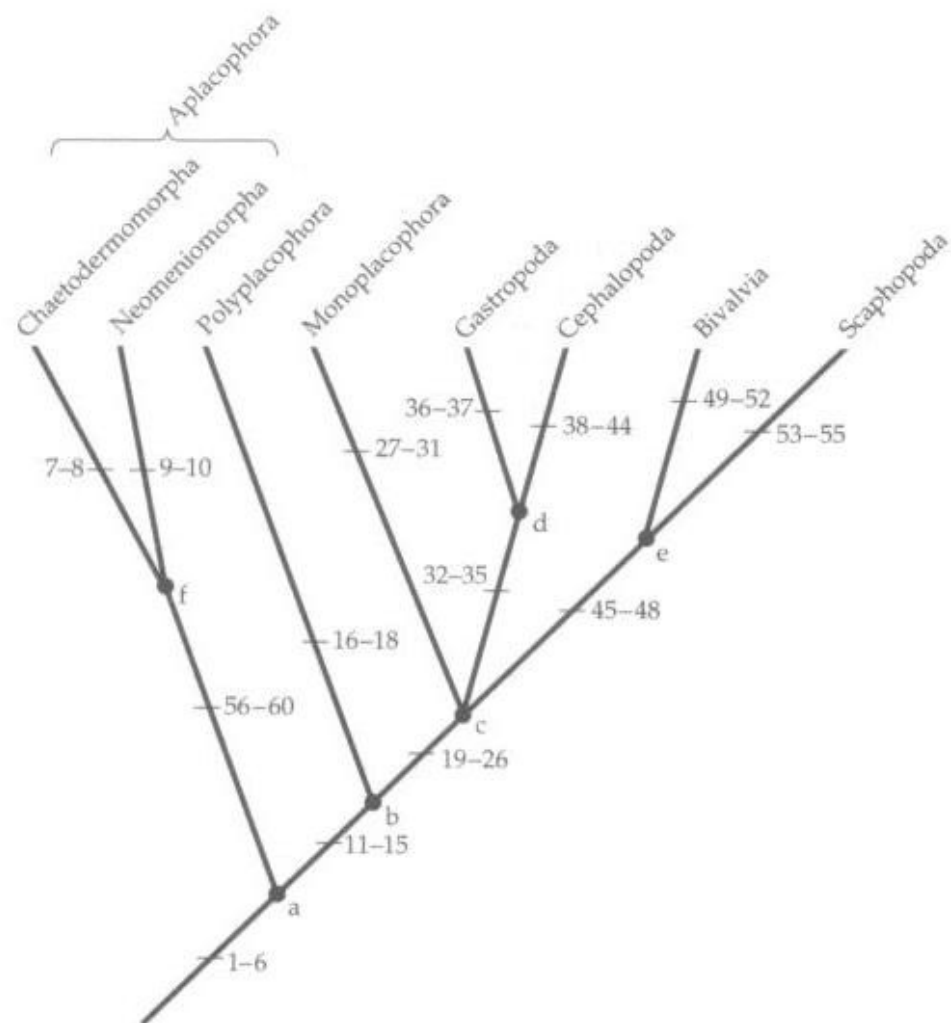


Figura 1.7 – Cladograma ilustrando uma das hipóteses sobre a filogenia¹ dos Mollusca. Os números indicam o conjunto de sinapomorfia que definem cada linhagem ou clado (Brusca & Brusca 2007).

A relação filogenética entre as diferentes classes do filo Mollusca não está bem estabelecida em parte devido à falta de dados moleculares e genômicos.

Para inferir a história filogenética dos organismos, o seqüenciamento de nucleotídeos é a técnica molecular mais informativa.

Knudsen et al. (2006) utilizando seqüências de proteínas do genoma mitocondrial, construíram as relações de parentescos entre alguns gêneros do filo Mollusca, utilizando o método de máxima verossimilhança. Estes autores demonstraram que pelo menos dois grandes grupos filogenéticos estão presentes na classe Gastropoda: os Euthyneura (Opisthobranchia e Pulmonata) e os Prosobranchia (Fig 1.8). Pode-se observar nesta árvore que o gênero *Biomphalaria* mostrou-se mais relacionado à classe

¹ - Filogenia – A história evolutiva de um grupo, incluindo as relações de parentesco entre suas espécies ancestrais em vários níveis e as espécies descendentes.

Opisthobranchia, do que a própria classe Pulmonata. Este dado revela a dificuldade e limitação para entender a filogenia dos Gastropoda, sugerindo que mais análises moleculares são necessárias, aumentando o número de representantes dos Pulmonata e de outros grupos dos moluscos Prosobranchia. Entre os Euthyneura existe uma alta conservação entre as ordens dos genes, indicando ser um grupo monofilético¹. Por outro lado, existe uma significativa variação na ordem dos genes entre os Euthyneura e os genomas mitocondriais dos Prosobranchia e as classes de moluscos Bivalvia, Scaphopoda e Cephalopoda.

As seqüências nucleotídicas de parte dos genes do rRNA16S e das subunidades do citocromo oxidase I do DNAm foram regiões de escolha em muitas análises de filogenia molecular de moluscos (DeJong et al. 2001, Jones et al. 2001 e Lydeard et al. 2002)

A comparação entre as estruturas secundárias da subunidade maior do DNAr mitocondrial também tem sido utilizada em análise filogenética de moluscos principalmente quando usado juntamente com caracteres morfológicos (Lydeard et al. 2000).

Comparação da ordem dos genes mitocondriais e de tRNAs podem ser de grande valor em estudos sobre história filogenética, particularmente em eventos onde seqüências de nucleotídeos e aminoácidos têm dificuldades em resolver (Boore & Brown 1994a, Boore 1999). Bandyopadhyay et al. 2006 estudando a filogenia de moluscos através de posição de RNAs sugeriram que a ordem dos genes do Gastropoda ancestral foi muito similar a dos *K. tunicata* e *O. vulgaris* e que os Gastropodas e os Cephalopodas são grupos irmãos. Estes autores confirmam que a ordem dos genes dos moluscos Pulmonata e Opisthobranchia, seqüenciados até no momento, é idêntica entre si, mas altamente divergente da ordem dos genes dos outros moluscos. O quadro geral que surge é que a ordem dos genes é relativamente conservada entre os Pulmonata e Opisthobranchia, diferentemente dos outros Gastropoda.

¹ – Monofilético - Grupo constituído de uma espécie ancestral e todos os seus descendentes

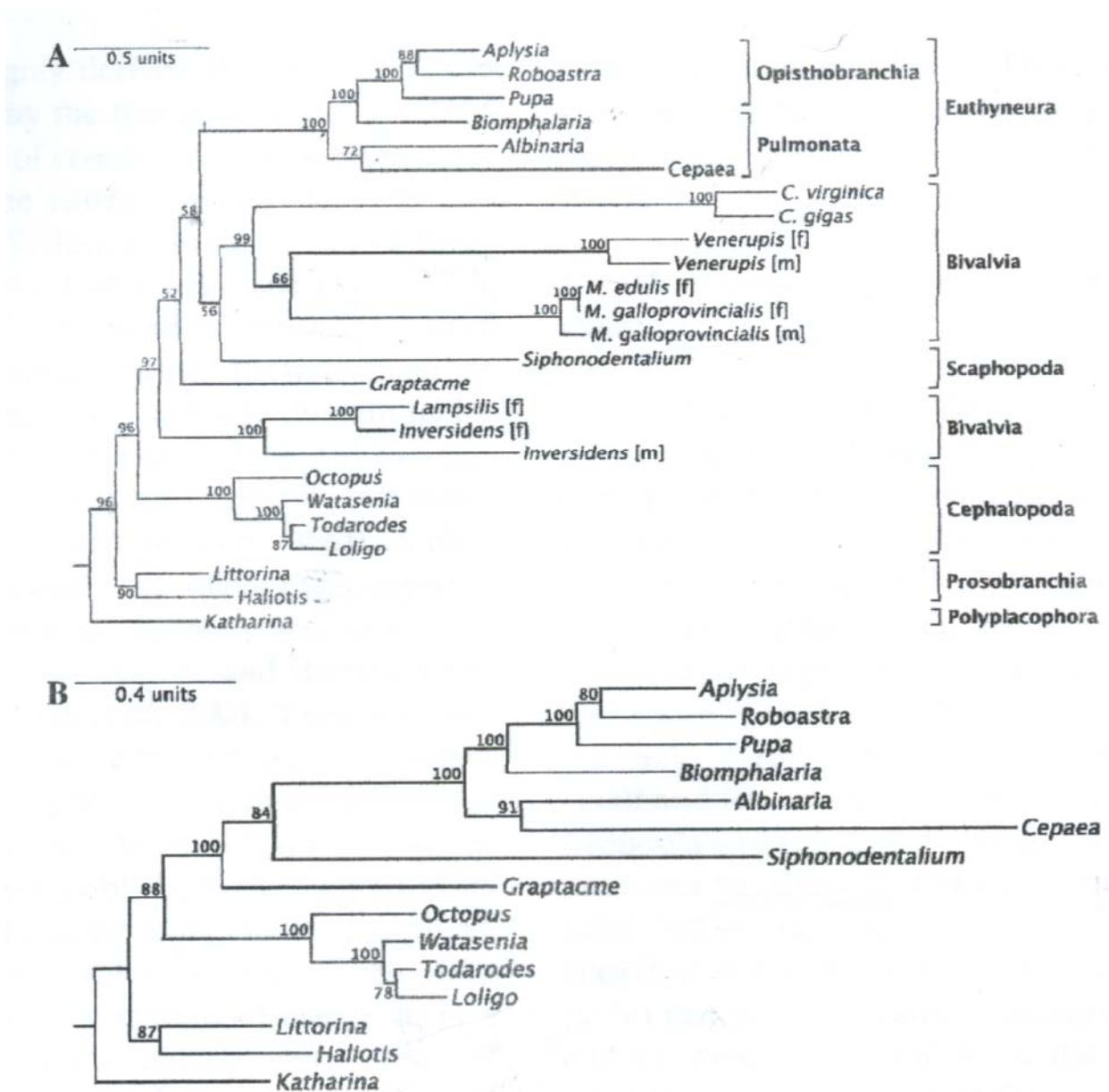


Figura 1.8 – Árvore filogenética do Filo Mollusca, baseada na seqüência de proteínas do genoma mitocondrial de alguns gêneros (Knudsen et al. 2006). A - Filogenia do Filo Mollusca. B – Filogenia do filo Mollusca sem os Bivalvia.

2 - JUSTIFICATIVA

O número de seqüências de DNA mitocondrial disponibilizado no GenBank tem aumentado nos últimos anos, sendo que já foram completamente seqüenciados o mtDNA de 11 espécies de Gastropoda. Dentro desta classe, no Brasil, encontra-se 10 espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria*. Até o momento, somente a *Biomphalaria glabrata*, teve sua seqüência completa depositada no GenBank.

O molusco *B. tenagophila* é a única espécie transmissora da esquistossomose mansoni em extensas áreas do Estado de São Paulo, como também é responsável por focos isolados nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio de Janeiro. Esta espécie possui populações suscetíveis à infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Paraense & Corrêa 1978), bem como população totalmente resistente ao parasito, como é o caso dos moluscos oriundos da Reserva Ecológica do Taim (RS), que será o foco de nosso estudo. Moluscos *B. tenagophila* desta população já foram desafiados por diferentes cepas de *S. mansoni* e número variável de miracídios, mostrando-se sempre resistentes à infecção (Santos et al. 1979, Bezerra et al. 2003, Martins-Souza et al. 2003 e Rosa et al. 2004, Rosa et al 2006).

Devido à escassez de dados sobre o genoma mitocondrial de moluscos do gênero *Biomphalaria* e considerando que este genoma pode ser usado como marcador molecular em estudos genéticos e evolutivos, o objetivo da presente tese foi seqüenciar e analisar o DNA mitocondrial de *B. tenagophila* da população do Taim. Esta população poderá ser utilizada como modelo de introdução do patrimônio genético da resistência em moluscos suscetíveis da mesma espécie, já que o caráter de resistência é dominante e será transmitido aos descendentes dos cruzamentos entre a população resistente e a suscetível. Além disso, com o genoma mitocondrial seqüenciado, poderemos desenhar iniciadores para estudar a herança do DNA mitocondrial de *B. tenagophila*, e ampliar os conhecimentos sobre as características deste DNA de mais uma espécie de molusco, o que tornará possível a aplicação de métodos mais robustos e realistas em análises genéticas (Moritz et al 1987), contribuindo para aprofundar os conhecimentos sobre a filogenia dos Pulmonata e dos Euthyneura.

3 - OBJETIVO GERAL

Seqüenciar o DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* originária da reserva ecológica do Taim

3-1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3-1-1- Amplificar partes das regiões citocromo b (Cytb); 12S do rDNA; citocromo oxidase I (COI); e 16S do rDNA utilizando iniciadores universais
- 3-1-2- Amplificar as regiões COI-16S, 16S-Cytb, Cytb-12S,12SL- COI do DNA mitocondrial de *B. tenagophila*
- 3-1-3- Clonar as regiões COI-16S, 16S-Cytb, Cytb-12S,12SL-COI do DNA do DNA mitocondrial de *B. tenagophila*
- 3-1-4- Seqüenciar os quatro clones a partir de “*primer walking*”
- 3-1-5- Anotar o conteúdo do genoma mitocondrial de *B. tenagophila*
- 3-1-6- Comparar o genoma mitocondrial de *B. tenagophila* e *B. glabrata*
- 3-1-7- Construir a estrutura secundária de RNAs de transferência de *B. tenagophila*.
- 3-1-8- Comparar a ordem gênica do DNA mitocondrial de *B. tenagophila* com a de *B. glabrata*
- 3-1-9- Comparar o genoma mitocondrial de *B. tenagophila* e de outros moluscos para estimar as relações filogenéticas entre os organismos do filo Mollusca utilizando diferentes métodos de inferência.

4 – METODOLOGIA

4.1 - Moluscos

Foi utilizado um exemplar de *B. tenagophila* proveniente da Reserva biológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil com 10mm de diâmetro, que foi identificado morfológicamente segundo Paraense (1975) e molecularmente (Barbosa, 2001). Essa população vem sendo mantida no moluscário “Lobato Paraense” do Instituto René Rachou/Fiocruz desde 2001.

No estudo de filogenia foram utilizadas seqüências de aminoácidos do DNAm de vários moluscos que estão citados na tabela 4.8. Para comparação do genoma mitocondrial foram utilizadas as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do molusco *B. glabrata*.

4.2- Extração de DNA

Como fonte de DNA total foi utilizado um fragmento da região cefalopodal do molusco *B. tenagophila* do Taim. Este fragmento foi incubado em solução tampão de extração (50mM Tris-HCl da GIBCO pH 8,0; 50 mM EDTA, 100mM NaCl , SDS 0,5%) junto com 20µg/mL de proteinase K por 12 horas a 37°C. O DNA foi extraído utilizando o kit Wizard[®] da Promega. O DNA foi utilizado como molde para a reação da cadeia da polimerase (PCR).

4.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do DNA mitocondrial foram utilizados iniciadores universais que amplificaram partes das regiões: citocromo b (Cytb) com aproximadamente 227pb; 12S do rDNA com aproximadamente 460pb; citocromo oxidase I (COI) com aproximadamente 695pb; e 16S do rDNA com aproximadamente 485pb. Estas regiões foram seqüenciadas diretamente de produtos amplificados pela PCR, após purificação com a enzima ExoSap (Amersham, Biosciences). Os iniciadores utilizados para amplificar estas quatro regiões estão descritos na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Iniciadores universais utilizados para amplificar regiões do DNA mitocondrial de *B. tenagophila*

Iniciador	Localização (gene)	Seqüências	Referências
LCO	COI	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer et al. 1994
HCO	COI	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer et al. 1994
16Sar	16S	5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	Palumbi 1996
16Sbr	16S	5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	Palumbi 1996
12Sai	12S	5'AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT 3'	Simon et al. 1990
12Sbi	12S	5'AAGAGCGACGGGCGATGTGT 3'	Simon et al. 1990
Cyb1	Cytb	5'AAAGGAAGAACTAAGCCTTTAGG 3'	Desenhado a partir de seqüência de <i>B. glabrata</i>
CB3	Cytb	5'GGCAAATAGGAARTATCATTC 3'	Kocher et al. 1989

Após obtenção das seqüências nucleotídicas foram desenhados iniciadores específicos, (Tabela 4.5) para amplificar os quatro fragmentos do DNA mitocondrial de *B. tenagophila* (Fig. 4.10). Foram utilizados os iniciadores COI2-16SL1 para amplificar o fragmento 16S-COI com tamanho de 2.200 pb; os iniciadores 16SL2-CybLR para amplificar o fragmento 16S-Cytb com tamanho de 4.500 pb; os iniciadores CybF-12SLR para amplificar o fragmento Cytb-12S com tamanho de 2.800 pb; os iniciadores 12SLF- COIR4 para amplificar o fragmento 12S-COI com tamanho de 4.500 pb. Desta maneira foi garantida a cobertura completa de todos os nucleotídeos que compõem o DNA mitocondrial.

Tabela 4.5 – Iniciadores desenhados a partir das seqüências nucleotídicas obtidas da primeira amplificação.

Iniciador	Localização (gene)	Seqüências
16SL1	16S	5'GCACAGTCAAGGTACTGCGGCCATTTAAAAAAAATATCACTGG
16SL2	16S	5'AATCTCAAATGTATCCTGCCAGTGATATTTTTTAAATGG
COIL2	COI	5'GGCCTGGTTGGAAGTGGGTTATCTTTACTTATTCGTTTAGAGC
COIR 4	COI	5'CCAAGCTCTAAACGAATAAGTAAAGATAACCCAGTTCCAACCAG
CybL F	Cytb	5'AAAGGAAGAACTAAGCCTTTAGGAGATTTAAACCATTTGG
CybLR	Cytb	5'TTAAATGGGATTTTTTCCAAATGGTTTAAATCTCCTAAAGG
12SLR	12S	5'ATAATTAATGAATTTCTTTGATTTTGTGCACACATTGCC
12SLF	12S	5'AAAGAAATTCATTAATTATATATTTTTTTAGTTACTTTTAAAGTCC

Para as reações de PCR foram utilizados em um volume final de 10 μ L, 1ng de DNA alvo, 5 pmoles de cada um dos iniciadores, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP- PROMEGA), 0,8 unidades de *Taq*DNA polimerase *High-fidelity* (Invitrogen) em um tampão de 10mM Tris - HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Após o preparo, cada reação foi coberta com aproximadamente 20 μ L de óleo mineral para evitar evaporação durante os ciclos de temperatura da PCR.

As amostras foram amplificadas em termocicladores da marca MJ *Research, Inc*; modelo PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*). O programa envolveu 35 ciclos. No primeiro ciclo a desnaturação foi feita a 95°C por 3 min, o anelamento a 50°C por 1 min e a extensão a 72°C por 30 s, seguido por 34 ciclos com a desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e a extensão a 72°C por 1 min, sendo que no último ciclo o tempo de extensão foi alterado para 7 min.

O programa utilizando os iniciadores da tabela 4.5 (PCR Longo – Cheng et al. 1994) envolveu 30 ciclos. No primeiro ciclo a desnaturação foi feita a 94°C por 1 min, o anelamento e extensão a 68°C por 15 min, seguido por 29 ciclos com a desnaturação a 98°C por 15 s e o anelamento e extensão a 68°C por 15 min.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e os fragmentos visualizados em transluminador com luz ultravioleta (UV).

4-4- Clonagem molecular dos produtos de PCR

Os fragmentos obtidos pela PCR foram clonados em diferentes plasmídeos de acordo com o seu tamanho: fragmento de 2.200pb foi clonado no TOPO TA cloning (Invitrogen - Life Technologies, Europa), de 2.800pb foi clonado no pGEM-T EASY (Promega) e por último os de 4.500pb no TOPO XL PCR cloning (Invitrogen- Life Technologies, Europa). O protocolo utilizado para a reação de ligação de cada plasmídeo foi o recomendado pelo fabricante, a partir daí cada fragmento foi denominado de “minipreps”.

Para facilitar o seqüenciamento, as “minipreps” contendo os fragmentos de 4.500pb foram digeridas com a enzima de restrição *Hind* III (7 μ L) e os produtos subclonados no plasmídeo pBIISK digerido com a enzima de restrição *Hind* III(1 μ L) adicionado de T4 ligase (1 μ L), tampão da T4 10x (2 μ L) e água (9 μ L). A reação permaneceu a 4°C durante 16 horas.

Bactérias *Escherichia coli* cepa TOPO 10 F' foram preparadas para transformação química de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al (1989). Estas células foram transformadas com os plasmídeos recombinantes da seguinte forma: 50 μ L de células competentes foram incubados, a 4°C com 5 μ L do produto da ligação durante 30 min. Em seguida, as células foram incubadas a 42°C por 45 s e colocadas no gelo por 2 min. Após este tempo foi adicionado às amostras 1mL de meio LB líquido (10g de peptona de caseína, 5g de Select yeast extract, 5g de NaCl, qsp 1000mL de água milli-q, pH- 7,5) e estas foram incubadas a 37°C sobre agitação por 1h. Em seguida as células foram centrifugadas a 13.000g (Eppendorf Mini Spin, Alemanha) por 30 s, foram descartados 800 μ L de LB do sobrenadante e o sedimento ressuspensionado no restante do meio. Após esta etapa, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (meio LB líquido acrescentado de 7,5 g de Select agar), 100 μ g/mL de ampicilina, 0,1 mM de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosida) (Ge Healthcare-Amersham, Europa), e 20 mg/mL Xgal (5-bromo-4cloro-3indolil-B-D-galactopiranosida) (Invitrogen, USA). Somente as células transformadas com os plasmídeos pCR-XL-TOPO (Invitrogen - Life Technologies, Europa) foram espalhadas

em meio LB, com kanamicina (50µg/mL) . Para verificar a presença do inserto nas colônias que cresceram, foi feita a PCR dessas colônias utilizando os iniciadores M13F e M13R de acordo com o vetor utilizado na clonagem (Tabela 4.6). Os produtos da PCR das colônias foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1% (Promega), corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados através de luz ultravioleta (UV) e as imagens digitalizadas pelo aparelho *Eagle Eye II* (Stratagene). Os clones foram considerados positivos quando o fragmento encontrado apresentava tamanho compatível com o produto da PCR correspondente.

As colônias que apresentavam o inserto foram transferidas para tubos de 50mL contendo 5mL de meio LB líquido acrescido de 100µg/mL de ampicilina ou kanamicina e incubadas sob agitação a 220 rpm por 16 horas a 37°C. A extração dos plasmídeos foi realizada por meio do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA, USA). O protocolo utilizado foi fornecido pelo fabricante. As minipreps foram armazenadas a -20°C.

Tabela 4.6 - Seqüências dos iniciadores M13F e M13R

Vetor	M13F	M13R
TOPO TA	5'GTAAAACGACGGCCAG	5'CAGGAAACAGCTATGAC
TOPO XL	5'GTAAAACGACGGCCAG	5'CAGGAAACAGCTATGAC
pGEM-T EASY	5'GTTTCCAGTCACGAC	5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC
PBIISK	5'GTTTCCAGTCACGAC	5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC

4-5 - Seqüenciamento automático

Para obter as seqüências dos nucleotídeos dos clones positivos utilizou-se o Kit *DYEnamic ET dye terminator* (Amersham Pharmacia Biotech, Madison-USA) com dideoxynucleotídeos marcados com fluorocromos (chamados de *dye terminators*). Esta técnica de seqüenciamento é mais rápida, mais barata e mais segura do que o seqüenciamento manual. Nas reações de seqüenciamento foram utilizados 200ng de DNA, 5 pmoles dos iniciadores e 4µL do Kit *DYEnamic ET dye terminator* com volume final de 10µL. No primeiro momento foram utilizados iniciadores universais (M13F e M13R) complementares às regiões dos plasmídeos. Em seguida foram desenhados iniciadores internos “*primer walking*” (Tabela 4.7 e Fig. 4.9) com base nas seqüências obtidas para dar continuidade ao seqüenciamento do clone que continham insertos

maiores de 1.000pb. Alguns iniciadores não apresentaram bons resultados no seqüenciamento, sendo então utilizados para amplificar, a partir do DNA total extraído, fragmentos menores do que os clones originais e seqüenciados. O programa utilizado no termociclador (Mastercycler, Eppendorf) para amplificar as reações de seqüência foi: 25 ciclos de 95°C para desnaturação por 20 s, 50°C para o anelamento por 15 s e 60°C para extensão por 1 min.

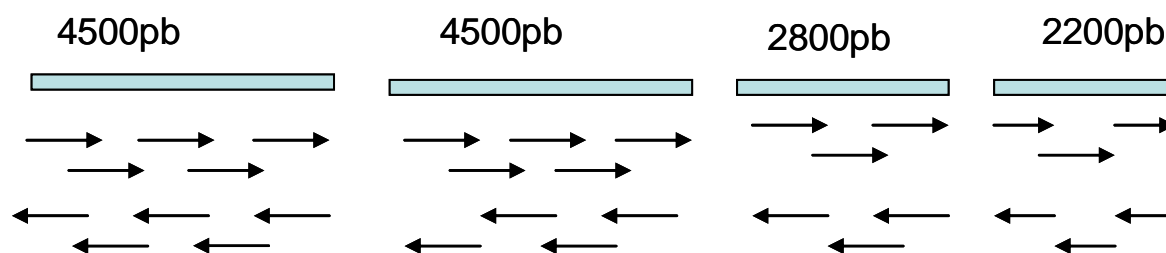


Figura 4.9 – Desenho esquemático de “*primer walking*”

Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados por precipitação de acordo com o seguinte protocolo: a cada poço da placa de seqüenciamento foi adicionado 1µL de acetato de amônio e 30µL de etanol 96% (Merck, Brasil). A placa foi agitada no vórtex rapidamente e incubada por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 45 min a 7°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min a 7°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, a placa invertida sobre um papel absorvente e centrifugada por 1 s a 900rpm. As amostras foram ressuspensas em 10µL de tampão de amostra (Amersham Biosciences – UK limited, England) agitada no vórtex por 2 min. Para obter as seqüências nucleotídicas dos clones, as placas foram colocadas no seqüenciador automático MEGABACE 500 DNA Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech). De cada região, três seqüências de no mínimo dois clones foram seqüenciadas e alinhadas, para garantir a confiabilidade da seqüência final.

Tabela 4.7 – Sequências dos iniciadores internos (“*primer walking*”) utilizados nas reações de sequenciamento

Iniciador	Localização (gene)	Sequências
COI (F) 1	COI	5' TATCTAGAATAGTTGAAGG
16S (R) 1	16S	5' TAATCTCAAATGTATTCTGC
COI (6)	COI	5' GGCGAGGTATTCCTGATAA
12S w1(R)	ATP6	5' GGATGTATAAGAATTTATTC
COIw 2 (F) a	COI	5' GCAGTTCCTACAGGAAT
Cybw F 1	Cytb	5' CCAGAAAATTTCACAAATAGC
COILw4f	COI	5' ATCAGGAATACCTCGCCG
12S Lw2r	ATP6	5' GGGCTCCTCTTCCACTTG
16SLw3r	16S	5' CTGGGCAGAATACATTTG
CybLW4F	ND2	5' AACACATATTCAACCTGAATG
ATP6	ATP8	5' CAATTAAGACCAACATCTGG
CybW5F	Cytb	5' CCAAATATGGAATAGCAG
ND5R	ND5	5' GCTTTATCTACTTTAAGAC
ND5W1F	ND5	5' ATAACAATAAAAACATCACC
16SW5F	COI	5' TTTTATTATAATATGTATCAG
CybLW6F	Cytb	5' GATTAGCAGTCCATGTAC
COIW5F	COI	5' TATTTTTTTATTACACTTGG
16SWF	16S	5' AATTTTGTTGGGCGACAAG
GLN	tRNA	5' TTTTACTTGGAAAGTAACT
COII	COII	5' CTTTGTTAAATAAGTACTGA
ND2	ND2	5' GTAAAAATAATCTTATAAATATAAA
ND4R (3)	ND4	5' GAATTAATCCATAACCACCA
ND4F(1)	ND4	5' GCATTTTTCTGGTTTTTATTA
ND5R(2)	ND5	5' CCAAATGATATTAATAATAC
ND5F(2)	ND5	5' CTGGTAAATTTATATGAAGTC
ND4R(3)	ND4	5' GTAAATATAATATATATCAG
ND2R(2)	ND2	5' CCAATTATCCCAACTTCTA
ND5R(3)	ND5	5' GATTTAAAAAAAATTATTGCTT
ND4L(1)	ND4L	5' CCAATAGCTGCTTCACAC
ND1R2ult	ND1	5' CACGTCATCGATTTGATT
ND1F2ult	ND1	5' CTATAATAGGTGCAACAAC
ND1R3ult	ND1	5' AATTTTATATGTTGTTGCAC
ND5F4ult	ND5	5' CTATTAACAAAATCCCCTA
ND5R4ult	ND5	5' TAACATTTAAGTTGAATCAT
ND5rR5ult	ND5	5' AACATTAGTTACTGCTGGAA
ND5F5ult	ND5	5' ATCTTCTAAAAGGATACTGAG
ND5R6ult	ND5	5' TGTGAATTTTCGTTTTCTAT
ND5F6ult	ND5	5' TAGAAAACGAAAATTCACAT
ND6R1ult	ND6	5' TTGGTGGGTTGTTAGTATTA
ProF1ult	tRNA ^{Pro}	5' AACTCCCAAAGTTAATGTT
ValF1ult	tRNA ^{Val}	5' AAATCTAGACCTTCTTATTG
ND4F1ul	ND4	5' AAATGCAATTATTGGGTAATA
ND3F1ult	ND3	5' CGGATTTGAACCTTTAAGT
12sR1ult	12S	5' GGTATGACCGCGACTG
COIIF1ult	COII	5' TATAACAATCGAAGTCTAGG
AspF1ult	tRNA ^{Asp}	5' CTTTGATTTGACAAACCAATAT
CybR2ul	Cytb	5' TTTGTTGGATTTCTTGTTTT
CybF2ult	Cytb	5' CACGTCCAACATGAAAAT
CybR3ult	Cytb	5' TGCTAATGGAGCAAGTTT
060 R	COII	5' AATGTTTCAGAAATTTGTGG
ND1F(1)	ND1	5' GGAATCATTAAAAAAGTAACT
COIIIR(2)	COIII	5' CCTCAGCAATTGAAAATATA
COIIIF(1)	COIII	5' CCATTATTAATACTTCGGT
ND1R(2)	ND5	5' GTGTTTTACTTTTTTCTTGAC

4-6- Análise do genoma e filogenomas

Após o seqüenciamento, realizado por seqüenciadores automáticos, é preciso reunir os diferentes fragmentos e reposicioná-los na ordem em que figuram no genoma em estudo. Neste ponto, começa o chamado processo de anotação do genoma. A anotação é a localização e identificação numa seqüência de milhões de bases nitrogenadas (muitas das quais sem nenhuma função), que se associam para comandar a síntese de proteínas - os chamados genes. Um exame atento dessas seqüências pode então levar à determinação da função de cada um dos genes e ao entendimento do significado biológico do genoma.

As seqüências obtidas foram analisadas no programa phred-Phrap-Consed. (Ewing et al. 1998, Ewing & Green 1998, Gordon et al. 1998). O programa Phred consiste na leitura binária dos cromatogramas gerados pelo seqüenciador, transformando-os em formato texto (Ewing et al. 1998). Foi considerado para o agrupamento das seqüências o valor de qualidade de phred ≥ 20 . Regiões de vetores de clonagem foram filtradas pelo programa Cross-match (Ewing et al. 1998), que comparou a seqüência analisada com arquivos de seqüências de vetores. Neste arquivo de vetores foram depositadas as seqüências dos vetores utilizados neste estudo: TOPO TA, TOPO XL, pBIISK e pGem.

O programa Phrap (Phragment Assembly Program) é responsável pela montagem dos fragmentos de DNA seqüenciados em regiões contíguas (Ewing & Green 1998). Levando em consideração a seqüência de bases e os valores de qualidades calculados pelo phred, o programa Phrap (Ewing et al. 1998) gera uma seqüência consenso, com base na sobreposição de seqüências. As seqüências que não apresentaram homologia¹ com nenhuma outra, são reunidas em um arquivo chamado seqüências únicas ou *singlets*. O programa Phrap (Phragment Assembly Program) foi utilizado para a construção da seqüência do contíguo através de um mosaico de partes das seqüências de alta qualidade e a utilização de informações da qualidade dos dados computados internamente (Ewing & Green 1998). A visualização e edição das seqüências geradas após a montagem foram visualizadas e analisadas no editor de seqüências Consed (Gordon et al. 1998).

¹- Homologia – característica derivada de um ancestral comum compartilhada por duas ou mais espécies.

Em seguida realizou-se uma busca de similaridade¹ no GenBank através do programa BLASTn (NCBI), para determinação da identidade² das seqüências nucleotídicas. Foi utilizado o programa Clustal W (Thompson et al. 1994), ferramenta gratuita disponível na internet, para fazer o alinhamento múltiplo dos nucleotídeos e aminoácidos encontrados no DNA mitocondrial de *B. tenagophila*, *B. glabrata* e dos outros moluscos (Tabela 4.8). Este programa busca otimizar o alinhamento múltiplo pela pesquisa de alinhamento que minimize globalmente as diferenças entre as seqüências, colocando *gaps*³. A inspeção visual do alinhamento das seqüências é necessária para garantir um alinhamento razoável.

Para a visualização e anotação das seqüências do DNA mitocondrial utilizou-se o programa Artemis (Rutherford et al. 2000). A comparação das proteínas codificadas no genoma mitocondrial de *B. tenagophila* foi realizada utilizando o código genético de invertebrados (Tabela 4.9). Os RNAs foram identificados pelo tRNA-Scan e pelo alinhamento com o seu correspondente em *B. glabrata*. Os alinhamentos dos nucleotídeos e dos aminoácidos foram visualizados utilizando o programa Jalview (Clamp et al. 2004). A identidade das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foi calculada utilizando o programa *Alistat*, que pertence a um pacote de programas chamado *Squid*.

Os métodos de máxima parcimônia (MP), agrupamento de vizinhos “*neighbor-joining*” (NJ) e máxima verossimilhança – “*maximum likelihood*” (ML) foram utilizados para a reconstrução filogenética. O programa PHYML (Guidon & Gascuel 2003) foi utilizado para a reconstrução filogenética, alinhando seqüências de aminoácidos das proteínas (com exceção do ATP8). O método utilizado foi máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) utilizando o modelo JTT (Whelan & Goldman 2001) de evolução de aminoácidos com taxa de variação gama, incluindo *bootstrap* de 100 replicações. As análises da máxima parcimônia (MP) e agrupamento de vizinhos (NJ), também utilizaram seqüências de aminoácidos das proteínas (com exceção do ATP8) e foram feitas usando algoritmos provenientes do “*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*” preparado para o Macintosh (PAUP v.4.0 Swofford 2002).

¹Similaridade - semelhança

²Identidade – número de nucleotídeos ou aminoácidos que são idênticos entre as seqüências alinhadas.

³Gaps – número de espaçamentos que foram incluídos para possibilitar um melhor alinhamento

As análises de MP utilizaram buscas heurísticas pelo modo de rearranjo dos ramos. Este método envolve a mudança de ramos para novas partes da árvore produzindo novas topologias. Nesta análise todos os caracteres eram sem raiz e sem peso, os espaços (*gaps*) introduzidos foram tratados como erros de dados, e as restrições topológicas não foram aplicadas. Para testar o grau de confiabilidade das árvores filogenéticas foi utilizado o método de *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 100 replicações.

Para a análise de distância, a árvore de NJ (Saitou & Nei 1987) foi gerada utilizando a distância padrão: diferença média de caracter, taxa de variação entre os sítios, incluindo *bootstrap* de 100 replicações.

Em todas as análises, valores de “*bootstrap*”, considerados significativos (robusto) encontravam-se acima de 95%, independentemente da repetibilidade. Valores moderados (70-94%) ou fracos (51-69%), se repetidos com vários marcadores diferentes, foram considerados como indicativos de suporte para o clado (Hillis & Bull, 1993, Li 1997, Chen et al. 2003, Schneider 2003).

Nas análises filogenéticas foi escolhido como grupo externo o molusco *Katarina tunicata* (Polyplacophora), pelo fato de possuir características morfológicas distintas dos outros moluscos estudados e pertencer a um grupo parafilético.

Na tabela 4.8 podem ser vistos os moluscos utilizados no estudo de filogenia.

Tabela 4.8 - Moluscos utilizados no estudo filogenético

Molusco	GenBank	Sigla	Referência
<i>Lampsilis ornata</i>	AY365193	Lam orn	Serb & Lydeard (2003)
<i>Haliotis rubra</i>	AY588938	Hal rub	Maynard et al. (2005)
<i>Lophiotoma cerithiformis</i>	DQ284754	Lop cer	Bandyopadhyay et al. (2006)
<i>Nautilus macromphalus</i>	DQ472026	Nau mac	Boore (2006)
<i>Lottia digitalis</i>	DQ238599	Lot dig	Simison et al. (2006)
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	DQ238598	Ily obs	Simison et al. (2006)
<i>Aplysia californica</i>	AY569552	Apl cal	Knudsen et al. (2006)
<i>Octopus ocellatus</i>	AB240156	Oct oce	Akasaki et al. (2006)
<i>Crassostrea virginica</i>	AY905542	Cra vir	Milbury & Gaffney (2005)
<i>Mytilus trossulus</i>	AY823625	Myt tro	Breton et al. (2006)
<i>Watasenia scintillans</i>	AB240152	Wat sci	Akasaki et al. (2006)
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	AB240154	Sep les	Akasaki et al. (2006)
<i>Sepia officinalis</i>	AB240155	Sep off	Akasaki et al. (2006)
<i>Roboastra europaea</i>	AY083457	Rob eur	Grande et al. (2002)
<i>Placopecten magellanicus</i>	DQ088274	Pla mag	La Roche et al. (1990)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AY497292	Myt gal	Cao et al. (2004)
<i>Albinaria coerulea</i>	X83390	Alb coe	Hatzoglou et al. (1995)
<i>Todarodes pacificus</i>	AB158364	Tod pac	Yokobori et al. (2004)
<i>Octopus vulgaris</i>	AB158363	Oct vul	Yokobori et al. (2004)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	AY380531	Bio gla	DeJong et al. (2004)
<i>Graptacme eborea</i>	AY484748	Gra ebo	Boore et al. (2004)
<i>Mytilus edulis</i>	AY484747	Myt edu	Hoffmann et al. (1992)
<i>Siphonodentalium lobatum</i>	AY342055	Sip lob	Dreyer & Steiner (2004)
<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226	Cra gig	Kim et al. (1999 não publicado)
<i>Cepaea nemoralis</i>	U23045	Cep nem	Yamazaki et al. (1997)
<i>Loligo bleekeri</i>	AB029616	Lol ble	Tomita et al. (1998)
<i>Pupa strigosa</i>	AB028237	Pup str	Kurabayashi & Ueshima (2000)
<i>Katharina tunicata</i>	U09810	Kat tun	Boore (1994b)

Tabela 4.9- Código genético mitocondrial de invertebrados

TTT F Phe	TTC F Phe	TTA L Leu	TTG L Leu
TCT S Ser	TCC S Ser	TCA S Ser	TCG S Ser
TAT Y Tyr	TAC Y Tyr	TAA * Ter	TAG * Ter
TGT C Cys	TGC C Cys	TGA W Trp	TGG W Trp
CTT L Leu	CTC L Leu	CTA L Leu	CTG L Leu
CCT P Pro	CCC P Pro	CCA P Pro	CCG P Pro
CAT H His	CAC H His	CAA Q Gln	CAG Q Gln
CGT R Arg	CGC R Arg	CGA R Arg	CGG R Arg
ATT I Ile	ATC I Ile	ATA M Met	ATG M Met
ACT T Thr	ACC T Thr	ACA T Thr	ACG T Thr
AAT N Asn	AAC N Asn	AAA K Lys	AAG K Lys
AGT S Ser	AGC S Ser	AGA S Ser	AGG S Ser
GTT V Val	GTC V Val	GTA V Val	GTG V Val
GCT A Ala	GCC A Ala	GCA A Ala	GCG A Ala
GAT D Asp	GAC D Asp	GAA E Glu	GAG E Glu
GGT G Gly	GGC G Gly	GGA G Gly	GGG G Gly

* códon de parada

4-7- Estratégia utilizada para o seqüenciamento do DNAm t de *B. tenagophila*.

Para seqüenciar o DNAm t de *B. tenagophila* foi extraído o DNA total de parte da região cefalopodal de um molusco, previamente identificado por técnicas morfológicas e moleculares. Iniciadores universais foram utilizados para amplificar as regiões citocromo b (Cytb); 12S do rDNA; citocromo oxidase I (COI); e 16S do rDNA que foram clonadas e seqüenciadas. Diante dessas seqüências, iniciadores específicos foram desenhados para amplificar quatro grandes fragmentos do DNA mitocondrial de *B. tenagophila*: 1) COI-16S, 2) 16S-Cytb, 3) Cytb-12S, 4) 12S-COI (Fig. 1.9). Desta maneira foi garantida a cobertura completa do DNA mitocondrial. Estes quatro fragmentos foram clonados e sequenciados. No primeiro momento foram utilizados iniciadores universais complementares a regiões dos plasmídeos, e no segundo momento foram desenhados iniciadores internos “*primer walking*” com base nas seqüências obtidas para continuar o seqüenciamento do clone que continham insertos grandes.

As seqüências obtidas foram submetidas ao programa phred-Phrap-Consed que no final forneceu apenas uma seqüência consenso. Este consenso foi submetido ao programa Artemis onde foram feitas as anotações do genoma. O DNAm t de *B. tenagophila* foi comparado com o DNAm t de *B. glabrata* e de outros moluscos. Foram desenhadas algumas estruturas secundárias dos RNAs de transferências, e foi inferido a filogenia do filo Mollusca utilizando três métodos diferentes.

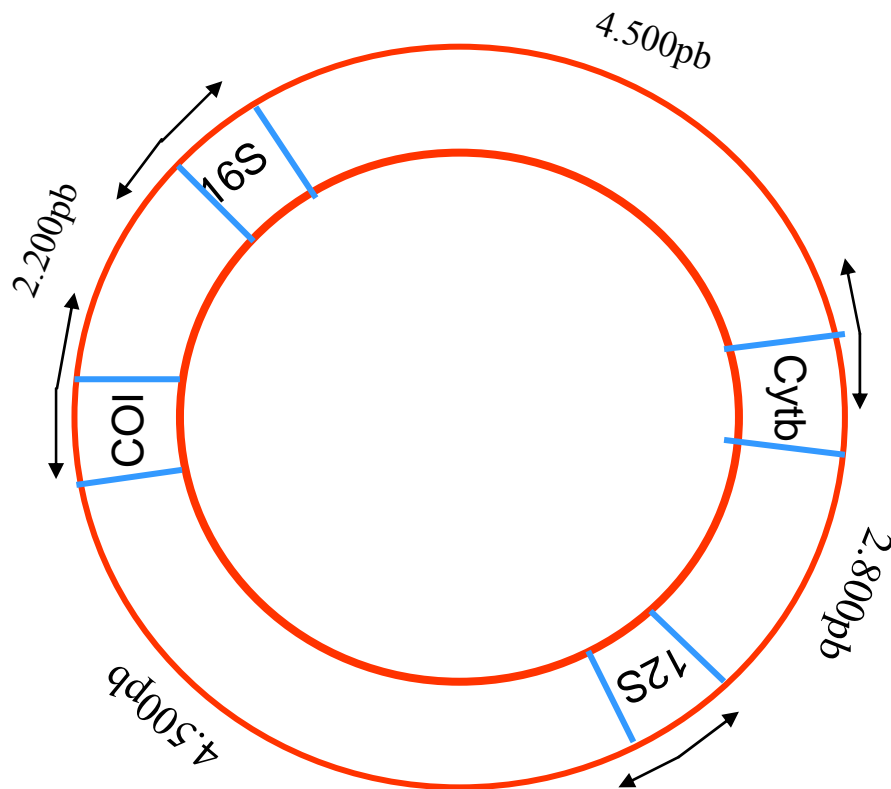


Figura 4.10 - Desenho esquemático do DNAm_t mostrando as regiões, onde foram desenhados os iniciadores e as setas indicam o sentido dos iniciadores.

4-8 – Submissão ao GenBank

As seqüências obtidas neste trabalho foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob o número de acesso EF433576.

5 – RESULTADOS

5-1- Reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do COI

Os iniciadores universais LCO *foward* e HCO *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar uma região do COI do DNAm de *B. tenagophila*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 695pb. A figura 5.11 mostra a seqüência encontrada e a região onde foram desenhados os iniciadores específicos COIL2 *foward* e COIR4 *reverse*.

```

AAGATAGTGGGTACATTGTACATAGCCTTTGGCAATTAGATGTGGCCTGGTT
GGAACTGGGTTATCTTTACTTATTCGTTTAGAGCTTGGTACAACCTTTGTTTT
GATAGATGAACATTTTTATAATGTCATTGTTACGGCTCATGCTTTTATTATAA
TTTTTTTTATGGTTATACCTATAATAATTGGTGGATTTGGAAATTGAATAGTT
CCTTTATTAATTGGTGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGAATAAATAATATATC
ATTTTGATTACTTCCTCCTTCATTTATTTTATTATTAGTATCTAGAATAGTTG
AAGGTGGTGTAGGAACAGGTTGAACAGTTTATCCTCCTTTAAGTGGGCCTAT
TGCTCATGGAGGAGCATCTGTCGATTTAGCGATTTTTTTCTTTACATTTGGCA
GGAATAAGTTCAATTTTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACAATTTTAATAT
ACGAGCTCCTGGAATTACAATAGAACGTTTATCATTATTTGTTTGATCTGTA
TTAATTACAGCATTTTTACTTTTTATTATCTTTACCTGTTTTAGCTGGTGCTATT
ACAATACTTTTTAACTGATCGAAATTTTAATACTAGATTTTTGACCCTGTCAG
GAGGAGGTGATCCTATTCTATATCAACATTCGTTTGATTGCTGGGGAACGGG
GGGGGGGGGGG

```

Figura 5.11 - Seqüência parcial da região COI do DNA mt de *B. tenagophila*. Nesta figura está representada a seqüência nucleotídica do fragmento do DNAm de *B. tenagophila* amplificado com os iniciadores universais LCO e HCO. Em vermelho está representada a região onde foi desenhado o iniciador específico COIL2 *foward* e em verde a região onde foi desenhado o iniciador específico COIR4 *reverse*. A região sublinhada é a região onde os dois iniciadores se sobrepõem e as setas indicam a direção dos iniciadores *forward* (→) e *reverse* (←).

5-2- Reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do 16S

Os iniciadores universais 16Sar *foward* e 16Sbr *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar parte da região do 16S do DNAm de *B. tenagophila*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 485pb. A figura 5.12 mostra a seqüência nucleotídica encontrada e a região onde foram desenhados os iniciadores específicos 16SL1 *reverse*, 16SL2 *foward*.

GGGGCCNCGCCTGTTTATCAAAAACATAGTTTGAGGAAATAATCTCAAATG
TATCCTGCCAGTGATATTTTTTTAAATGGCCGCAGTACCTTGACTGTGCTA
 AGGTAGCATAATCAATTGGCTTCTAATTAGAGTCTAGAATGAAAGGAATTA
 TGAGGTAATTCTGTCTTAAAAGATTTTTTTTTAATTTATTTAAATGATGAAAA
 TATCATTTTTTAGAAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAGTTTAATTTTTTAAT
 TTTGTTGGGGCGACAAGTAAACATTTTGAACCTTACTAAATAATTTAATCGA
 TTTATAATAAGGATAAAAAAACTACCTTAGGGATAACAGCATTATTTTTTA
 TATGATTGTGACCTCGATGTTTGGACTAGGAACCTTATGGCTAGCCGTCAAA
 AAAGCAATTTGTTCTGTTCGAACAATATTATCCTACGTGATCTGAGTTCAGA
 CCGGGACCCCCCCCCC

Figura 5.12 - Sequência parcial da região 16S do DNA mt de *B. tenagophila*. Nessa figura está representada a sequência nucleotídica do fragmento do DNAm de *B. tenagophila* amplificado com os iniciadores universais 16Sar e 16Sbr. Em vermelho está representada a região onde foi desenhado o iniciador específico 16SL2 e em verde a região onde foi desenhado o iniciador específico 16SL1. A região sublinhada é a região onde os dois iniciadores se sobrepõem e as setas indicam a direção dos iniciadores *forward* (→) e *reverse* (←).

5-3- Reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do Cytb

O iniciador universal CB3 *reverse* e o iniciador desenhado a partir da sequência do citocromo B de *B. glabrata*, Cyb1 *foward*, foram utilizados na PCR para amplificar parte do Cytb do DNAm de *B. tenagophila*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 227pb. A figura 5.13 mostra a sequência encontrada e o local onde foram desenhados os iniciadores específicos CybLF *foward*, CybLR *reverse*

AAAGGAAGAACTAAGCCTTAGGAGATTTAAACCATTGGAAAAATCCCA
 TTTAATCCTTATTTACTTGAAAAGATTTGTTGGATTCTATGTTTTAATAG
 TTTTGTGTTTATTGTGTATTTTTTTCCTAATGCATTAGGGGATCCAGAA
 AATTTACAATAGCTAATTTAAAGTTACACCAACACATATTCAACCTGAAT
 GATATTCCTATTTGCCA

Figura 5.13 - Sequência parcial da região Cytb do DNA mt de *B. tenagophila*. Nesta figura está representada a sequência nucleotídica do fragmento do DNAm de *B. tenagophila* amplificado com os iniciadores universais CB3 e Cyb1. Em vermelho está representada a região onde foi desenhado o iniciador específico CybLF e em verde a região onde foi desenhado o iniciador específico CybR. A região sublinhada é a região onde os dois iniciadores se sobrepõem e as setas indicam a direção dos iniciadores *forward* (→) e *reverse* (←).

5-4- Reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do 12S

Os iniciadores universais 12Sai *forward* e 12Sbi *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar parte da região 12S do DNAmT de *B. tenagophila*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 460 pb. A figura 5.14 mostra a seqüência nucleotídica encontrada e o local onde foram desenhados os iniciadores específicos 12SLR, 12SLF

```

AAGAGCGAC → GGGCAATGTGTGCACAAAATCAAAGAAATTCATTAATTATAT
ATTTTTAGTTACTTTTAAGT ← CATCTTAAGTGAATTTTTATTTTCAAACACT
GAAAAAAGTAATATTGTAACCTTAAGACTTAAACATATGCTACACT
ATGACCTGTTATGTATTAATATTAATAATTGATTTCTCCTTAAGGGAAAACA
CAACGGCAATATATAAGCTATTAGCTTTAAGCTGATGACACTTGAGGGTAT
CAATCTATCTGGTAACGTTCCCTAAAGTTCTGATCTTTACCGCCACTAATTT
CCAAGTTCTANATATTATTCCTATTTTAGTGCTTAGNATTAATTGACTGTGTT
CTAAANATAATAGGGTATCTAATCCTAGTTTAAGGAGCGAATTCGCAGCAC
ACTGGCGGCCGTATTAACGATCGGGCTCGTACCAGCTGGTATC

```

Figura 5.14 - Seqüência parcial da região 12S do DNA mt de *B. tenagophila*. Nessa figura está representada o fragmento do DNAmT de *B. tenagophila* amplificada com os iniciadores universais 12Sai e 12Sbi. Em vermelho está representada a região onde foi desenhado o iniciador específico 12SLR e em verde a região onde foi desenhado o iniciador específico 12SLF. A região sublinhada é a região onde os dois iniciadores se sobrepõem e as setas indicam a direção dos iniciadores *forward* (→) e *reverse* (←).

5-5- Reação em cadeia da polimerase (PCR) dos 4 fragmentos do DNA mitocondrial

Os iniciadores específicos 16SL1, 16SL2, COIL2, COIR4, CybLF, CybLR, 12SLR, 12SLF utilizados na PCR, amplificaram quatro fragmentos do DNA mitocondrial de *B. tenagophila* (ver figura 4.10 a estratégia utilizada). Os iniciadores CybF-12SLR amplificaram um fragmento de 2.800pb correspondente a região do Cytb - 12S (Fig. 5.15 canaleta 2); os iniciadores 12SLF-COIR4 amplificaram um fragmento de 4.500pb correspondente a região 12S-COI (Fig. 5.15 canaleta 3); os iniciadores COI2-16SL1 amplificaram um fragmento de 2.200pb correspondente a região COI-16S (Fig. 5.15 canaleta 4); os iniciadores 16SL2-CybLR amplificaram um fragmento de 4.500pb correspondente a região 16S-Cytb (Fig. 5.15 canaleta 5). A amplificação desses 4 fragmentos garantiu a cobertura completa do DNA mitocondrial. Estes quatro fragmentos foram clonados e seqüenciados conforme o tamanho.

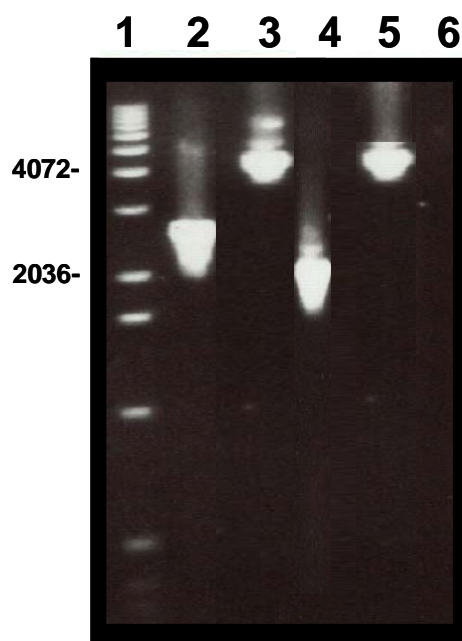


Figura. 5.15 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo os quatro fragmentos do DNA mitocondrial de *B. tenagophila* amplificados pela PCR, com iniciadores específicos CybF-12SLR, 12SLF-COIR4, COI2-16SL1, 16SL2-CybLR, respectivamente: canaleta 1- padrão de peso molecular 1Kb; canaleta 2- região Cytb-12S; canaleta 3 – região 12S - COI; canaleta 4 - região COI-16s; canaleta 5- região 16S-Cytb; canaleta 6 – controle negativo.

5-6- PCR de colônia dos fragmentos clonados

5-6-1- Região COI-16S

A figura 5.16 mostra a PCR das colônias que foram transformadas com os plasmídeos contendo o inserto da região COI-16S. Esta PCR foi amplificada com os iniciadores universais M13F e M13R do Kit TOPO TA. Nesta figura podemos observar que nem todas as colônias continham o inserto. Dez colônias (canaletas 2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 17, 19, 22) estavam positivas, ou seja, apresentavam o fragmento de 2.200pb esperado.

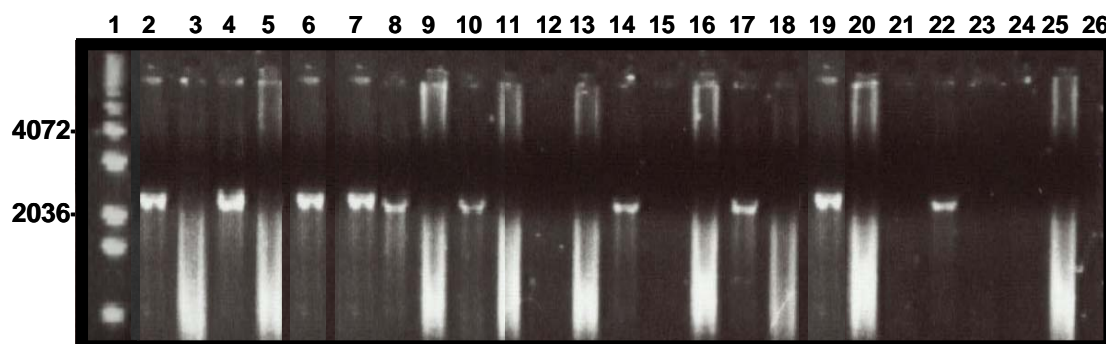


Figura 5.16 – PCR de colônia - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação pela PCR de colônias, utilizando iniciadores M13F e M13R, identificando a colônia com o inserto. Canaleta 1- padrão de peso molecular 1Kb; canaletas 2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 17, 19, 22 - colônias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto COI-16S. As demais canaletas correspondem às colônias transformadas, porém sem o plasmídeo com o inserto.

5-6-2- Região 16S-Cytb

A figura 5.17 mostra o PCR das colônias que foram transformadas com os plasmídeos contendo o inserto da região 16S-Cytb. Este PCR foi amplificado com os iniciadores universais M13F e M13R do Kit TOPO XL. Nesta figura podemos observar que nem todas as colônias continham o inserto. Somente sete colônias (canaletas 3, 5, 8, 10, 15, 18, 23) estavam positivas, ou seja, apresentavam o fragmento de 4.500pb esperados.

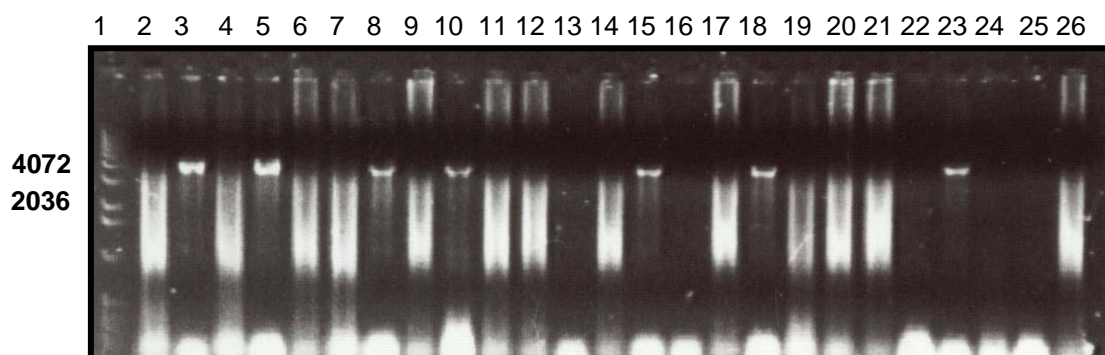


Figura 5.17– PCR de colônia. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação de colônias pela PCR utilizando iniciadores M13F e M13R, identificando a colônia com o inserto. Canaleta 1- padrão de peso molecular 1Kb; canaletas 3, 5, 8, 10, 15, 18, 23 – colônias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto 16S-Cytb. As demais canaletas correspondem às colônias transformadas, porém sem plasmídeo com o inserto.

5-6-3- Região Cytb-12S

A figura 5.18 mostra a PCR das colônias que foram transformadas com os plasmídeos contendo o inserto da região Cytb-12S. Esta PCR foi amplificada com os iniciadores universais M13F e M13R do Kit pGEM. Nesta figura podemos observar que nem todas as colônias continham o inserto. Doze colônias (canaletas 2, 3, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 24) estavam positivas, ou seja, apresentavam o fragmento de 2.800pb esperados.

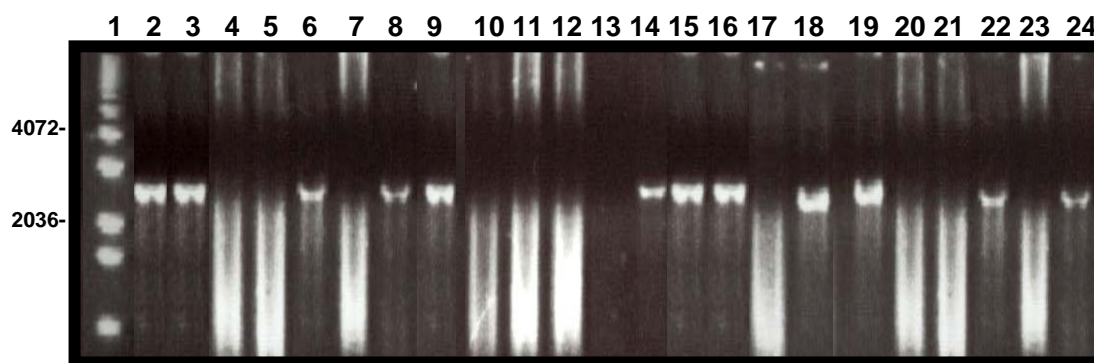


Figura 5.18 – PCR de colônia. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação de colônias pela PCR utilizando iniciadores M13F e M13R, identificando a colônia com o inserto. Canaleta 1- padrão de peso molecular 1Kb; canaletas 2, 3, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 24 colônias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto Cytb-12S. As demais canaletas correspondem as colônias transformadas, porém sem o plasmídeo com o inserto.

5-6-4- Região 12S-COI

A figura 5.19 mostra o PCR das colônias que foram transformadas com os plasmídeos contendo o inserto da região 12S-COI. Este PCR foi amplificado com os iniciadores universais M13F e M13R do Kit TOPO XL. Nesta figura podemos observar que nem todas as colônias continham o inserto. Dez colônias (canaletas 2, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 22, 24, 25) estavam positivas, ou seja, apresentavam o fragmento de 4500pb esperados.

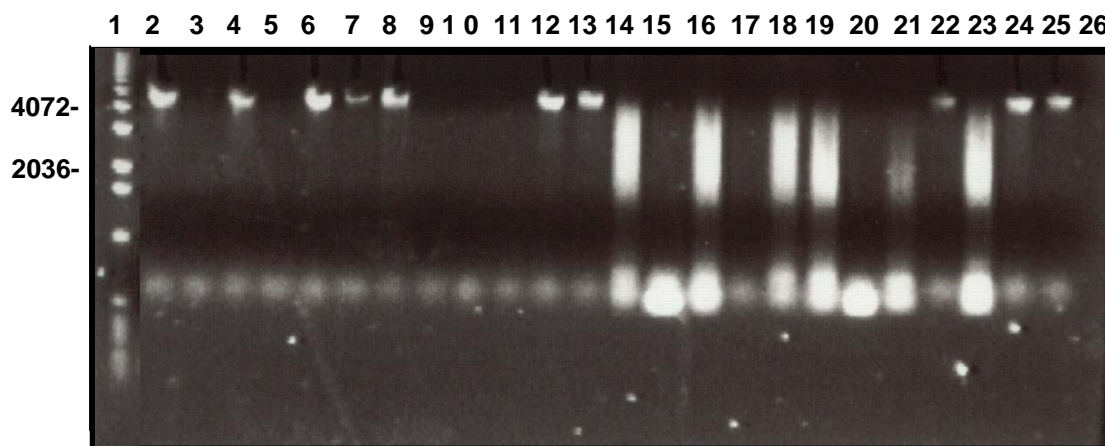


Figura 5.19 – PCR de colônia. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação de colônias pela PCR utilizando iniciadores M13F e M13R, identificando a colônia com o inserto. Canaleta 1 - padrão de peso molecular 1Kb; canaletas 2, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 22, 24, 25 – colônias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto 12S-COI. As demais canaletas correspondem às colônias transformadas, porém sem plasmídeo com o inserto.

5-7-Conteúdo do mtDNA

O DNAm_t de *B. tenagophila* foi totalmente seqüenciado e caracterizado. O tamanho do genoma encontrado foi de 13.722 pb. Este genoma codificou dois RNAr, 13 genes para proteína e 22 RNAt. O conteúdo de AT encontrado foi de 75,78%.

No DNAm_t foram encontradas 9 regiões não codificadoras, que variaram entre 1 a 54 pb, totalizando 110 pb (Tabela 5.10). As maiores regiões não codificadoras localizaram-se entre os genes NAD1 e NAD4L com 54pb e entre COIII e RNAt^{lle} com 42 pb.

Tabela 5.10 – Regiões não codificadoras no DNA mitocondrial de *B. tenagophila*

Regiões	Tamanho (pb)
NAD1/NAD4L	54
Cytb/RNAt ^{Asp}	3
RNAt ^{Cys} /RNAt ^{Phe}	4
RNAt ^{Leu} /ATP8	1
ATP8/RNAt ^{Asn}	1
RNAt ^{Ser} /NAD4	2
COIII/RNAt ^{Ile}	42
RNAt ^{Ile} /NAD2	1
RNAt ^{Ala} /RNAt ^{Pro}	2
TOTAL	110

Foram encontradas 19 regiões de sobreposição no DNAm_t de *B. tenagophila*. A tabela 5.11 mostra estas regiões. A maior sobreposição foi encontrada entre os genes NAD4L e Cytb com um total de 29 pb.

Tabela 5.11 – Regiões de sobreposição de nucleotídeos no DNA mitocondrial de *B. tenagophila*

Regiões	Tamanho (pb)
NAD5/NAD1	17
NAD4L/Cytb	29
COII/RNAt ^{Tyr}	16
RNAt ^{Tyr} /RNAt ^{Trp}	3
RNAt ^{Trp} /RNAt ^{Gly}	1
RNAt ^{Gly} /RNAt ^{His}	5
RNAt ^{Gln} /RNAt ^{Leu}	10
RNAt ^{Arg} /RNAt ^{Glu}	20
RNAt ^{Glu} /12S	6
RNAt ^{Met} /NAD3	6
NAD3/RNAt ^{Ser}	1
RNAt ^{Ser} /RNAt ^{Ser}	5
NAD4/RNAt ^{Thr}	1
RNAt ^{Thr} /COIII	12
NAD2/RNAt ^{Lys}	7
RNAt ^{Lys} /COI	6
16S/RNAt ^{Leu}	2
RNAt ^{Leu} /RNAt ^{Ala}	5
RNAt ^{Pro} /NAD6	23
TOTAL	175

Entre os genes ND6, ND5, ND1, ND4I, Cytb, não foi encontrado nenhum RNAt. Entre os genes Cytb, e COII foram encontrados os RNAts para Asp, Cys e Phe, entre o COII e ATP8 foram encontrados 6 RNAts (Tyr, Trp, Gly, His, Gln, Leu), entre o ATP8 e ATP6 foi encontrado o RNAt^{Asn}, entre o ATP6 e RNAr 12S foram encontrados 2 RNAts (Arg e Glu), entre RNAr 12S e o NAD3 foi encontrado o RNAt^{Met} entre o NAD3 e o NAD4 foram encontrados 2 RNAt para Ser, entre o NAD4 e COIII foi encontrado o RNAt^{Thr}, entre COIII e o NAD2 foi encontrado o RNAt^{Ile},

entre o NAD2 e COI o RNAt^{Lys}, entre o COI e o RNAr 16S o RNAt^{Val}, e entre o RNAr 16S e o NAD6 foram encontrados 3 RNAs (Leu, Ala, Pro).

5-7-1- Genes para proteínas

Os genes encontrados no genoma mitocondrial que codificam proteínas foram analisados com base no código genético mitocondrial de invertebrados (Tabela 4.9). A maioria dos genes que codificaram as proteínas estava na fita *plus* (NAD5, NAD1, NAD4L, Cytb, COII, NAD4, NAD2, COI, NAD6). Os genes que codificaram as proteínas ATP6, ATP8, NAD3 e COIII foram encontrados na fita *minus*.

Foram encontrados quatro códons de iniciação codificados pelo DNAm de *B. tenagophila*, sendo eles: ATT (em cinco proteínas), ATA (cinco), ATG (duas) e TTG (uma). O primeiro codifica para o aminoácido isoleucina, os dois seguintes para metionina e o último para leucina de acordo com o código genético mitocondrial de invertebrados. Entretanto, todos estes códons foram considerados codificantes da metionina como produto final na proteína (Wolstenholme, 1992).

Os códons de parada foram TAA (em 6 proteínas) e TAG (duas) que são os descritos para genes mitocondriais (Wolstenholme, 1992). Códons de parada incompletos foram encontrados em cinco proteínas.

Nos alinhamentos abaixo cada aminoácido está representado por uma cor.

5-7-1-1- ATP F0 sintase subunidade 6 (ATP6)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 213. Esta proteína apresentou o mesmo tamanho do ATP6 de *B. glabrata*. O grau de identidade dos aminoácidos foi de 87%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATT (isoleucina) e o de parada foi incompleto (T--), sendo completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína ATP6 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.20).

ATP6-Bt	1	MFSDLFSSLDGCMSTIYSWSTTLILLLLFYNKTFIYSTNSSLIKSLIPLGQ	50
ATP6-Bg	1	MFTDLFSSLDGCMSTYSWMTTLILLSLIYFNKTFMYSSNITLVKSLIPLGQ	50
ATP6-Bt	51	GNKKIILPFGLEIINIFFILINMNLGLTFFTYSMTSSLWYVSSMALIMWT	100
ATP6-Bg	51	GNKKIMPLGLEIINIFFMMINMNLGLTFFTYSMTSSLWYASSLALIMWM	100
ATP6-Bt	101	LLLIISGYFYSFKKSLAHLVPSGAPLPLVPFLIIIEESISILIRPLTLTVRL	150
ATP6-Bg	101	LLLIISGYFYSFKKSLAHLVPSGAPMVLVPFLIIIEESISIMIRPLTLTVRL	150
ATP6-Bt	151	IANISAGHIVLSLIANVLTSLNFSSTMSSVLLISVGYNMFVVFVCFIQAYI	200
ATP6-Bg	151	IANISAGHIVLSLIANVLTSLNFSSTMSSVLLISVGYNMFVVFVCFIQAYI	200
ATP6-Bt	201	FTLLLKLYSAEHP	213
ATP6-Bg	201	FTLLLKLYSAEHP	213

Figura 5.20 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína ATP6 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*

5-7-1-2- ATP F0 sintase subunidade 8 (ATP8)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 35. Esta proteína apresentou o mesmo tamanho do ATP8 de *B. glabrata*. O grau de identidade entre as seqüências de *B. tenagophila* e *B. glabrata* foi de 60%. O códon de iniciação para essa proteína foi ATT (isoleucina), e o de parada foi incompleto (T--), sendo completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. A figura 5.21 mostra o alinhamento dos aminoácidos da proteína ATP8 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

ATP8-Bt	1	MPQLSPTSGIMIFFMVITTCFLLYILFSMKENSPV	35
ATP8-Bg	1	MPQLSPTSGLSIFFNIVIICCIYITFSMMENKPL	35

Figura 5.21 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína ATP8 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-3- Citocromo c oxidase subunidade I (COI)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 508. A proteína COI de *B. tenagophila* apresentou o mesmo tamanho de *B. glabrata*. A identidade entre as duas seqüências foi de 98%. O tamanho do alinhamento desta proteína para as duas espécies foi de 508 aa. O códon de iniciação foi TTG (leucina) e de parada foi TAG. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína COI de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.22).

<i>COI-Bt</i>	1	LRWLFSTNHKDIGTLYMVFGIWCGIVGTGLSLLIRLELGTTIVLMDEHFY	50
<i>COI-Bg</i>	1	MRWLFSTNHKDIGTLYMIFGIWCGIVGTGLSLLIRLELGTTIVLMDEHFY	50
<i>COI-Bt</i>	51	NVIVTAHAFIMIEFFMVMPPMIGGFGNWMVPLLI GAPDMSFPRMNNMSFWL	100
<i>COI-Bg</i>	51	NVVVTAHAFIMIEFFMVMPPMIGGFGNWMVPLLI GAPDMSFPRMNNMSFWL	100
<i>COI-Bt</i>	101	LPPSFILLLVSSMVEGGVGTGWTVYPPLSGPIAHGGASVDLAIFSLHLAG	150
<i>COI-Bg</i>	101	LPPSFILLLVSSMVEGGVGTGWTVYPPLSGPIAHGGASVDLAIFSLHLAG	150
<i>COI-Bt</i>	151	MSSILGAINFITTTIFNMRAPGITMERLSLFVWSVLITAFLLLLSLPVLAG	200
<i>COI-Bg</i>	151	MSSILGAINFITTTIFNMRAPGITMERLSLFVWSVLVTAFAFFFFLSPVLAG	200
<i>COI-Bt</i>	201	AITMLLTDRNFENTSFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYIILIPGFGMV	250
<i>COI-Bg</i>	201	AITMLLTDRNFENTSFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYIILIPGFGMV	250
<i>COI-Bt</i>	251	SHILSNFVSKPAEFTLGMIIYAMVSI GILGFIVWAHMF TVGMDVDTRAYF	300
<i>COI-Bg</i>	251	SHILSNFVSKPAEFTLGMIIYAMVSI GILGFIVWAHMF TVGMDVDTRAYF	300
<i>COI-Bt</i>	301	TAATMIIAVPTGIKIFSWLMTLYGSHCHFSASMYWVLGFIFLFTLGGLTG	350
<i>COI-Bg</i>	301	TAATMIIAVPTGIKIFSWLMTLYGSHCYFSASMYWVLGFIFLFTLGGLTG	350
<i>COI-Bt</i>	351	IVLSNSSLDIMLHDYYVVAHFHYVLSMGAVFALFAGFVYWFVPMTGYSL	400
<i>COI-Bg</i>	351	IVLSNSSLDIMLHDYYVVAHFHYVLSMGAVFALFAGFVYWFVPMTGYSL	400
<i>COI-Bt</i>	401	HEGAAKVVHFFIMFFAVNLTFFPQHFLGLSGMPRRYVDYPTYYKWNQISS	450
<i>COI-Bg</i>	401	HEGAAKAHFFIMFFAVNLTFFPQHFLGLSGMPRRYVDYPTYYKWNQISS	450
<i>COI-Bt</i>	451	FGSLFSIIVAVIMEVFIVWEAFIAERS SLESVAPNMSREWDLFLPPDFHSN	500
<i>COI-Bg</i>	451	FGSLFSIIVAVIMEVFIVWEAFIAERS SLESVAPNMSREWDLFLPPDFHSN	500
<i>COI-Bt</i>	501	SETSVAPF	508
<i>COI-Bg</i>	501	SETSVAPF	508

Figura 5.22-Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína COI de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-4- Citocromo c oxidase subunidade II (COII)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 222. Esta proteína apresentou tamanho diferente entre as duas espécies de moluscos: *B. tenagophila* (222 aa) e *B. glabrata* (215 aa). Esta diferença está concentrada no meio da proteína. A identidade entre as duas seqüências das duas espécies foi de 92%. O códon de iniciação para essa proteína foi ATA (metionina), e o de parada foi TAA. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína COII de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.23).

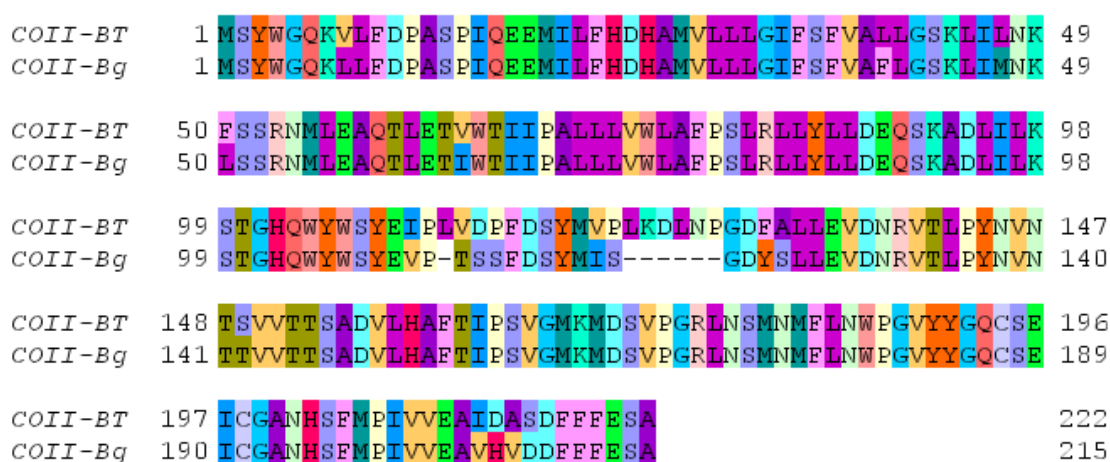


Figura 5.23 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína COII de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-5- Citocromo c oxidase subunidade III (COIII)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 262. Esta proteína apresentou o mesmo tamanho do COIII de *B. glabrata*. O grau de identidade dos aminoácidos foi de 94%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATA (metionina) e o de parada foi incompleto (T--), sendo completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína COIII de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.24).

<i>COIII-Bt</i>	1	M R Q P F H L V E F S P W P L L I S F S I F S M P I G L I N Y I R S S S I T L L V L G I F T T A	48
<i>COIII-Bg</i>	1	M R Q P F H L V E F S P W P L L I S F S I F S M P I G L I N Y I R S S N I S L L I L G L F T T A	48
<i>COIII-Bt</i>	49	L I S F L W W R D V V R E S T Y Q G F H N K M V I K G L K I G V M L F I L S E V C F F F A F F W	96
<i>COIII-Bg</i>	49	L I S F L W W R D V V R E S T Y Q G F H N K L V M K G L K I G I M L F I L S E V C F F F A F F W	96
<i>COIII-Bt</i>	97	A Y F H S S L A P S V E I G A H W P P T G I F T L Q A F Q V P L L N T S V L L L S G V S I T W V	144
<i>COIII-Bg</i>	97	A Y F H S S L A P S V E I G A I W P P T G I F T L Q A F Q V P L L N T S V L L L S G V S I T W V	144
<i>COIII-Bt</i>	145	H H S I E E G K Y K S A I Q G L F I T V L L G L Y F L F L Q Y G E Y S E T M F S I A D G I Y G S	192
<i>COIII-Bg</i>	145	H H S I E E G N Y K S A M Q G L F I T I L L G L Y F L M L Q Y G E Y S E T M F S I S D G I Y G S	192
<i>COIII-Bt</i>	193	C F F M A T G F H G T H V A V G A T F L I V C F F R L K N E H F N K N H H V G F L A A A W Y W H	240
<i>COIII-Bg</i>	193	C L F M A T G F H G T H V A V G A T F L I V C F F R L K N E H F N K N H H I G F L A A A W Y W H	240
<i>COIII-Bt</i>	241	F V D V V W L F L Y V S I Y W W G S F Q N S	262
<i>COIII-Bg</i>	241	F V D V V W L F L Y V S I Y W W G S F Q N S	262

Figura 5.24 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína COIII de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-6- Citocromo B (Cytb)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 366. A proteína Cytb de *B. tenagophila* apresentou o mesmo tamanho de *B. glabrata*. A identidade entre as duas seqüências de aminoácido foi de 91%. O tamanho do alinhamento desta proteína para as duas espécies foi de 366 aa. O códon de iniciação para esta proteína foi ATT (isoleucina) e o de parada foi TAA. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína Cytb de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.25).

<i>Cytb-Bt</i>	1	MLLKIRELINLPSPLSISISIWVNGGSILGLLLMQILTGFFLSMHYTSDI	49
<i>Cytb-Bg</i>	1	MLLKIRDSVNLPSPLSISISIWVNGGSILGVLLVMQILTGFFLSMHYTSDI	49
<i>Cytb-Bt</i>	50	SNTFYSSIIHIMRDVSMGWFRFLHANGASFFFLEFIYFHVGRGLIYQSYL	98
<i>Cytb-Bg</i>	50	SNTFYSSIVHIMRDVPMGWFRFLHANGASFFFLEFIYFHVGRGLIYQSYL	98
<i>Cytb-Bt</i>	99	TQPRTWVGVSIILLVSMATAFLGYVLPWSQMSFWGATVITNLMISAIPYF	147
<i>Cytb-Bg</i>	99	TQPRTWVGVVTILLVSMATAFLGYVLPWGQMSFWGATVITNLMISAIPYF	147
<i>Cytb-Bt</i>	148	GPSLIVEWIWGSFSVSGQPTLTRFFSLHFILPFLIMGLSAVHLIFLHEKGS	196
<i>Cytb-Bg</i>	148	GPSLIVEWIWGSFSVSGQPTLTRFFSLHFILPFLIMGLSAVHLIFLHEKGS	196
<i>Cytb-Bt</i>	197	TNPLGDLNHLEKIPFNPFYFTWKDFVGFVLMVVFVCFIVFFFPNALGDPE	245
<i>Cytb-Bg</i>	197	TKPLGDLNHLGKIPFNPFYFTWKDFVGFVLFVFFFCFIVFFFPNMLGDPE	245
<i>Cytb-Bt</i>	246	NFTMANFKVTPTHIQPEWYFLFAYAILRSIPSKLGGVIALAMSIIVILYF	294
<i>Cytb-Bg</i>	246	NFSMANFKVTPTHIQPEWYFLFAYAILRSIPSKLGGVIALAMSIIFILYF	294
<i>Cytb-Bt</i>	295	LPVGMFKYSVSGSFCFIFQLTYWILLISVFILLTWLGACPIEKPYMSLAV	343
<i>Cytb-Bg</i>	295	LPVGMENYSFSGSFCFAFQLIYWNLVAVFILLTWLGACPIEPPYMTLAV	343
<i>Cytb-Bt</i>	344	PCTILYFFLFVLLIIEPIFWKKI	366
<i>Cytb-Bg</i>	344	PCTILYFFLFIMLITIPFWKKI	366

Figura 5.25 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína *Cytb* de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-7- NADH 1 desidrogenase unidade 1 (NAD1)

A proteína NAD1 de *B. tenagophila* apresentou um tamanho de 296 aa. Esta proteína foi menor que o de *B. glabrata* em 11 aa. A identidade entre as duas seqüências de aminoácidos foi de 90%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATG (metionina), e o de parada foi TAA. Abaixo encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD1 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.26).

<i>NAD1-Bt</i>	1	MLWITSIFETIICVLVAVAFYTLYERKILGYIQIRKGPKSVGFWGILQPF	49
<i>NAD1-Bg</i>	1	MLWVTSIFETIIVCVLIAVAFYTLYERKILGYIQIRKGPKSVGFWGILQPF	49
<i>NAD1-Bt</i>	50	ADAVKLFNLNELIFPIKSNKILYVVAPIMGFSLALFLWLIYPSKFRVKFI	98
<i>NAD1-Bg</i>	50	ADAVKLFNLNELIIPMKSNKVLFMMAPIILGFSLALFLWVIYPSVYCIKFI	98
<i>NAD1-Bt</i>	99	SFSLLIIFLCISAINVYCILLAGWTSNSKYAFLGALRASAQTISYEVSMI	147
<i>NAD1-Bg</i>	99	SFSLLIIFLCISAINVYCILLAGWTSNSKYAFLGALRASAQTISYEVSMI	147
<i>NAD1-Bt</i>	148	FILIVPVLLILEINMETALEGYSVTFMLIPLLLVWFTTTLAETNRPFD	196
<i>NAD1-Bg</i>	148	FILIVPVLLIFETNMEMALKGYSVMFLMFPLLLVWFTTTLAETNRPFD	196
<i>NAD1-Bt</i>	197	FAEGESELVSGFNVEYGGGLFALLFLAEYANIIFMSTMSMIWFIYINNS	245
<i>NAD1-Bg</i>	197	FAEGESELVSGFNVEYGGGLFALLFLAEYANIIFMSTMSMIWFFYNNNS	245
<i>NAD1-Bt</i>	246	IIFVLGITLFFSTFYLFARGAYPRHRFDLLMMLCWKSFLPFGICMLFLCL	294
<i>NAD1-Bg</i>	246	FLFVLGIVFFSTFYLFARGAYPRHRYDLLMMLCWKSFLPFGICMLFLCL	294
<i>NAD1-Bt</i>	295	LW-----	296
<i>NAD1-Bg</i>	295	LCWLIMMYFNYIF	307

Figura 5.26 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD1 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-8- NADH 2 desidrogenase subunidade 2 (NAD2)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 303. Esta proteína diferiu no tamanho de *B. glabrata* em um aa, sendo a diferença encontrada no meio da proteína. A identidade entre as duas seqüências de aminoácidos foi de 83%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATT (isoleucina) e o de parada foi incompleto (T--), sendo completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD2 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.27).

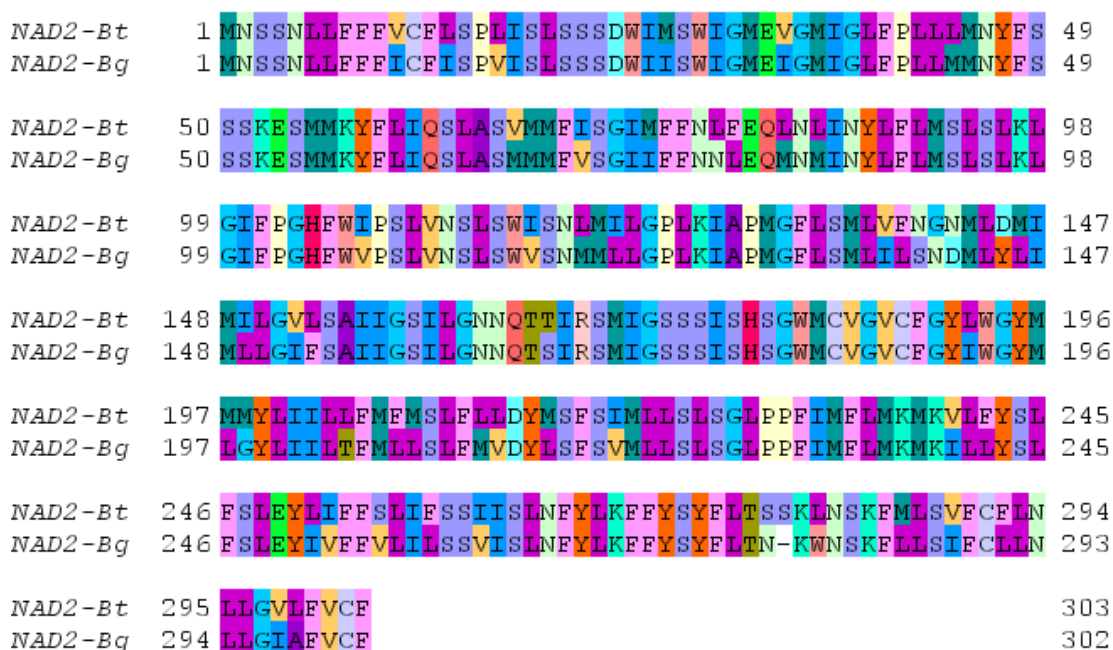


Figura 5.27 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD2 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-9- NADH 3 desidrogenase unidade 3 (NAD3)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 115. A proteína NAD3 de *B. tenagophila* apresentou o mesmo tamanho de *B. glabrata*. A identidade entre as duas seqüências de 78%. O códon de iniciação foi ATT (isoleucina) e de parada foi TAA. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD3 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.28).

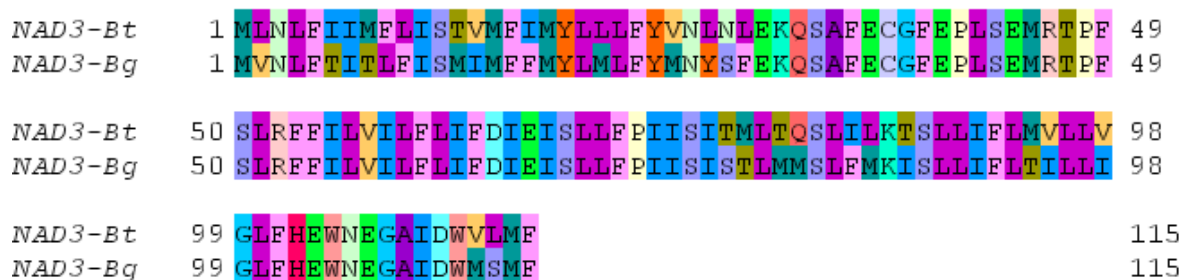


Figura 5.28 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD3 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-10 - NADH 4 desidrogenase subunidade 4 (NAD4)

A proteína NAD4 de *B. tenagophila* apresentou um tamanho de 435 aa. Esta proteína diferiu em tamanho de *B. glabrata* em dois aa, sendo que esta diferença está no meio da proteína. A identidade entre as duas seqüências de aminoácidos foi de 82%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATA (metionina) e o de parada foi incompleto (T--), sendo completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD4 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.29).

NAD4-Bt	1	MFSMLFGIIAIFFEIN	SWSVSFC	SIIVLILIS	MLSFNQYFF	NMTNYIF	MFY	49
NAD4-Bg	1	MFSMLFGILAMVLI	NSWSVTE	CTIVMLVEI	SMLSFNQYF	SNIVN	VVFLY	49
NAD4-Bt	50	NNISNLLIFLS	SIMLIGLCF	ISTPENKKS	RYMSCLLS	LLFILVL	VFSVNN	98
NAD4-Bg	50	NNVSSLLIFLS	SILLVGLCF	ISTPENKKS	RYMMCLLS	LLFILVIV	FVSVNN	98
NAD4-Bt	99	VLLFYIFFEASLI	PTLLLLIV	CGYQPERL	QAGSYMMLY	TVRASL	PLLMV	147
NAD4-Bg	99	VLLFYIFFEASLI	PTLLLLIS	WGYQPERL	QAGSYMMLY	TVCASL	PLLMV	147
NAD4-Bt	148	LLYWSYNEGSFMI	ILSDTCKY	NMYQSMYF	LIYLAFL	VKLP	PLYSCHLWLP	196
NAD4-Bg	148	LLYWSYNEGSFMM	CLSTLTN--	YESVSEFF	VYLAFL	VKLP	PMYTCHLWLP	194
NAD4-Bt	197	KAHVEASLAGSMI	LAGILLKLG	GGLI	QMN	YIENIS	SGDKSFFLIFIMSL	245
NAD4-Bg	195	KAHVEASLAGSMI	LAGILLKLG	GGLI	QMN	NCIENIS	SGNKSTFLIIMSL	243
NAD4-Bt	246	SIWGGLLSSLM	CIROVDL	KAFIAYSS	IGHMALVI	VGILND	QVWGILSSI	294
NAD4-Bg	244	SIWGGLLASLM	CIROVDM	KAFIAYSS	IGHMALVI	IGILND	QVWGILSSI	292
NAD4-Bt	295	ITMYAHGLSSSA	LFCIAYFS	YMKVRSR	SLMHMKGL	LQIYPMIA	FFWFL	343
NAD4-Bg	293	ITMYAHGLCSSA	MFCVAYYS	LKVR	SRSLMHMKGL	LQVYPM	LSFFWFL	341
NAD4-Bt	344	CSVNMAVPPT	LNLMGEMF	IIPSLW	SLSNMFI	IIVMGLM	FIFSGVYNNMFLY	392
NAD4-Bg	342	CSINMAVPPT	LNLLGEMF	VIPSLW	SLSILFI	FVMGLM	FIFSGVYNNMFLY	390
NAD4-Bt	393	TSINHS	MYSKHMLL	GIPLSSSQY	ISLLMH	IFPMVLF	LKMDLFF	435
NAD4-Bg	391	TNINHG	VHSKYI	ILYSVPM	NSSQYMSL	IMHMF	PMILFLKLELFF	433

Figura 5.29 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD4 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-11- NADH 4L desidrogenase subunidade 4L (NAD4L)

A proteína NAD4L de *B. tenagophila* apresentou um tamanho de 103 aa. Esta proteína diferiu em tamanho de *B. glabrata* em quatro aa, sendo que esta diferença está no início da proteína. A identidade entre as duas seqüências de aminoácidos foi de 78%. O códon de iniciação para essa proteína foi ATG (metionina) e o de parada foi TAA. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD4L de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.30).

NAD4L-Bt	1	MILSSISLMSLT	FVCF	LVFSY	LINKKYI	LLSSL	LILLE	GMML	LMSM	VFMIFS	49			
NAD4L-Bg	1	MIFY----	VSLLE	VFFLV	LCYLF	NKKYI	LLSLL	IILE	GMML	LMSM	VFMVFS	45		
NAD4L-Bt	50	LMSI	YESM	YMF	LMILT	FAACE	AAIG	LSSL	LVSF	LRLR	GNHLL	KSIV	YFAK	98
NAD4L-Bg	46	LMSS	YESM	YMF	MMVLT	FAACE	AAIG	LSSL	LVSF	LRLR	GSHML	IALTH	YFAK	94
NAD4L-Bt	99	NSWIN												103
NAD4L-Bg	95	NSWFS												99

Figura 5.30 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD4L de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-12 - NADH 6 desidrogenase unidade 6 (NAD6)

O número de aminoácidos encontrado nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 152. Esta proteína diferiu no tamanho do NAD6 de *B. glabrata* em um aa. Esta diferença está no meio da proteína. O grau de identidade dos aminoácidos foi de 82%. O códon de iniciação para esta proteína foi ATA (metionina) e o de parada TAA. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD6 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.31).

NAD6-Bt	1	MDFFL	FLNI	YSLL	MLV	SVFL	MISF	ISSP	VSLG	ISLFF	TSVF	VVLV	MSI	49		
NAD6-Bg	1	MDLFL	FLNI	YSLL	MLI	SIFL	MVSE	ISSP	VSLG	ISLFF	TSVF	VVLV	MSI	49		
NAD6-Bt	50	FFNM	WYSY	IIMF	LVYI	GGLV	LFYI	YCM	MSSE	NEK	FHF	KL	VVLY	LLPL	MYF	98
NAD6-Bg	50	FFNM	WYSY	IILF	LVYI	GGLV	LFYI	YCM	MSSE	NEK	FHF	KL	IILY	FLPI	FLF	98
NAD6-Bt	99	LQS-	SSEI	NIN	FLG	YSAY	ESSY	YLSM	SFGL	VVLL	LLTLL	SILR	ILSV	146		
NAD6-Bg	99	FSEK	SNEV	ETK	FLG	YSAY	ESSY	YMSM	SFGL	VVLL	LLTLL	SILR	ILSV	147		
NAD6-Bt	147	KKVLYV												152		
NAD6-Bg	148	KKILYV												153		

Figura 5.31 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD6 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-1-13 - NADH 5 desidrogenase subunidade 5 (NAD5)

O número de aminoácidos encontrados nesta proteína para *B. tenagophila* foi de 545. Esta proteína apresentou o mesmo tamanho de *B. glabrata*. A identidade entre as duas seqüências foi de 86%. O códon de iniciação foi ATA (metionina) e de parada foi TAG. Abaixo, encontra-se alinhado os aminoácidos da proteína NAD5 de *B. tenagophila* e *B. glabrata* (Fig. 5.32).

<i>NAD5-Bt</i>	1	MSFLLFSEFLMMLMMMLMFIYNNMTYIILEVNVLSINTCEFSFSMVFEDKV	49
<i>NAD5-Bg</i>	1	MSFLLFSLMIFFMIIIMMLFIYKNMTFILEVNLISINTCEFSFSMIFEDKV	49
<i>NAD5-Bt</i>	50	SFMEFVTIVMMISSSVFLFSCDYMKEDVFFYRFMWILLSEFVMSMCFIVFS	98
<i>NAD5-Bg</i>	50	SFMEFVTIVMMISSSVFLFSCDYMKEDIYFYRFMWILLSEFVLSMCFILIFS	98
<i>NAD5-Bt</i>	99	GSLLFMLVGVWDGLGITSEFALIIYYQSKDSLIVAGFHTMLINRIGDVFIVI	147
<i>NAD5-Bg</i>	99	GSLLFMLVGVWDGLGITSEFALIIYYQSKDSLIVAGFHTMLINRIGDVFIVV	147
<i>NAD5-Bt</i>	148	SFFLFVFLGQFHYYPMCSTAMTLIMILSIASLTKSAQYPFSSWLPAAMA	196
<i>NAD5-Bg</i>	148	SFFLFVFLGHFYYPMCSTALTLMTILSVASLTKSAQYPFSSWLPAAMA	196
<i>NAD5-Bt</i>	197	APT PVSALVHSSSTLVTAGIFLIIRLSMVVTMSEELSNMMLLFLGAITCCLL	245
<i>NAD5-Bg</i>	197	APT PVSALVHSSSTLVTAGIFLIIRLSMVIPTKELSNMMLLLGAITCCLL	245
<i>NAD5-Bt</i>	246	GGTAAIYEFDLKKIIALSTLSQLGLMVFTLGMGLTNIITLHFLFMHALFK	294
<i>NAD5-Bg</i>	246	GGTAAIYEFDLKKIIALSTLSQLGLMVFTLGMGLTNIITLHFLFMHALFK	294
<i>NAD5-Bt</i>	295	ALLFLAAGSVLLMMSFGVQDMRLLGSI SNSAPFCIIIFNISGFCLMGAPF	343
<i>NAD5-Bg</i>	295	ALLFLAAGSVLLMMSFGVQDMRFLGGISNSAPFSIVIFNISGFCLMGAPF	343
<i>NAD5-Bt</i>	344	LSAFYSKHMIKEMMFSSMNVLSLLMISFATIMTAMYTTTMMKSLVWGK	392
<i>NAD5-Bg</i>	344	LSAFYSKHMIKEMMFSSMNVLSIVMISFATIMTAMYTTTMMKSLVWGK	392
<i>NAD5-Bt</i>	393	PNISLILKTPSSIIYVSMVMSFFAIFSGKFMWSLENWFLEYVFIENYLS	441
<i>NAD5-Bg</i>	393	PNIKLIMKNSESIYFSMIMLSFFAIIISGKYMWSLENWFLECVFIENYLG	441
<i>NAD5-Bt</i>	442	WIINFFMFIGIFMGMTSMNNSFMWSTMFFLAPFYIHSKGQLNPFLKNL	490
<i>NAD5-Bg</i>	442	MMINFFVLMGILLGLIMSVNNSYMWSSMFFLAPFYINSKLLNPFLKNM	490
<i>NAD5-Bt</i>	491	KFLDYGWLESEFSKVDMYSKISSNFSVLLFSWPVFLNSFFRVFVLLIIF	539
<i>NAD5-Bg</i>	491	YFLDYGWLESEFSKIDIISKVSSNFSILLEFSWPFIINSFFRSFIILMIIF	539
<i>NAD5-Bt</i>	540	VYVMNY	545
<i>NAD5-Bg</i>	540	IYVMSY	545

Figura 5.32 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NAD5 de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

A comparação entre os códons de iniciação e parada de cada proteína de *B. tenagophila* e *B. glabrata* pode se visualizada na tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Códon de iniciação e parada encontrados em proteínas codificados pelo DNA mitocondrial de *B. tenagophila* e *B. glabrata*. Os códons em vermelho são os diferentes entre as espécies.

Proteína	Códon de iniciação		Códon de parada	
	Bt	Bg	Bt	Bg
ATP6	ATT	ATT	*T--	*T--
ATP8	ATT	ATA	*T--	*T--
COI	TTG	TTG	TAG	TAA
COII	ATA	ATA	TAA	TAG
COIII	ATA	ATA	*T--	*T--
Cytb	ATT	ATT	TAA	TAA
NAD1	ATG	ATG	TAA	TAA
NAD2	ATT	ATT	*T--	*T--
NAD3	ATT	ATA	TAA	TAA
NAD4	ATA	ATT	*T--	*T--
NAD4L	ATG	ATA	TAA	TAA
NAD5	ATA	ATA	TAG	TAG
NAD6	ATA	ATA	TAA	TAA

* códon de parada é completado por adição de A na porção 3' do RNAm

Um resumo da comparação do comprimento e da porcentagem de identidade encontrado entre as proteínas de *B. tenagophila* e *B. glabrata* encontra-se representado na tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Comparação entre as proteínas encontradas em *B. tenagophila* e *B. glabrata*

Proteína	Comprimento (aa)		Identidade Bt em relação Bg (%)
	Bt	Bg	
ATP6	213	213	87
ATP8	35	35	60
COI	508	508	98
COII	222	215	92
COIII	262	262	94
Cytb	366	366	91
NAD1	296	307	90
NAD2	303	302	83
NAD3	115	115	78
NAD4	435	433	82
NAD4L	103	99	78
NAD5	545	545	86
NAD6	152	153	82

5-7-2- RNA de transferência

Para identificar o RNAt de *B. tenagophila* no genoma mitocondrial, primeiro utilizamos o programa tRNA-Scan (Lowe & Eddy 1997) que seleciona potenciais regiões que formam estruturas secundárias em forma de folha de trevo (*cloverleaf*). Entretanto, dos 22 RNAt, o programa encontrou somente seis (Asp, Asn, Thr, Val, Ala, Pro). Os demais RNAts foram identificados pelo alinhamento nucleotídico com o seu correspondente em *B. glabrata*.

A seguir o alinhamento das seqüências nucleotídicas dos 22 RNAs de transferência de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-1-RNAt^{Asp}

O tamanho deste RNAt foi de 66 nucleotídeos para *B. tenagophila* e de 64 para *B. glabrata*. O grau de identidade entre estas duas espécies foi de 80%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GTC, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.33).

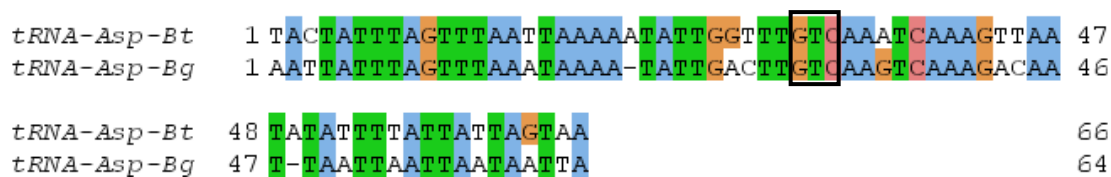


Figura 5.33 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Asp} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-2- RNAt^{Cys}

O RNAt^{Cys} de *B. tenagophila* e de *B. glabrata* apresentaram o mesmo tamanho de 63 nucleotídeos. O grau de identidade entre estas duas espécies foi de 81%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GCA, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.34).

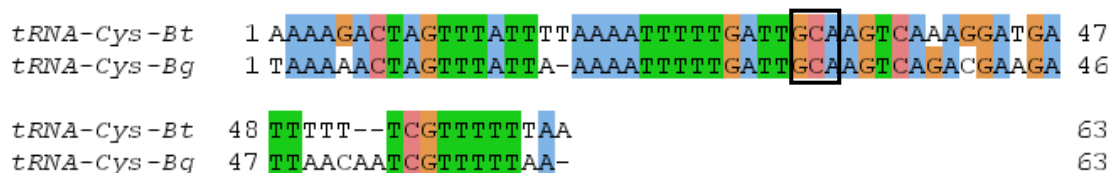


Figura 5.34 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Cys} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-3- RNAt^{Phe}

Ao analisarmos o RNAt^{Phe} observamos que este RNAt apresentou o mesmo tamanho nas duas espécies estudadas, com 63 nucleotídeos. O grau de identidade encontrado foi de 97%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GAA, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.35).

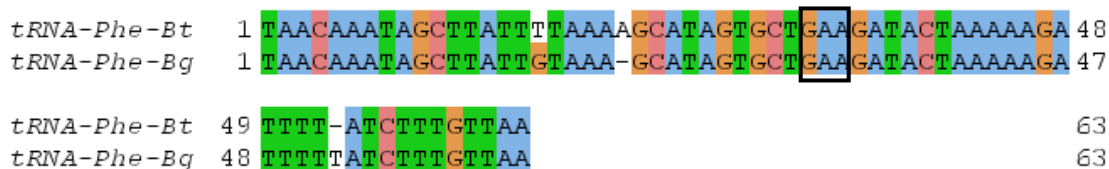


Figura 5.35 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Phe} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-4- RNAt^{Tyr}

O RNAt^{Tyr} apresentou um tamanho de 61 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade entre estas duas espécies foi de 93%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GTA, sendo o mesmo da *B. glabrata* (Fig. 5.36).

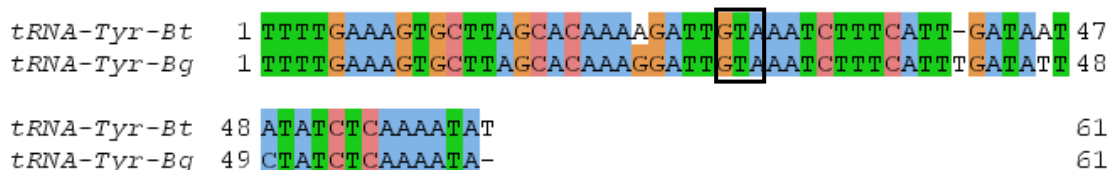


Figura 5.36- Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Tyr} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-5- RNAt^{Trp}

O tamanho do RNAt^{Trp} de *B. tenagophila* foi de 63 nucleotídeos. Este RNAt foi maior do que o de *B. glabrata* em 1 nucleotídeo, com um grau de identidade de 83%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TCA, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.37).

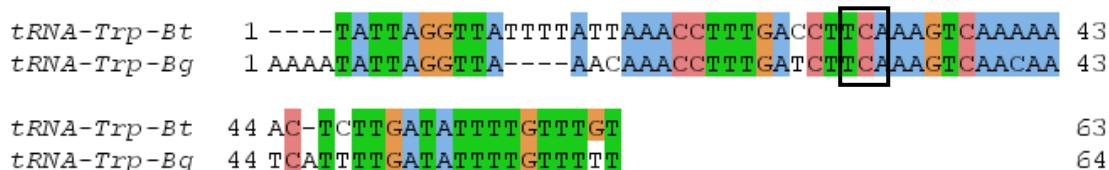


Figura 5.37 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Trp} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-6- RNAt^{Gly}

O tamanho do RNAt^{Gly} de *B. tenagophila* foi de 60 nucleotídeos. Este RNAt foi menor do que o de *B. glabrata* em 6 nucleotídeos, com um grau de identidade de 92%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TCC, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.38).

```

tRNA-Gly-Bt   1 TTTTTTGTAAATATAA--TA--TATTATAGTTACCTTCCAAAGTAAA--AAT 44
tRNA-Gly-Bg   1 TTTTTTGTAAATATAAAATAATTATTATTTTACCTTCCAAAGTAGACAAT 48

tRNA-Gly-Bt   45 CTCGAAAGCGCTTAAA-- 60
tRNA-Gly-Bg   49 CTCGCAAGAGCTTAAAAA 66

```

Figura 5.38 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Gly} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-7- RNAt^{His}

Ao analisarmos o RNAt^{His} observamos que este RNAt apresentou um tamanho de 63 nucleotídeos em *B. tenagophila* e de 65 para *B. glabrata*. O grau de identidade encontrado entre estas duas espécies foi de 78%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GTG, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.39).

```

tRNA-His-Bt   1 TTAAAAGTAAGTTAATTTTA---AACTGTAGGTTTGTGGAACCTGAT 44
tRNA-His-Bg   1 TTAAAAATAAGTTAATACACAAAACACGGGTTTGTGAGAGCCCGAT 47

tRNA-His-Bt   45 ATCTTT-ATGTTTCTGAGTT 63
tRNA-His-Bg   48 ATCCTTCAGGTTTCTGAG-- 65

```

Figura 5.39 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{His} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-8- RNAt^{Gln}

O RNAt^{Gln} apresentou o mesmo tamanho de 64 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade entre estas duas espécies foi de 88%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TTG. O anticódon para *B. glabrata* depositado no GenBank foi CAA. Este anticódon de acordo com o código genético mitocondrial de invertebrado é um RNAt^{Leu} (Fig. 5.40).

```

tRNA-Gln-Bt      1 TTTCCCTTGGAAAAAATCTCTAAGAAACTCAAATTTCTTGTGCCT 47
tRNA-Gln-Bg      1 TTTTCCCTTGGAAAAAATCTCTAAGAAACTCAAATTTTCTCGTGCCA 47

tRNA-Gln-Bt      48 AACACTGAAGGAAAGGA 64
tRNA-Gln-Bg      48 AACACTGAAGGGAAGGA 64

```

Figura 5.40 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Gln} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-9- RNAt^{Leu}

O RNAt^{Leu} apresentou o mesmo tamanho de 62 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade foi de 92%. O anticódon encontrado neste RNAt foi TAA, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.41).

```

tRNA-Leu-Bt/1-62  1 TTTTTTGTGGCAGACTGATGCAAAGATTTTAAAGCGTCTTTTA 42
tRNA-Leu-Bg/1-62  1 TTTTTTGTGGCAGAGGAATGCAAAGATTTTAAAGAGTCTTTTA 42

tRNA-Leu-Bt/1-62  43 AGAATTTTATTTCCTTCCCT 62
tRNA-Leu-Bg/1-62  43 TGAATTTTATTTCCTTCCCT 62

```

Figura 5.41 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Leu} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-10- RNAt^{Asn}

Ao analisarmos o RNAt^{Asn} observamos que este RNAt apresentou um tamanho de 63 nucleotídeos em *B. tenagophila* e de 69 para *B. glabrata*. O grau de identidade encontrado foi de 70%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GTT, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.42).

```

tRNA-Asn-Bt      1 -TTAAATGAAGCTGT---GTACAGCATTTAACTGTTAATTAAAAT-- 41
tRNA-Asn-Bg      1 TTTAATGAAGCATTCAAATTATGCATTTAACTGTTAATTAAAATTA 47

tRNA-Asn-Bt      42 TTACGATATTATCGCATTTAAA 63
tRNA-Asn-Bg      48 TCGCATTTTGGCGACTATTAAA 69

```

Figura 5.42 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Asn} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-11- RNAt^{Arg}

O tamanho do RNAt^{Arg} de *B. tenagophila* foi de 64 nucleotídeos. Este RNAt foi maior do que o de *B. glabrata* em 1 nucleotídeo, com um grau de identidade de 89%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TCG, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.43).

```

tRNA-Arg-Bt      1  TTTACTAAAGCGA-AT-TATTGCATTAAGTTTCGACCTTAAGTTAGA 45
tRNA-Arg-Bg      1  TTTACTAAAGCGATATATATTGCATTAAGTTTCGACCTTAAAATAGA 47

tRNA-Arg-Bt      46  TTATTTAAAATCTAGTAAAA 64
tRNA-Arg-Bg      48  TAATTTT--TCTAGTAAA- 63

```

Figura 5.43 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Arg} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-12- RNAt^{Glu}

O tamanho do RNAt^{Glu} de *B. tenagophila* foi o mesmo de *B. glabrata*, 69 nucleotídeos. O grau de identidade encontrado foi de 88%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TTC, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.44).

```

tRNA-Glu-Bt      1  TCTCTTTTTTTGAAGTGCTACACATTATCTTTTCAAGATAAAAAAGT 47
tRNA-Glu-Bg      1  TCTCTTTTTTTGAAGTGTCCACGTTATCTTTTCAAGATAAAAAATGT 47

tRNA-Glu-Bt      48  TT--TTTACTAAAGCGAATTATTG 69
tRNA-Glu-Bg      48  TTGTTTTACTAAAGCGATATAT-- 69

```

Figura 5.44 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Glu} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-13- RNAt^{Met}

O tamanho do RNAt^{Met} de *B. tenagophila* foi de 63 nucleotídeos. Este RNAt foi menor do que o de *B. glabrata* em 1 nucleotídeo, com um grau de identidade de 98%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TAT, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.45).

```

tRNA-Met-Bt      1  TTTAAGAGAAAAATCTTATTTGAGTTATGAGCCCAAAGCTTAAAAA 47
tRNA-Met-Bg      1  TTTAAGAGAAAAATCATATTTGAGTTATGAGCCCAAAGCTTAAAAA 47

tRNA-Met-Bt      48  AT-AGCTTATCTTAAAA 63
tRNA-Met-Bg      48  ATTAGCTTATCTTAAAA 64

```

Figura 5.45 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Met} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-14- RNAt^{Ser}

O RNAt^{Ser} apresentou o mesmo tamanho de 65 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade foi de 87%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TGA, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.46).

```

tRNA-Ser-Bt   1  TTTTCGTTTTTTGGTTTGACACCTGGATTTTGAAAAATCTAGTTAGAATT 48
tRNA-Ser-Bg   1  TTTTCGTTTTTTTGTATATTATGGATTTTGAAAAATCTAAAAAGGATT 48

tRNA-Ser-Bt   49  TTATATTCACCAAAAAA 65
tRNA-Ser-Bg   49  TGATCATCCGCAAAAAA 65

```

Figura 5.46 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Ser} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-15- RNAt^{Ser2}

O RNAt^{Ser2} apresentou o mesmo tamanho de 52 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade foi de 72%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GCT, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.47).

```

tRNA-Ser-Bt   1  GAAAAAAATATTGAAAGCTGCTAACTTTGATTTGGGGGGGGTTCTCCT 48
tRNA-Ser-Bg   1  GAAAAAAATAATTGAAAGCTGCTAACTTTGAT--AGGGGGATTTCTCCT 46

tRNA-Ser-Bt   49  TTTT-- 52
tRNA-Ser-Bg   47  TTTTTC 52

```

Figura 5.47 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Ser2} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-16- RNAt^{Thr}

Ao analisarmos o RNAt^{Thr} observamos que este RNAt apresentou um tamanho de 62 nucleotídeos em *B. tenagophila* e de 63 para *B. glabrata*. O grau de identidade encontrado foi de 97%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TGT, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.48).

```

tRNA-Thr-Bt   1  TTCAGAATAGCTTAATTACTAAAGCATTGATTTTGTAAATTCAACGAT 47
tRNA-Thr-Bg   1  TTCAGAATAGCTTAAC-ACTAAAGCATTGATTTTGTAAATTCAACGAT 46

tRNA-Thr-Bt   48  AT--TTTTTTTCTGAAA 62
tRNA-Thr-Bg   47  ATATTTTTTTTCTGAAA 63

```

Figura 5.48 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Thr} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-17- RNAt^{Ile}

Ao analisarmos o RNAt^{Ile} observamos que este RNAt apresentou um tamanho de 63 nucleotídeos em *B. tenagophila* e de 62 para *B. glabrata*. O grau de identidade encontrado foi de 100%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi GAT, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.49).

```

tRNA-Ile-Bt   1 AACAAATCGCCGGTTGAACGGAAATCATTGATGTTGATTAATAAAAAGA 47
tRNA-Ile-Bg   1 AACAAATCGCCGGTTGAACGGAAATCATTGATGTTGATTAATAAAAAGA 47

tRNA-Ile-Bt   48 TTTATTCTTATTGTTT 63
tRNA-Ile-Bg   48 TT-ATTCTTATTGTTT 62

```

Figura 5.49 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Ile} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-18- RNAt^{Lys}

O tamanho do RNAt^{Lys} de *B. tenagophila* foi o mesmo para *B. glabrata*, com 67 nucleotídeos. O grau de identidade encontrado foi de 72%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TTT, sendo o mesmo de *B. glabrata* (Fig. 5.50).

```

tRNA-Lys-Bt   1 TGTTT TTTTGAATGCTAAAAAT----GCAATAAACTTTTAATTTATTAT 44
tRNA-Lys-Bg   1 ----TTTTTGAAGCAAATTTTTT GCAATAAACTTTTAATTTATTTT 44

tRNA-Lys-Bt   45 TTCAACACTTGTGATCTTGCGT 67
tRNA-Lys-Bg   45 TATCAGTTTCTGATCTTGCGT 67

```

Figura 5.50 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Lys} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-19- RNAt^{Val}

O tamanho do RNAt^{Val} de *B. tenagophila* foi de 62 nucleotídeos. Este RNAt apresentou o mesmo tamanho de *B. glabrata*, com um grau de identidade de 97%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TAC, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.51).

```

tRNA-Val-Bt   1 GAAAATAAAGTACTA--AGTATTTCTTATTTACAAATAAGAAGGTCTA 45
tRNA-Val-Bg   1 GAAAATAAAGTACTATAAGTATTTCTTATTTACAAATAAGAAGGTCT- 46

tRNA-Val-Bt   46 GATTTTTTAGTATTTTC 62
tRNA-Val-Bg   47 -ATTTTTTAGTATTTTC 62

```

Figura 5.51 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Val} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-20- RNAt^{Leu2}

O tamanho do RNAt^{Leu2} de *B. tenagophila* foi de 64 nucleotídeos. Este RNAt foi menor do que o de *B. glabrata* em 1 nucleotídeo, com um grau de identidade de 85%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TAG, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.52).

```

tRNA-Leu-Bt    1 TTTTAACTTGGCAGAAA-AATGCAATTAATTTAGGATTAATTTATGTC 47
tRNA-Leu-Bg    1 ATTTAACTTGGCAGAATTAATGCAATTAATTTAGAATTAATTTATATC 48

tRNA-Leu-Bt    48 CTTATGGATTGTTGGTA- 64
tRNA-Leu-Bg    49 CTT-TGGATTGTTGGTAA 65

```

Figura 5.52 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Leu2} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-21- RNAt^{Ala}

O RNAt^{Ala} apresentou o mesmo tamanho de 62 nucleotídeos, para as duas espécies estudadas. O grau de identidade foi de 88%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TGC, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.53).

```

tRNA-Ala-Bt    1 GGTAATATATTTTATT-TAGAATACTTAGTTTGCATCTAAGAGGAAG 46
tRNA-Ala-Bg    1 GGTAATATAATTTTATTATAGAATATTTAGTTTGCATCTAAAAAGAAG 47

tRNA-Ala-Bt    47 CTTAAACTTATTACCA 62
tRNA-Ala-Bg    48 -TTGATCTTTTACCA 62

```

Figura 5.53 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Ala} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

5-7-2-22- RNAt^{Pro}

O tamanho do RNAt^{Pro} de *B. tenagophila* foi de 65 nucleotídeos. Este RNAt foi maior do que o de *B. glabrata* em 2 nucleotídeos, com um grau de identidade de 97%. O anticódon encontrado em *B. tenagophila* foi TGG, sendo o mesmo do *B. glabrata* (Fig. 5.54).

```

tRNA-Pro-Bt    1 TCAAAAATAGTTTATTAAAACATTAACCTTGGGAGTTAATATATAGAT 48
tRNA-Pro-Bg    1 TCAAAAATAGTTTATTAAAACATTAACCTTGGGAGTTAATAAATAGAT 48

tRNA-Pro-Bt    49 TTTTTTCTATTTTTGAA 65
tRNA-Pro-Bg    49 CTTTTTCTATTTTTG-- 63

```

Figura 5.54 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do RNAt^{Pro} de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

Pode-se observar na tabela 5.14 uma comparação compactada entre os 22 RNAt de *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

Tabela 5.14 - Comparação entre os RNAt de *B. tenagophila* (Bt) e *B. glabrata* (Bg)

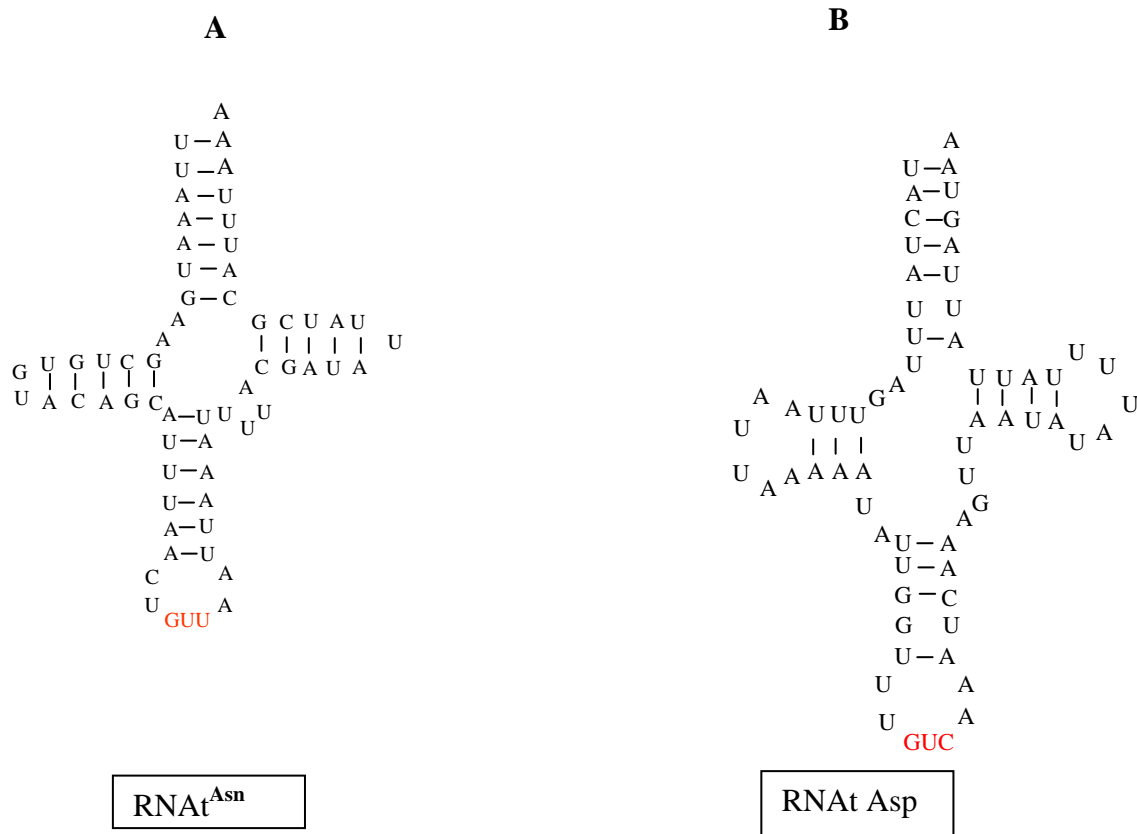
RNAt	Espécie	Anticódon	Tamanho (pb)	Identidade entre as espécies (%)
*Asp	Bt	GTC	66	
	Bg	GTC	64	80
Cys	Bt	GCA	63	
	Bg	GCA	63	81
Phe	Bt	GAA	63	
	Bg	GAA	63	97
Tyr	Bt	GTA	61	
	Bg	GTA	61	93
Trp	Bt	TCA	63	
	Bg	TCA	64	83
Gly	Bt	TCC	60	
	Bg	TCC	66	92
His	Bt	GTG	63	
	Bg	GTG	65	78
Gln	Bt	TTG	64	
	Bg	-	64	88
Leu	Bt	TAA	62	
	Bg	TAA	62	92
*Asn	Bt	GTT	63	
	Bg	GTT	69	70
Arg	Bt	TCG	64	
	Bg	TCG	63	89
Glu	Bt	TTC	69	
	Bg	TTC	69	88
Met	Bt	TAT	63	
	Bg	TAT	64	98
Ser	Bt	TGA	65	
	Bg	TGA	65	87
Ser	Bt	GCT	52	
	Bg	GCT	52	72
*Thr	Bt	TGT	62	
	Bg	TGT	63	97
Ile	Bt	GAT	63	
	Bg	GAT	62	100
Lys	Bt	TTT	67	
	Bg	TTT	67	72
*Val	Bt	TAC	62	
	Bg	TAC	62	97
Leu	Bt	TAG	64	
	Bg	TAG	65	85
*Ala	Bt	TGC	62	
	Bg	TGC	62	88
*Pro	Bt	TGG	65	
	Bg	TGG	63	97

*tRNAs identificados pelo programa tRNAscan-SE

5-7-3- Estrutura secundária dos RNAs

Foi utilizado programas que desenhavam estruturas secundárias de RNAt, entretanto com estes programas não foi possível desenhar estruturas tipo folha de trevo para as seqüências de RNAt de *B. tenagophila* obtidas no seqüenciamento. Por isso, as estruturas secundárias dos RNAs identificados pelo tRNA-Scan foram desenhadas a mão (Fig. 5.55). Os desenhos foram feitos colocando na base três nucleotídeos que correspondiam ao anticódon. De cada lado do anticódon foram colocados dois nucleotídeos, e depois foi feito o emparelhamento das bases de acordo com Watson-Crick (1953). Somente no RNAt^{Thr} foram colocados em cada lado do anticódon três nucleotídeos para melhor emparelhamento entre as bases.

Somente o RNAt^{Ala} não apresentou o braço extra. Os RNAt para Asn (Fig. 5.55A), Asp (Fig. 5.55B), Ala (Fig. 5.55C), Thr (Fig. 5.55D) e Pro (Fig. 5.55F) apresentaram sete pares de base no braço aceitador, sendo que o RNAt para Asp (Fig. 5.55B) uma base não emparelhou U-U. O RNAt para Val (Fig. 5.55E) apresentou 6 pares de bases no braço aceitador, sendo que três bases não emparelharam.



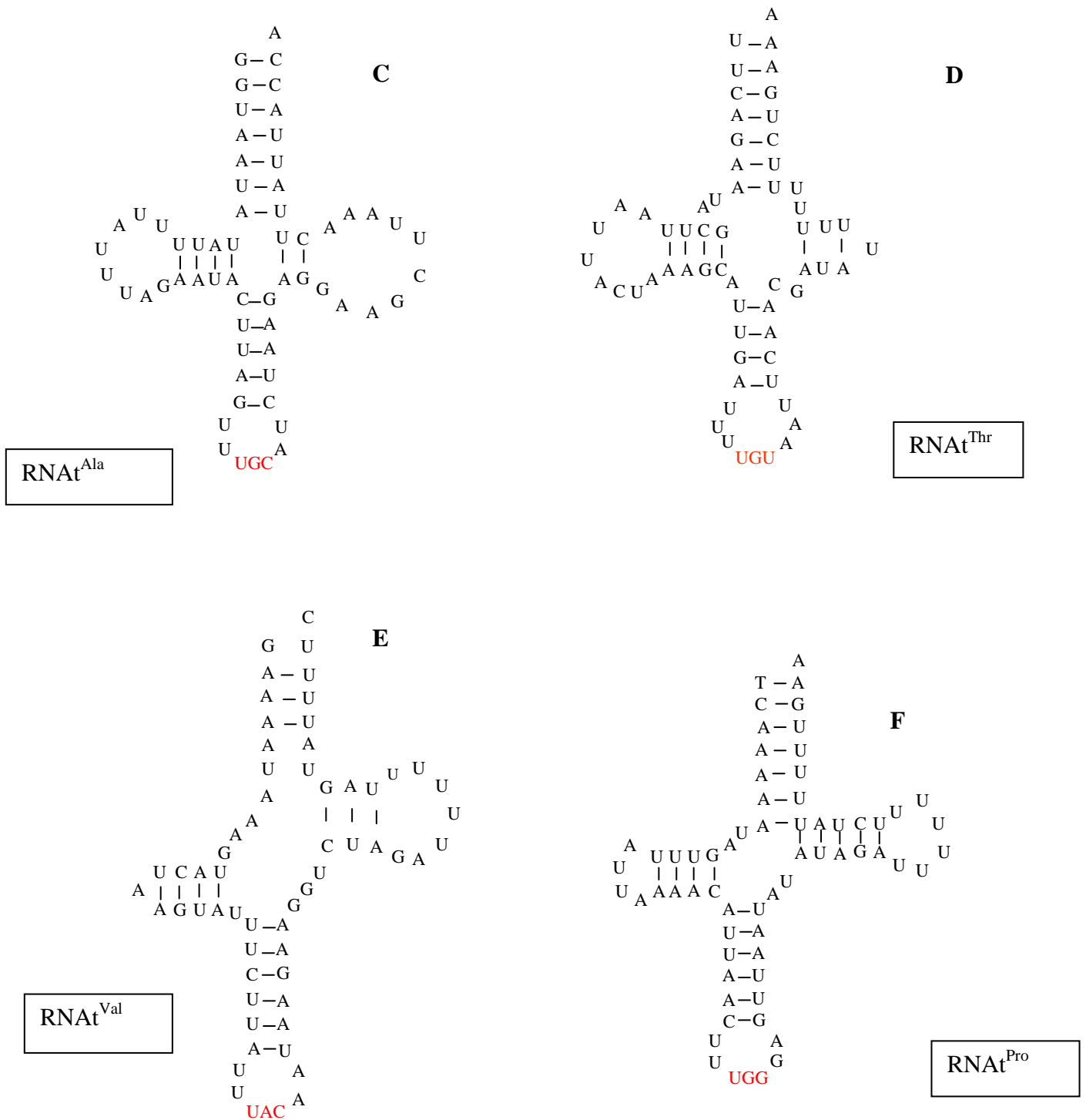


Figura 5.55- Representação esquemática das estruturas secundárias dos RNAts . Em vermelho está representado o anticódon : A - RNAt^{Asn}; B- RNAt^{Asp}; C- RNAt^{Ala}; D- RNAt^{Thr}, E- RNAt^{Val} F- RNAt^{Pro}

5-7-4- Gene para o RNAr

5-7-4-1- RNA ribossomal unidade maior 16S

O RNA ribossomal 16S apresentou um tamanho de 981 nucleotídeos, o mesmo de *B. glabrata*. A identidade encontrada entre as duas seqüências de *Biomphalaria* foi de 88%. O alinhamento entre as seqüências do 16S do RNAr das duas espécies de *Biomphalaria* está representada na figura 5.56.

<i>rRNA-16S-Bt</i>	1	--ATGAATTTTTTATTTTTTTATAAAAAAATGAAC TAAGATATTTAAAAATAA	51
<i>rRNA-16S-Bg</i>	1	ATTTAATTTTTTAATTAATTAATCAGAAAAATA-GATATAATTAATTAGT	52
<i>rRNA-16S-Bt</i>	52	ATTTTTTAAAAATACCTTTTGTATAAGTGTTAATGAAAAAATAATGAATA	104
<i>rRNA-16S-Bg</i>	53	ATTTTATTTTTTACCTTTTGTATAAGTGTTAATGAAAAATTA-ATCATTAA	104
<i>rRNA-16S-Bt</i>	105	TTTTTCCCGAAATTTATTAGGTAAGTAAATGAAAAAATAACGTAGCATAGTT	157
<i>rRNA-16S-Bg</i>	105	TTTTTCCCGAAATTTATTAGGTAAGTAAATAAAAAATAATTAACGTAGTATAGTT	157
<i>rRNA-16S-Bt</i>	158	ATTAATA--ATTTGTTTACAGGAATGAAAAATTTTCATTAATAATGATAACTG	208
<i>rRNA-16S-Bg</i>	158	AAATATATTATTTGTTTACAGGAATGAAAAATTTTCATTAATAATGATAACTG	210
<i>rRNA-16S-Bt</i>	209	GATTTAAAAATAAAAGTATTAAGTACTTTATACATTTAAAAAGTATT-AGATTT	260
<i>rRNA-16S-Bg</i>	211	GATTTTAAATAAAAGTATTTAGTACTTAATACAATTAAAAAAGTATTTAGATTT	263
<i>rRNA-16S-Bt</i>	261	TTTAAAAAAGAATTATTATCTTATCTATTATTATAAAAAATAATTTTTTATA	313
<i>rRNA-16S-Bg</i>	264	TTTAAAAAAGAATTATTATCTT-ATCTAGTTTAAATATAAAAAATAATTTTTTATA	315
<i>rRNA-16S-Bt</i>	314	TAAGTGTAAAAATAAAAAAATAATAAATATTTTTTATCTTTAAATTTATTTA	366
<i>rRNA-16S-Bg</i>	316	TAGCGAACATATAAATTAATAATTTTAAATTTAGTATCTTTTATTATTAAA	368
<i>rRNA-16S-Bt</i>	367	AAATATAAATCTATTAAGACTTATAATTTTTTTTTGTTAAAAATTAGTAATAACT	419
<i>rRNA-16S-Bg</i>	369	AAATATAAAAAAATATTTTTTTTATATTTTTTTTTGTTAAAAATTAGTAATAACT	421
<i>rRNA-16S-Bt</i>	420	AATATCTTTTTAGGAATTCGGCAAAATTAATTTCAACTGTTTATCAAAAACATA	472
<i>rRNA-16S-Bg</i>	422	AAAAATCTTTTTAGGAATTCGGCAAAATTAATTTCAACTGTTTATCAAAAACATA	474
<i>rRNA-16S-Bt</i>	473	GTTTGAGGAAAAAATCTCAAATGTATCCTGCCAGTGATATTTTTTTTAAATG	525
<i>rRNA-16S-Bg</i>	475	GTTTAAGGAAAAAATCTTAAATGTATCTGCCAGTGA--TCTATTTTTAAATG	525
<i>rRNA-16S-Bt</i>	526	GCCGCAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAAATCAATTGGCCTTCAATTAG	578
<i>rRNA-16S-Bg</i>	526	GCCGCAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAAATCAACTGGCCTTCAATTAA	578
<i>rRNA-16S-Bt</i>	579	AGTCTAGAATGAAAGGAATTATGAGGTAATCTGTCTTAAAAGATTTTTTTTTT	631
<i>rRNA-16S-Bg</i>	579	AGTCTGGAATGAAAGGAAAAATGGGGTAATCTGTCTTAAAGAAATTTTTTTTTG	631
<i>rRNA-16S-Bt</i>	632	AATTTATTTAAATGATGAAAAATACATTTTTTAGAAAAAAGACGAGAAGACCC	684
<i>rRNA-16S-Bg</i>	632	AATTTATTTAAATGATGAAAAATACATTTTTTAGAAAAAAGACGAGAAGACCC	684
<i>rRNA-16S-Bt</i>	685	TTAGAGTTT--AATTTTTTAATTTTGTTGGGGCGACAAGTAAACATTTTGAAC	735
<i>rRNA-16S-Bg</i>	685	TTAGAGTTTTC AATTTTTTT---TTTGTTGGGGCGACAAGTAAACAATT-AAAC	733
<i>rRNA-16S-Bt</i>	736	TTTACTAAATAATTTAATCGATTTATAATAAGGATAAAAAAATACCTTAGGG	788
<i>rRNA-16S-Bg</i>	734	TTTACTAGTGTAATAAATCGATTTTATTATAAGAATAAATTAACCTACCTTAGGG	786
<i>rRNA-16S-Bt</i>	789	ATAACAGCATTATATTTTTTATATGATTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT	841
<i>rRNA-16S-Bg</i>	787	ATAACAGCATTATATATTTT-TATGATTTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAACT	838
<i>rRNA-16S-Bt</i>	842	TTATGGCTAGCCGTCAAAAAAGATTTGTTCTGTTCGAACAATATTTATCCTACA	894
<i>rRNA-16S-Bg</i>	839	TTATGGCTAGCCGTCAAAAAAGATTTGTTCTGTTCGAACAATATTTATCCTACA	891
<i>rRNA-16S-Bt</i>	895	TGATCTGAGTTT CAGACCGGCGTAAAGCCAGGTCAGTTTCTATCTTTTATTTTAA	947
<i>rRNA-16S-Bg</i>	892	TGATCTGAGTTT CAGACCGGCGTAAAGCCAGGTCAGTTTCTATCTTTTATTTTAA	944
<i>rRNA-16S-Bt</i>	948	TATTTTTTAGTACGAAAGGACCGGAATATTTTTTTT---	981
<i>rRNA-16S-Bg</i>	945	TATTTTTTAGTACGAAAGGACCGGAATATTTTTTACTAT	981

Figura 5.56 - Alinhamento das seqüências do RNAr 16s de *B. tenagophila* e *B. glabrata*

5-7-4-2- RNA ribossomal unidade menor 12S

O RNA ribossomal 12S apresentou tamanho de 708 nucleotídeos, o mesmo de *B. glabrata*. A identidade encontrada entre as duas seqüências de *Biomphalaria* foi de 84%. O alinhamento entre as seqüências do RNAr 12S das duas espécies de *Biomphalaria* está representada na figura 5.57.

<i>rRNA-12S-Bt</i>	1	ATTCAC	TTTTAA	TTAAT	GAAAAA	TTAAT	TAAAG	ATAAA	CTATCA	45					
<i>rRNA-12S-Bg</i>	1	AATCAC	TTTTAA	TTAAT	GAAAAA	TTAAT	TAAAT	GATGA	ACTATCA	45					
<i>rRNA-12S-Bt</i>	46	TGGAAT	TTTTTT	ATT	TTT	TAT	CCAGT	TAGT	GATATT	GAACA	TTTT	90			
<i>rRNA-12S-Bg</i>	46	TGGAAT	TTTTTT	ATT	AT	--	ATCCAG	TTAGT	GATATT	GAACA	CATTTT	88			
<i>rRNA-12S-Bt</i>	91	CAAAG	AAAAA	TT	CAGT	TT	TCTTT	TT	CAACAA	--	GACGA	ATTAG	133		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	89	CAAAG	AAAAA	TT	CAGC	CT	TCTTT	TT	GAAAA	CAGAC	GAA	TTGG	133		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	134	TGCCAG	CAGT	CGCGG	T	CATAC	CTAAT	TGT	AAGAT	TTTTTT	TTAG	AT	178		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	134	TGCCAG	CAGT	CGCGG	T	CATACC	CAAT	TGT	AAGAT	TTTTTT	TTAG	AT	178		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	179	TATTTT	TTTTT	TAAAA	AAG	AT	TTTTTT	TAGT	AAAA	TAT	AAAA	TAT	223		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	179	AATTTT	TTTTT	TAAAA	GT	TATA	TTTTTT	TAGT	AAAA	TAT	AAAA	AT	223		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	224	CTTAT	TTTT	TTT	T	AAAA	TAAAA	TAA	TAAAA	TTCT	GTCT	TAAAA	268		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	224	AAAT	TTCC	TTTT	TT	TAAAA	TAT	TAA	TAAAA	TTCT	TAA	TAAAA	268		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	269	ACTAGG	ATTAG	ATAC	CTACT	ATTT	TAGAA	CACAT	CAAT	TAAT	CT		313		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	269	ACTAGG	ATTAG	ATAC	CTAT	ATTT	CAGAA	CT	CACC	ATA	TAT	CT	313		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	314	AAGCAC	TAAAA	TAAAA	TAA	TATT	AAAA	CT	TAAAA	TTAT	GGCGG	T	358		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	314	AAGCAC	TAAAA	TATTT	TAA	TATT	AAAA	CT	TAAAA	TTAT	GGCGG	T	358		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	359	AAAAT	CAAAC	TTT	AGGGG	AACT	TACCAG	ATAAT	TGATA	AAC	CCCT	CA	403		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	359	GAATC	AAAT	TTT	AGGGG	AACT	TACCAG	ATAAT	TGATA	AAC	CCCT	CA	403		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	404	AGTGTC	CAT	CACT	TAAAC	TAA	TAGCT	TAT	ATATT	GCCG	TTGT	GTTT	448		
<i>rRNA-12S-Bg</i>	404	AGTGAT	TCAA	CTTAA	ACTAAC	AGCT	TAT	ATATT	GCCG	TTGT	GATT		448		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	449	TCCCTT	--	AAGG	AGAA	TCA	ATTAT	TAA	TAA	TAC	--	ATAAC	AG	490	
<i>rRNA-12S-Bg</i>	449	TCTCTT	TAA	AGAA	TAA	TCA	ATA	ATTAT	TATTA	ATA	TAAC	AG	492		
<i>rRNA-12S-Bt</i>	491	GTCAT	AGT	GAT	ATG	TTA	AGT	CT	--	TAAGG	TGAG	TACA	AT	533	
<i>rRNA-12S-Bg</i>	493	GTCAT	AGT	GAT	ATG	TTA	AGT	CCC	TAA	GGT	TGAG	TAC	GAT	537	
<i>rRNA-12S-Bt</i>	534	ATTAC	TTTTTT	T	CAGT	TTT	GAAA	ATAAAA	TT	CAC	T	AAGAT	GG	578	
<i>rRNA-12S-Bg</i>	538	ATTGT	TTTTTT	CCGG	AT	AAAA	ATCA	ATAAT	TTTT	TT	CAAG	AAG	GG	582	
<i>rRNA-12S-Bt</i>	579	ACTTAA	AAAGT	AACT	AAAA	ATAT	ATAAT	TAA	TGA	ATTC	TTT	GAT		623	
<i>rRNA-12S-Bg</i>	583	ACTTAA	AAAGT	AAAT	CT	AAAA	ATAT	ATAAT	TAT	GA	ATTC	TTT	GA	627	
<i>rRNA-12S-Bt</i>	624	TTTGT	GCAC	ACAT	TGCC	CGT	CATT	CT	CCT	TAT	TTTT	TT	AAA	AGG	666
<i>rRNA-12S-Bg</i>	628	TT	CGT	GCAC	AAAA	TGCC	CGT	CATT	CT	CCT	TAT	TTTT	TAAAA	AGG	672
<i>rRNA-12S-Bt</i>	667	AGACA	AGT	CGT	AAC	ATAG	TAGAG	GTA	ACT	GAAG	TTGT	CTCT	TT	708	
<i>rRNA-12S-Bg</i>	673	AGACA	AGT	CGT	AAC	ATAG	TAGAG	GTA	ACT	GAAG	TTG	-----	TT	708	

Figura 5.57 - Alinhamento das seqüências do RNAr 12s de *B. tenagophila* e *B. glabrata*

5-8 - Ordem gênica

Na figura 5.58 pode-se observar a comparação da localização dos genes mitocondriais entre *B. tenagophila* e *B. glabrata*. Podemos observar que as duas espécies apresentaram a mesma posição de todos os seus genes.

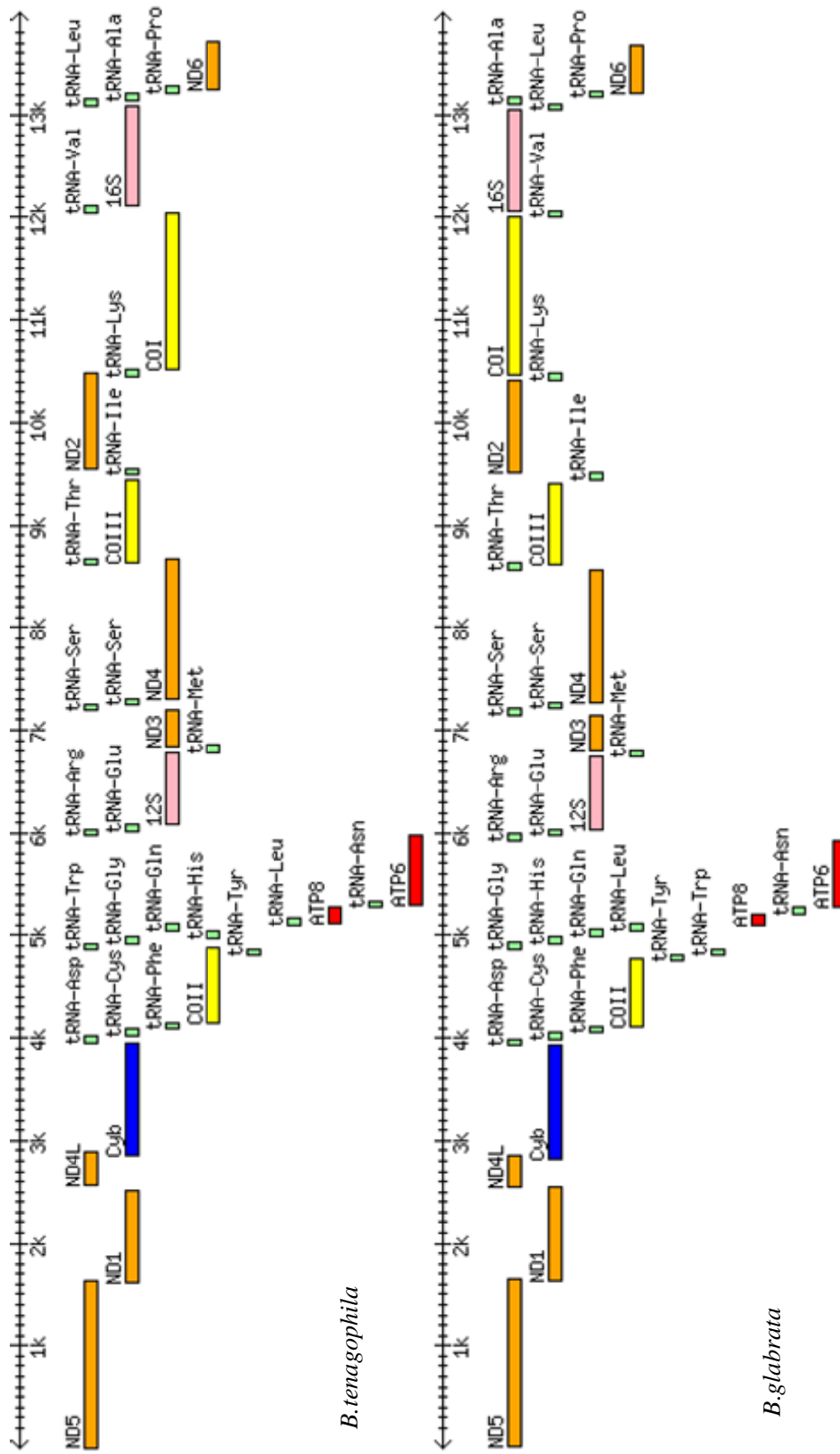


Figura 5.58 – Comparação da ordem gênica do DNAm de *B. tenagophila* e *B. glabrata*

5-9 Análise filogenética

Foram alinhadas seqüências de aminoácidos do DNAm_t (exceto ATP8) de 29 organismos pertencentes ao filo Mollusca (tabela 4.8). Após o alinhamento estas seqüências foram utilizadas para inferir sobre a filogenia do filo.

As árvores apresentaram topologia semelhante, independente da metodologia, havendo a formação de cinco grandes grupos: I) Na árvore MP (Fig. 5.59), ML (Fig. 5.60) este grupo foi formado por seis moluscos da classe Bivalvia (sub classe Protobranchia, super ordem Pteriomorphia), uma espécie da classe Gastropoda (Prosobranchia) e uma espécie da classe Scaphopoda (Gadelida), o valor do *bootstrap* foi de 94% (MP) e 99% (ML). Na árvore NJ (Fig. 5.61) este grupo foi formado pelos mesmos moluscos das árvores MP e ML com exceção da espécie da classe Scaphopoda (Gadelida) que posicionou-se no grupo III, sendo o valor do *bootstrap* de 100%; II) Em todas as árvores este grupo foi formado pela classe Gastropoda, contendo as sub classes Pulmonata e Opisthobranchia. O valor do *bootstrap* para este grupo foi de 100% para as três árvores; III) Este grupo posicionou-se basalmente aos grupos I e II, sendo que nas árvores MP e ML uma espécie da classe Scaphopoda (Dentaliida) e uma espécie da classe Bivalvia (sub classe Protobranchia, super ordem Heterodonta) posicionaram-se próximas. Enquanto que na árvore NJ, três espécies posicionaram-se próximas, duas espécies Scaphopoda (Dentaliida e Gadelida) e a mesma espécie da classe Bivalvia (sub classe Protobranchia, super ordem Heterodonta). O valor de *bootstrap* para este grupo foi de 97% (NJ), 94% (ML), 74% (MP); IV) Este grupo foi composto por espécies da classe Cephalopoda, independentemente da árvore, com um valor de *bootstrap* alto (100%) para todas as árvores; V) Espécies da classe Gastropoda, (sub classe Prosobranchia) agruparam-se independentemente da árvore, sendo o valor de *bootstrap* de 100% (NJ, ML) e de 82% (MP).

Os valores de *bootstrap* estão demonstrados acima dos ramos. *Katarina tunicata* foi utilizada como *outgroup*

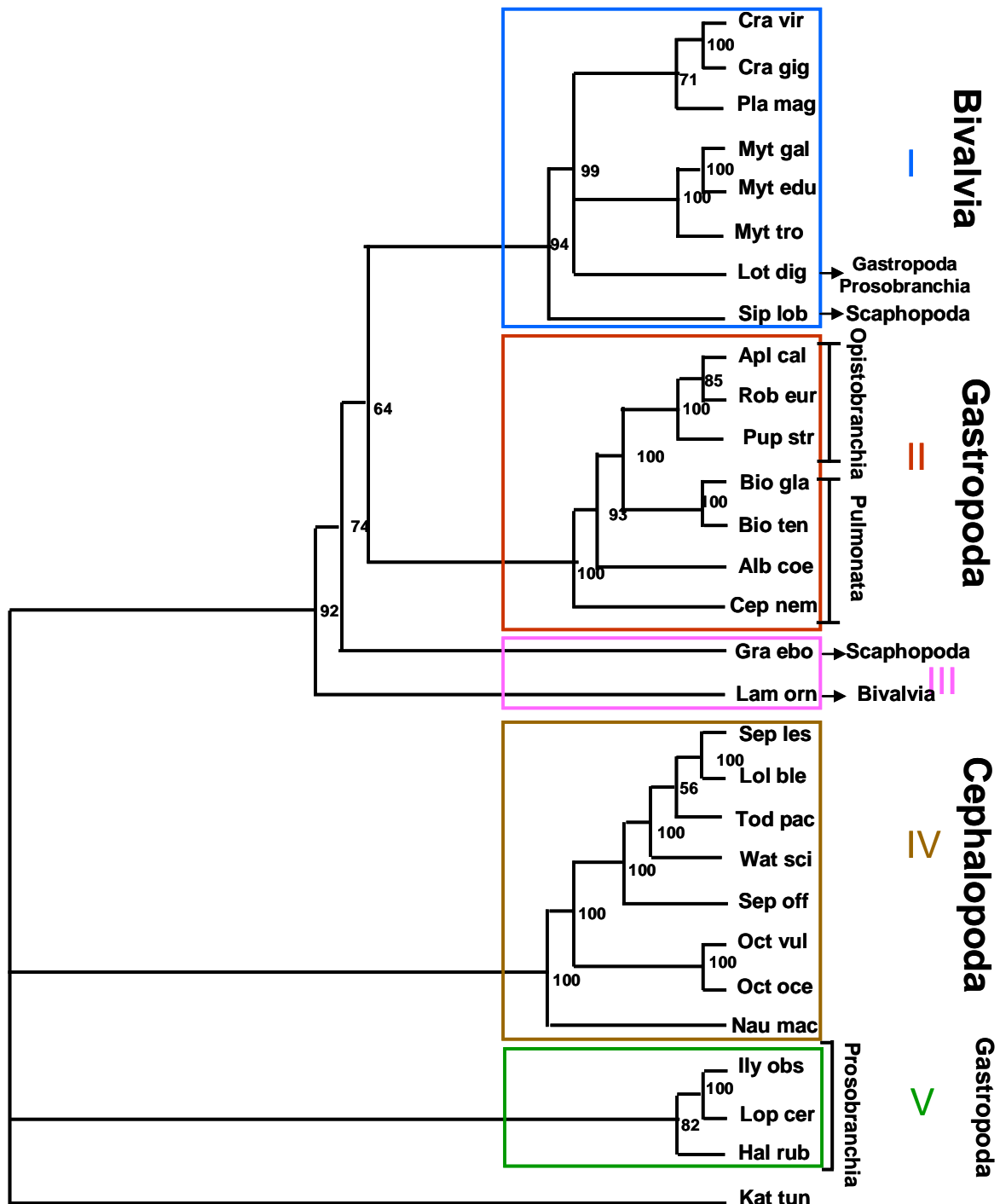


Figura 5.59 - Árvore filogenética do Filo Mollusca obtida após análise de seqüências de aminoácidos utilizando o método MP. As abreviaturas das espécies estão na tabela 4.8.

Os valores de *bootstrap* estão demonstrados acima dos ramos. *Katarina tunicata* foi utilizada como *outgroup*

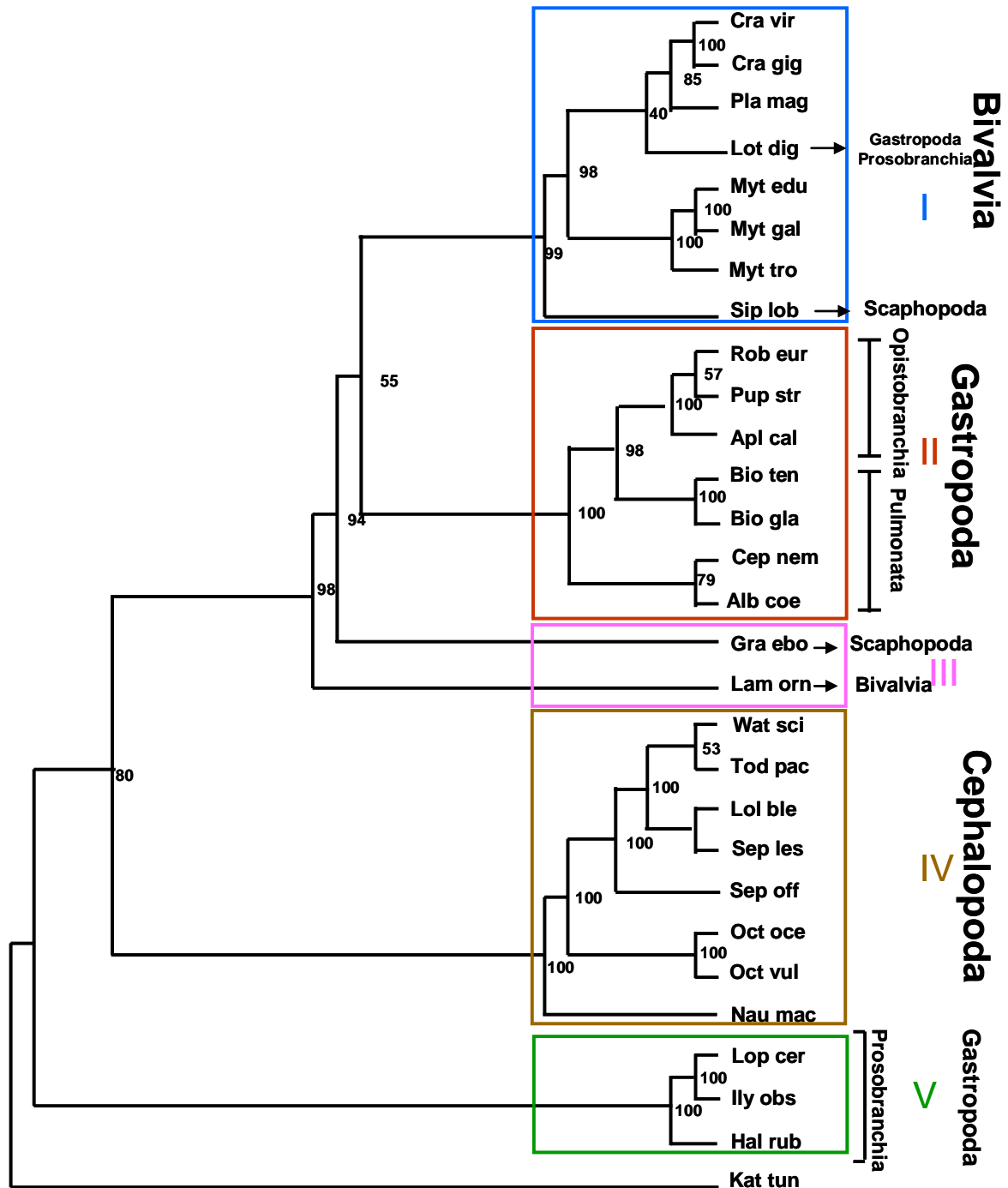


Figura 5.60 - Árvore filogenética do Filo Mollusca obtida após análise de seqüências de aminoácidos utilizando o método ML. As abreviaturas das espécies estão na tabela 4.8.

Os valores de *bootstrap* estão demonstrados acima dos ramos. *Katarina tunicata* foi utilizada como *outgroup*

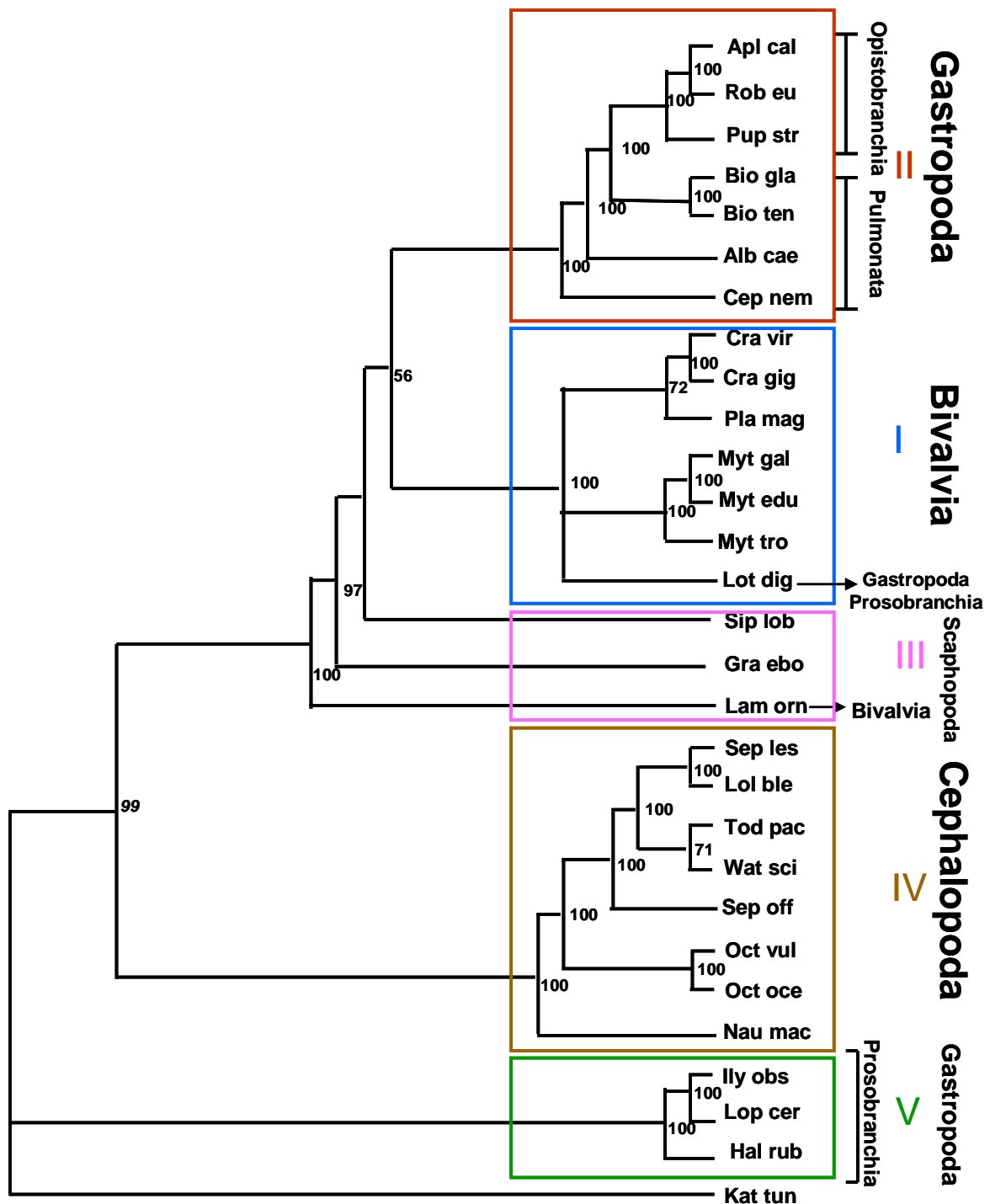


Figura 5.61 - Árvore filogenética do Filo Mollusca obtida após análise de seqüências de aminoácidos utilizando o método NJ. As abreviaturas das espécies estão na tabela 4.8.

6 - DISCUSSÃO

O filo Mollusca é o segundo maior filo animal, onde estão vários invertebrados como as ostras, lulas, polvos e caramujos. O filo possui uma longa história geológica, sendo conhecidas cerca de 35.000 espécies fósseis. Os moluscos *Biomphalaria* possuem registro desde o Jurássico, tendo sobrevivido a grandes variações e pressões ambientais. Em decorrência desenvolveram ao longo deste período, uma série de mecanismos de escape e sobrevivência tais como: autofecundação, diapausa, estivação, capacidade de se enterrar e alta prolificidade (Paraense 1955), encontrando-se atualmente adaptados a diferentes condições ambientais. *Biomphalaria tenagophila* é uma espécie de grande importância na transmissão da esquistossomose, nas regiões sudeste e sul do Brasil. Esta espécie tem despertado o interesse científico de vários pesquisadores por possuir populações tanto suscetíveis como resistente à infecção ao *S. mansoni*.

Neste trabalho focamos o estudo no seqüenciamento do DNAm de *B. tenagophila* do Taim (população resistente à infecção pelo *S. mansoni*). As seqüências obtidas foram comparadas ao DNAm de *B. glabrata*, suscetível ao *S. mansoni*. Este DNA foi escolhido pela sua utilidade na reconstrução das relações filogenéticas, além de possuir vantagens sobre o genoma nuclear tais como: é um genoma compacto, haplóide sem recombinação, possui diferentes taxas de mutação, seqüências de aminoácido conservadas e com herança materna em alguns organismos (Boore 1999, Rawlings et al. 2001, Yamazaki et al. 1997). Além disso, o seqüenciamento completo deste DNA pode fornecer novas fontes de informação filogenética, tais como a ordem dos genes e estruturas secundárias de proteínas e de RNAs (Boore 1999, Lydeard et al. 2000).

No presente estudo, o DNAm de *B. tenagophila* foi totalmente seqüenciado e caracterizado. Um fragmento da região cefalopodal foi escolhido para a extração do DNA por ser uma região de fácil obtenção e ser possível extrair um DNA mais puro, do que, por exemplo, a glândula digestiva, que é uma região com muito DNA contaminante para uma PCR. A estratégia utilizada foi extrair o DNA total da região cefalopodal do molusco e utilizar iniciadores exclusivamente complementares as seqüências do DNAm. Esta estratégia foi escolhida pela dificuldade em separar e purificar a mitocôndria e depois extrair o seu DNA.

O seqüenciamento automático de nucleotídeos é uma técnica molecular que propicia em curto intervalo de tempo aumento considerável de informações sobre o genoma de diversos organismos. O número de organismos com seu genoma mitocondrial completo depositado no GenBank vem aumentando e só em 2006, foram depositadas seqüências mitocondriais completas de 11 moluscos. Além disso, estudos filogenéticos utilizando o genoma mitocondrial vêm auxiliando pesquisas nas quais os dados morfológicos não são precisos.

O seqüenciamento de DNA pode ser feito através de produtos amplificados pela PCR ou através de clonagem de um inserto contendo o fragmento alvo. Neste trabalho foi utilizado o seqüenciamento direto de produtos amplificados pela PCR, quando a região a ser seqüenciada era pequena e foi possível, com apenas uma reação, obter a seqüência completa do fragmento. A clonagem foi utilizada em fragmentos maiores de 2.000 pb, uma vez que seria impossível seqüenciar estes fragmentos com somente uma reação de seqüência. A clonagem facilitou a utilização de “*primer walking*”, ou seja, a medida que se obtinha uma região seqüenciada um novo iniciador era desenhado (complementar a extremidade final da última região seqüenciada). Em seguida, os produtos clonados foram seqüenciados utilizando esses iniciadores sem a necessidade de se realizar outra PCR. Dessa forma economizou-se tempo e reagentes utilizados na PCR.

O tamanho do DNAm_t encontrado para *B. tenagophila* foi de 13.722 pb. Este genoma possui o mesmo número de genes da maioria dos moluscos seqüenciados, dois genes para o RNAr, 13 genes para proteínas e 22 genes para RNAt. O seu tamanho foi maior do que o DNAm_t de *B. glabrata* (13.670 pb), que é o menor genoma de molusco já seqüenciado até hoje. O conteúdo de AT (75,78%) foi maior do que o encontrado para *B. glabrata* (74,6%). Os genes encontrados nas fitas *plus* e *minus* que codificaram as proteínas de *B. tenagophila*, foram os mesmos de *B. glabrata*.

As seqüências dos genes do DNAm_t de *B. tenagophila* do Taim, resistente à infecção ao *S. mansoni*, foram comparadas com as seqüências de *B. glabrata*, suscetível ao *S. mansoni*, sendo posteriormente realizado um estudo filogenético utilizando as seqüências de aminoácidos do DNAm_t de outros moluscos, cujos genoma mitocondriais completos, encontravam-se depositados no GenBank.

Analisando as regiões não codificantes do DNAm_t de moluscos observou-se que estas regiões são pequenas para todos eles. Em *B. tenagophila* esta região (110pb) foi

maior do que a de *B. glabrata* (62pb). Em *B. tenagophila*, a menor região não codificante, foi encontrada entre os genes RNAt^{Leu} e ATP8, ATP8 e RNAt^{Asn} e RNAt^{Ile} e NAD2 com 1 pb e em *B. glabrata* nas regiões entre os genes RNAt^{Cys} e RNAt^{Phe}, entre o RNAt^{Phe} e COII, entre o ATP6 e RNAt^{Arg}, entre o RNAt^{Ser} e NAD4 e entre o RNAt^{Ile} e NAD2 também com 1 pb. Entretanto, a maior região não codificante, em *B. glabrata* foi entre os genes COIII/RNAt^{Ile}, com 42 pb. Esta região foi a segunda maior região não codificante em *B. tenagophila* (COIII/RNAt^{Ile}, com 42 pb). A maior foi entre os genes NAD1/NAD4L com 54 pb.

Entre os 37 genes encontrados no genoma de *B. tenagophila* foram detectadas 19 regiões de sobreposição entre os nucleotídeos com um total de 175 pb compartilhados. Estas sobreposições também contribuíram para tornar o genoma mitocondrial deste molusco pequeno.

Em relação ao tamanho das proteínas, COII, NAD2, NAD4, NAD4L foram maiores em *B. tenagophila* do que em *B. glabrata*. As proteínas NAD1 e NAD6 foram menores em *B. tenagophila* em relação a *B. glabrata*. Nas proteínas ATP8, ATP6, NAD2, NAD4 e COIII o códon de parada foi completado por adição de A durante a transcrição do RNAm. Códon de parada incompletos já foram descritos para os outros moluscos (DeJong et al. 2004, Hatzoglou et al. 1995). A proteína que apresentou a maior diferença, em tamanho, entre as duas espécies foi o NAD1, com 11 aminoácidos a mais em *B. glabrata*. A proteína menos conservada foi ATP8 com 60% de identidade e a mais conservada foi o COI com 98% de identidade entre estas duas espécies.

O gene COI é um marcador mitocondrial frequentemente usado para estudos evolutivos por ser o maior das três subunidades mitocondriais codificadoras da proteína citocromo oxidase (Clary & Wolstenholme, 1985) e por sua seqüência protéica conter domínios funcionais altamente conservados e também regiões variáveis (Saraste 1990). Parte de regiões do gene COI tem sido utilizada em estudos filogenéticos (Yoshida et al. 2006). A análise de seqüências deste gene apresenta níveis de variação considerados apropriados para estudos intra e interespecíficos e tem sido muito utilizado em estudos de diferenciação entre espécies (Stothard & Rollinson 1997, Clark et al. 2001, Campbel et al. 2000, Vidigal et al. 2002). Baxter (2003) considera esta região como uma das mais indicadas para caracterização específica de organismos, numa identificação que ele nomeou de código de barra (“DNA barcode”). Este autor propõe que todos os

organismos tenham seu próprio código de barra para que possam ser identificados a partir dele.

Os RNAt são pequenas moléculas de RNA que geralmente apresentam cerca de 70 a 90 nucleotídeos (Watson et al. 1987). Os 22 genes para o RNAt encontrados no genoma mitocondrial são capazes de ler todos os quatro códons correspondente a família (Barrel et al. 1980, Anderson et al. 1981). Os dois primeiros nucleotídeos emparelhados são suficientes para estabilizar a interação anticódon-codon (Lagerkvist 1981). Em *B. tenagophila*, dos 22 genes que codificam o RNAt, 16 foram identificados pelo alinhamento nucleotídico com o seu correspondente em *B. glabrata* e apenas seis pelo programa tRNA-Scan. Este programa identifica potenciais regiões que formam estruturas secundárias. Utilizando este mesmo programa, DeJong et al. (2004) só conseguiram identificar cinco RNAt em *B. glabrata*, os outros 17 foram identificados comparando-os com seqüências de outros moluscos. Estes autores não publicaram as estruturas secundárias dos RNAt de *B. glabrata*.

Os RNAt de *B. tenagophila* apresentaram um tamanho médio de 63 nucleotídeos, sendo que apenas um (RNAt^{Glu}) possui 69 nucleotídeos. Este pequeno tamanho e a pressão do compacto DNAm de moluscos, poderão ter mudado a estrutura secundária dos RNAts, devido a redução no comprimento da sua cadeia (Yamazaki et al. 1997). De fato, quando tentamos desenhar uma estrutura típica de RNAt, utilizando as seqüências nucleotídicas encontradas no seqüenciamento de RNAt de *B. tenagophila* só tivemos sucesso nos RNAts identificados pelo tRNA-Scan. De acordo com Yokobori e Paabo (1995), os genes RNAts de moluscos mostram erros no emparelhamento de suas seqüências gênicas no braço aceitador. A maioria destes erros está em regiões de sobreposição com genes adjacentes. Os moluscos *Euhadra herklotsi*, *Cepaea nemoralis* e *Albinaria turrita*, apresentaram um a quatro erros no braço aceitador (Yokobori & Paabo 1995). Estes autores ressaltam que os RNAts de Pulmonata tem estruturas atípicas, e parece que os RNAt sofrem processos pós-transcrição, para restaurar as bases emparelhadas do braço aceitador (Yokobori & Paabo 1995). Nas estruturas secundárias de *B. tenagophila* o RNAt^{Asp} apresentou um erro no emparelhamento e o RNAt^{Val} apresentou três erros no emparelhamento nesta região.

Entretanto, alguns autores desenharam estruturas secundárias para os RNAts de moluscos Pulmonata (Yamazaki et al. 1997, Knudsen et al. 2006). Estas estruturas (Fig.

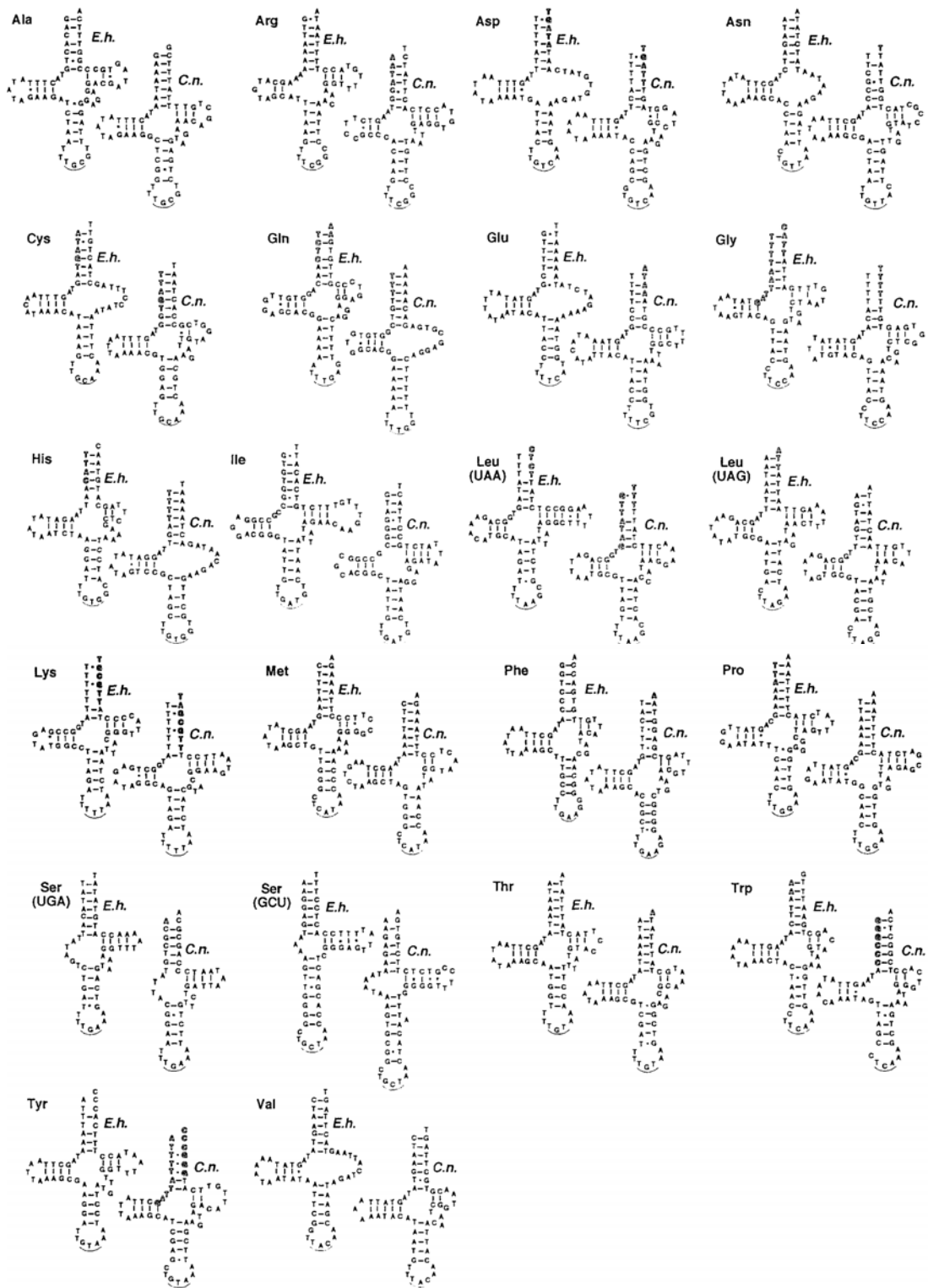


Figura 6.62 - Estruturas secundárias de RNAt de *E. herklotsi* (direita), *C. nemoralis* (esquerda) (Yamazaki et al 1997).

6.62) foram muito parecidas com as estruturas desenhadas para o seis RNAs de *B. tenagophila* (Fig. 5.55).

A localização dos RNAs de *B. tenagophila* foi idêntica a de *B. glabrata*. A comparação estrutural entre os RNAs de *B. tenagophila* e *B. glabrata* não mostraram diferenças relevantes. Além disso, os anticódons utilizados para as duas espécies foram os mesmos (Tabela 12), com exceção do RNA^{Gln} de *B. glabrata*, cujo anticódon publicado no GenBank (CCA) não corresponde ao do RNA^{Gln}.

Por outro lado, os genes do RNA ribossomal são compostos por duas subunidades: a menor, denominada RNAr 12S e a maior, RNAr 16S. A diferença no tamanho do gene do RNAr 16S nos organismos é aceitável, uma vez que não há o comprometimento das bases em formar os códons, mas apenas em formar uma estrutura secundária adequada para sua função (Wolstenholme 1992). Entretanto, não houve diferença no tamanho do RNAr 16S e nem do RNAr 12S entre estas duas espécies. O RNAr 16S apresentou um identidade maior do que o RNAr 12S quando comparado com *B. glabrata*.

Parte da região do RNAr 16S foi utilizada em estudo de análise filogenética de Cephalopoda (Bonnaud et al. 1994,1996,1997). Estes estudos mostraram a monofilia dos Sepiidae (Cephalopoda). As seqüências parciais de 12S, COI, e 16S também foram utilizadas em estudos de filogenia de Cephalopoda (Yoshida et al. 2006).

A ordem dos genes no DNA mitocondrial de animais tende a ser conservada nos níveis mais altos da taxonomia (filo). Conseqüentemente, quando o rearranjo dos genes ocorre, eles podem fornecer marcadores de ancestralidade na história filogenética (Saccone et al. 1999). Tal característica tem comprovado ser útil para resolver divisões caracterizando superfilo, filo e classe, divisões estas que a análise de seqüências de nucleotídeos tem problemas em resolver (Boore et al. 1995). Entretanto, freqüentemente, estes rearranjos são associados com o movimento dos RNAs que permitem um papel de elemento móvel dentro do genoma mitocondrial (Saccone et al. 1999).

A organização destes genes tem sido utilizada por vários autores para conhecer a filogenia de Mollusca (Yamazaki et al. 1997, Kurabayashi & Ueshima 2000, Bandyopadhyay et al. 2006). Knudsen et al. (2006) realizaram um trabalho filogenético mais completo, analisando a ordem de genes de moluscos utilizando representantes das classes Gastropoda, Polyplacophora, Cephalopoda, Scaphopoda e Bivalvia (Fig. 6.63).

Estes autores mostraram que, na classe Gastropoda, os Euthyneura (Opisthobranchia e Pulmonata) apresentaram a mesma ordem gênica, com exceção do *Cepaea*, em que o COIII o NAD4 tiveram a sua posição trocada, enquanto os genes de RNAt tiveram uma variação de localização maior entre organismos deste grupo. Quando comparamos a ordem gênica de *B. tenagophila* com a de *B. glabrata* (Fig. 5.58) verificamos que foi a mesma para ambas espécies, tanto para os genes de proteínas quanto para os genes dos RNAs. Podemos com este resultado reforçar a hipótese que os Pulmonata e os Opisthobranchia apresentam a mesma ordem gênica. Entre as outras classes estudadas os autores encontraram mudanças na ordem gênica (Fig. 6.63).

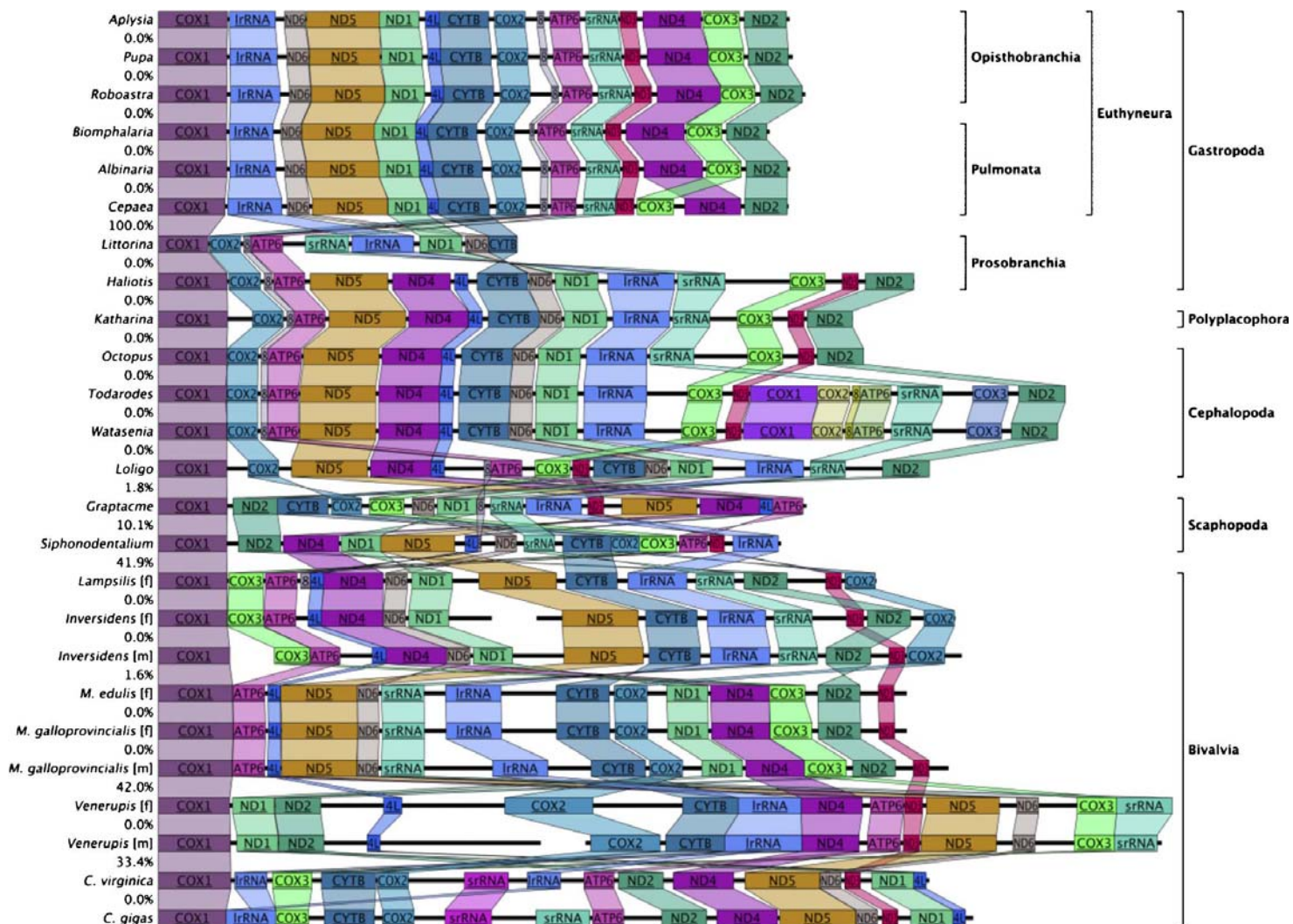


Figura 6.63 – Ordem dos genes das proteínas e dos RNAr do genoma mitocondrial de moluscos (Knudsen et al. 2006)

A reconstrução filogenética consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos (táxa). A história evolutiva inferida pelas análises filogenéticas é geralmente representada através de árvores (árvores filogenéticas) que retratam, a partir de seus ramos, o agrupamento entre os organismos analisados sendo que, os organismos que se encontram em um mesmo grupo são mais relacionados entre si. As características utilizadas para construção da árvore podem ser fenotípicas ou seqüências de aminoácidos, ou de pares de base. As análises filogenéticas na biologia molecular consistem em quatro passos: alinhamento das seqüências, determinação do modelo de cálculo a ser usado, construção de árvore filogenética e avaliação dessa árvore.

Segundo Swofford et al. (1996), Pereira et al. (2001) e Scheneider (2003) os métodos de construção de árvores filogenéticas podem ser baseadas em: matrizes de distância ou em análise de estados de caráter. No primeiro caso, estão os métodos de agrupamento de pares não ponderados, baseados na média aritmética UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*), quadrados mínimos, evolução mínima e agrupamento de vizinhos (NJ, *neighbor-joining*). No segundo estão os métodos de máxima parcimônia (MP, *maximum parsimony*), máxima verossimilhança (ML, *maximum likelihood*) e da inferência Bayesiana (IB, Bayesian Inference).

Em nosso estudo a reconstrução filogenética dos moluscos foi realizada utilizando o alinhamento das seqüências de proteínas (exceto ATP8) de todo o genoma mitocondrial, utilizando os métodos de inferência de agrupamento de vizinhos *neighbor-joining* (NJ), máxima verossimilhança (ML, *maximum likelihood*) e da máxima parcimônia (MP). As seqüências da proteína ATP8 não foram utilizadas, uma vez que os moluscos *Crassostrea virginica*, *Mytilus trossulus*, *Placopecten magellanicus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* não possuem gene que codifica essa proteína no DNAm.

O agrupamento de vizinhos (NJ) (Saitou & Nei 1987) é baseado no princípio da evolução mínima no qual a árvore com a menor soma total de ramos é procurada (Li 1997), utilizando algoritmos no cálculo da distância genética. Entretanto, remove a premissa que os dados sejam ultramétricos, isto é, que as taxas evolutivas dos caracteres sejam iguais para os organismos analisados.

O princípio básico da máxima verossimilhança (ML) consiste em estimar a probabilidade, com base em um determinado modelo, de um conjunto de dados estarem

representando um processo que realmente ocorreu. Em termos de evolução de seqüências de DNA ou aminoácidos, o método irá calcular a probabilidade de que aquelas seqüências em estudo tenham sido geradas seguindo as premissas do modelo evolutivo escolhido. Nesse caso, a topologia e o comprimento dos ramos de uma árvore são parâmetros a serem estimados, dadas as seqüências finais nas extremidades dos ramos. A probabilidade deve ser calculada para todas as topologias possíveis, variando o tamanho dos ramos para um grupo de unidades taxonômicas operacionais (OTU) (espécies, gênero, populações, genes ou qualquer outra unidade evolutiva). A árvore que apresentar a maior verossimilhança (probabilidade) é considerada a melhor estimativa da filogenia. O número de árvores filogenéticas geradas aumenta exponencialmente com o número de taxa. Entretanto, quando na análise é utilizado um grande número de taxa e de genes, nem todas as árvores possíveis podem ser vistas, em função da enorme exigência computacional.

A máxima parcimônia (MP) assume que a evolução ocorre pelo caminho mais curto e envolve a identificação de árvores que minimizem a quantidade de mudanças evolutivas necessárias para explicar as diferenças existentes entre as OTUs. Este método utiliza o princípio da homologia, ou seja, se dois taxa compartilham uma característica é porque essa foi herdada do último ancestral comum a ambos. Ainda que a evolução possa não ser sempre estritamente parcimoniosa, o método assume que o critério da parcimônia determina o maior número de acertos da árvore verdadeira quando se minimiza o número de passos evolutivos aceitos na árvore.

Um teste para dar suporte aos resultados gerados, pelos métodos acima mencionados, é conhecido como *bootstrap* (Felsenstein 1985). Este método estatístico dá validade às árvores geradas realizando uma re-amostragem dos dados. A frequência com que um ramo é encontrado durante a análise é registrada como valor de *bootstrap* (0 a 100%) e reflete o nível de confiança em que está apoiado cada ramo.

A escolha do *outgroup* é importante. O *outgroup* deve ser qualquer espécie ou táxon que não pertence ao grupo monofilético sob estudo em uma análise filogenética. Essa escolha deve ser criteriosa, de modo a minimizar o impacto de longos ramos das árvores, que podem alterar a relação entre os táxons. Os grupos externos são usados para enraizar a árvore.

Neste estudo as topologias das árvores obtidas utilizando os diferentes métodos (NJ, MP, ML) foram semelhantes. As três árvores dividiram-se em cinco grupos. Nas

árvores ML e MP, o primeiro grupo foi formado por: exemplares da classe Bivalvia, um exemplar da classe Scaphopoda (Gadelida) e um exemplar da classe Gastropoda (Prosobranchia). Na árvore NJ a diferença que ocorreu no grupo I, foi que o exemplar da classe Scaphopoda (Gadelida), se posicionou em outro grupo (III). O único exemplar da classe Bivalvia que não se posicionou no grupo I, é um molusco de água doce e tem o gene codificador para a proteína ATP8 no DNAm, os demais exemplares da classe Bivalvia são marinhos e não possuem este gene no DNAm. Os exemplares da classe Gastropoda posicionaram-se em grupos diferentes, sendo que os exemplares da sub-classe Opisthobranchia e os da sub-classe Pulmonata agruparam-se em um grupo (II), e a maioria dos Prosobranchia posicionaram-se no grupo V, sendo que apenas um exemplar da sub-classe Prosobranchia sempre posicionou-se no grupo dos Bivalvia (I). Este molusco apresenta um DNAm muito maior do que dos outros Prosobranchia, com regiões repetitivas. Realmente, o tamanho do DNAm deste Prosobranchia (26.836 pb) é mais parecido com os dos Bivalvia. Além disto, este molusco só apresenta 20 genes codificando RNAt, enquanto os outros moluscos Prosobranchia apresentam 22 genes. Estes resultados mostram que Gastropoda é um grupo parafilético. Houve um grupo que mostrou-se constante em todas as árvores, foi aquele composto por exemplares da classe Cephalopoda, grupo IV, mostrando ser um grupo monofilético. O valor do *bootstrap* encontrado nas árvores foi alto, mostrando a confiabilidade destes resultados. Nas três árvores o grupo III foi formado por exemplares da classe Scaphopoda (Gadelida) e um exemplar da classe Bivalvia de água doce, sendo este grupo basal aos grupos I e II. O grupo V (Gastropoda-Prosobranchia) foi o grupo basal dos outros quatro grupos e independentemente da árvore foi formado por exemplares da Classe Gastropoda (sub-classe Prosobranchia). O *outgroup* utilizado no estudo filogenético foi a *Katarina tunicata* (Polyplacophora), uma vez que este molusco possui características morfológicas distintas dos demais moluscos estudados e pertence a um grupo parafilético.

Analisando a *B. tenagophila* podemos inferir que este molusco posicionou-se em um ramo junto com *B. glabrata*, entretanto, ambos encontram-se mais próximos dos Opisthobranchia do que dos demais Pulmonata estudados, com valor do *bootstrap* alto (98% e 100%). Com este resultado podemos dizer que Pulmonata é um grupo parafilético, ao contrário dos Opisthobranchia que posicionaram-se todos em um único ramo mostrando ser um grupo monofilético. Resultado semelhante foi obtido para os

Euthyneura (Opisthobranchia + Pulmonata). Os moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* mostraram constituir grupo irmão dos Opisthobranchia.

Se analisarmos os resultados obtidos com as três árvores utilizando seqüências dos aminoácidos do DNAm com o cladograma obtido com os caracteres morfológicos (Fig. 1.7), podemos observar resultados diferentes. No cladograma os Gastropoda estão próximo dos Cephalopoda, e o Bivalvia dos Scaphopoda. Nas árvores obtidas no nosso estudo os Cephalopoda estão mais próximos dos Gastropoda, Prosobranchia e distante dos Gastropoda Euthyneura, e os Bivalvia estão mais próximos dos Euthyneura, entretanto o valor de *bootstrap* que sustentou este agrupamento foi baixo 56% (NJ), 55% (ML) e 64% (MP).

Knudsen et al. (2006) estudaram a filogenia de moluscos utilizando seqüências completas de aminoácidos de todas as proteínas mitocondriais (exceto ATP8), mostrando que o molusco *B. glabrata* posicionou-se em um ramo separado dos Pulmonata (*Albinaria* e *Cepaea*) (Fig.1.8), suportando a hipótese dos Pulmonata serem um grupo parafilético e, a ordem Basommatophora, como taxa irmão dos Opisthobranchia. Mostraram ainda que os Opisthobranchia e os Euthyneura compõem grupo monofilético. Estes resultados foram confirmados no nosso trabalho, quando acrescentamos mais um Pulmonata, o *B. tenagophila*.

Podemos observar que a nossa árvore foi muito semelhante à árvore obtida por Knudsen et al. (2006) (Fig.1.8), que também utilizou seqüências de aminoácidos do DNAm, apesar dos exemplares de moluscos não serem os mesmos.

Vários outros autores estudaram a filogenia deste filo. Lydeard et al. 2000 utilizaram seqüências dos genes do RNAr 16S de moluscos em estudos filogenéticos utilizando a máxima parcimônia. Quando os bivalvia foram colocados como grupo externo, os dados encontrados agruparam em um clado Cephalopoda e Gastropoda e não colocaram os Gastropoda como um grupo monofilético. Entretanto estes autores utilizaram somente dois Gastropoda e dois Cephalopoda nos seus estudos, além de analisarem apenas uma região do DNAm.

Alguns estudos filogenéticos utilizam como fonte de dados seqüências de nucleotídeos, entretanto, as seqüências de aminoácidos são consideradas mais úteis para comparação entre organismos e inferências filogenéticas do que as seqüências de nucleotídeos por serem imunes as substituições sinônimas, e, portanto menos influenciadas por altas taxas de mutação (Foster et al. 1997). Diante disso, vários

pesquisadores vêm utilizando seqüências de aminoácidos para inferir filogenia dos organismos.

Grande et al. 2004 amplificaram uma região do DNAm (COI-parcial, rrnL, NAD6-completa, NAD5-parcial) de Gastropoda. Estes autores utilizaram as seqüências dos aminoácidos desta região para inferir a filogenia dos Euthyneura (Opisthobranchia + Pulmonata). O resultado encontrado rejeitou a monofilia dos Opisthobranchia, Pulmonata e Euthyneura. Entretanto, os Pulmonata são considerados, de acordo com dados morfológicos (presença de pulmão, muitas espécies tem concha, embora esta possa estar modificada ou ausente em alguns grupos), como grupo monofilético

Entretanto, Whelan et al. 2001 ressaltam que recentes pesquisas utilizando o genoma mitocondrial têm tido resultados mais precisos do que análises feitas baseadas somente em genes mitocondriais individuais.

Em função do exposto, podemos concluir que a relação filogenética do filo Mollusca é de definição complexa, devido a grande diversidade entre os organismos que o compõe e ao número de variações no arranjo gênico, quando comparado com outros grupos. Portanto, para melhor compreendermos a relação filogenética deste filo será necessário que um número maior de espécies de moluscos seja seqüenciado.

7 - CONCLUSÕES

- O tamanho do DNAMt de *B. tenagophila* é 13.722 pb.
- O DNAMt de *B. tenagophila* codificou o mesmo número de genes da maioria dos organismos isto é : dois genes para o RNAr, 13 genes para proteína e 22 genes para RNAt.
- *B. tenagophila* possui mais regiões não codificantes do que *B. glabrata*
- Existem 19 regiões de sobreposição entre genes do DNAMt de *B. tenagophila*.
- Existem quatro códons de iniciação (ATT, ATA, ATG e TTG) e dois códons de parada (TAA e TAG).
- Nos genes ATP8, ATP6, NAD2, NAD4 e COIII o códon de parada é completado por adição de A durante a transcrição do RNAm.
- A organização dos genes mitocondriais de *B. tenagophila* e *B. glabrata* é a mesma.
- Nas três árvores filogenéticas a sub classe Pulmonata é parafilética.
- Os moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* são grupo irmão dos moluscos da sub classe Opisthobranchia.
- A sub classe Opisthobranchia é monofilético.

8- PUBLICAÇÕES DE TRABALHOS DESENVOLVIDOS PARALELAMENTE A TESE

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(Suppl. I): 247-251, 2006 247

***Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite**

Florence Mara Rosa, Ana Lúcia Brunialti Godard*, Deborah Negrão-Correa, Horácio Antonio Rodrigues*, Omar dos Santos Carvalho**, Roberta Lima Caldeira**, Horácio Manoel Santana Teles*** Engels Maciel****, Liana Konovaloff Jannotti-Passos**, Paulo Marcos Zech Coelho**/*****/+

Departamento de Parasitologia *Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil **Centro de Pesquisas René-Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil ***Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ****Chácara Santa Inês, Bananal, SP, Brasil *****Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(Suppl. I): 167-177, 2006 167

A bacterial artificial chromosome library for *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*

Coen M Adema/+, Mei-Zhong Luo*, Ben Hanelt, Lynn A Hertel†, Jennifer J Marshall, Si-Ming Zhang, Randall J DeJong/++ , Hye-Ran Kim*, David Kudrna*, Rod A Wing*, Cari Soderlund**, Matty Knight***, Fred A Lewis***, Roberta Lima Caldeira****, Liana K Jannotti-Passos****, Omar dos Santos Carvalho****, Eric S Loker

Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM, US *Arizona Genomics Institute, Department of Plant Sciences **Arizona Genomics Computational Laboratory, BIO5 Institute, University of Arizona, Tucson, US ***Biomedical Research Institute, Rockville, MD, US ****Laboratório de Helmintos Intestinais, Centro de Pesquisas René-Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil

Parasite Immunology, 2006, 28, 209–212

DOI: 10.1111/j.1365-3024.2006.00827.x

Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*

L. BARBOSA,¹ R. L. CALDEIRA,² O. S. CARVALHO,² T. H. D. A. VIDIGAL,³ L. K. JANNOTTI-PASSOS² & P. M. Z. COELHO^{2,4}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, ²Centro de Pesquisas 'René Rachou', Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil, ³Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, ⁴Santa Casa de Misericórdia, Belo Horizonte, MG, Brazil

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(Suppl. I): 179-184, 2006 179

***Biomphalaria* spp. (Preston, 1910) snails in the municipality of Juiz de Fora, Zona da Mata Mineira mesoregion, state of Minas Gerais, Brazil**

Sandra Helena Cerrato Tibiriçá^{+/}, Elisabeth Cristina Almeida Bessa, Adalberto Mitherofohe^{*}, Milton Ferreira de Castro^{*}, Omar dos Santos Carvalho^{**}, Roberta Lima Caldeira^{**}, Liana Konovaloff Jannotti Passos^{**}, Ana Márcia Menezes de Mattos^{***}, Liliâne Sena Pinheiro^{***}, Dirany Sacramento e Silva^{***}, Fabiana Oliveira Bastos^{***}, Gabriela Quirino Andreoli^{***}, Glauco Resende Bonato^{***}, Elaine Soares Coimbra^{***}

Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal ^{***}Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brasil
^{*}Diretoria de Ações Descentralizadas da Saúde/Juiz de Fora, Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil ^{**}Laboratório de Helminthoses Intestinais, Centro de Pesquisas René-Rachou-Fiocruz,

J. Parasitol., 92(2), 2006, pp. 401-403
© American Society of Parasitologists 2006

Multiplex PCR for both Identification of Brazilian *Biomphalaria* Species (Gastropoda: Planorbidae) and Diagnosis of Infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae)

Liana K. Jannotti-Passos, Kelly Grace Magalhães, Omar S. Carvalho, and Teofânia H. D. A. Vidigal^{*}, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil; ^{*}Laboratório de Malacologia e Sistemática Molecular, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas-UFGM, Belo Horizonte, Brazil. e-mail: passos/k@cpqrr.fiocruz.br

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(Suppl. I): 109-111, 2004 109

***Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* Interaction: Premises for a New Approach to Biological Control of Schistosomiasis**

PMZ Coelho/^{****}+/ , OS Carvalho, ZA Andrade^{*}, RL Martins-Sousa^{**}, FM Rosa^{**}, L Barbosa^{**}, CAJ Pereira^{**}, RL Caldeira, LK Jannotti-Passos, ALB Godard^{***}, LA Moreira, GC Oliveira^{****}, GR Franco, HMS Teles^{****}, D Negrão-Corrêa^{**}

Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil ^{*}Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Salvador, BA, Brasil ^{**}Departamento de Parasitologia ^{***}Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil ^{****}Superintendência de Endemias do Estado de São Paulo, SP, Brasil ^{*****}Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(5): 499-502, August 2004 499

Diagnostic of *Biomphalaria* Snails and *Schistosoma mansoni*: DNA Obtained from Traces of Shell Organic Materials

Roberta L Caldeira, Liana K Jannotti-Passos, Pollanah M Lira, Omar S Carvalho⁺

Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akasaki T, Nikaido M, Tsuchiya K, Segawa S, Hasegawa M, Okada N. Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 38 (3): 648-658.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell* 1994; Garland Publishing, Inc, New York
- Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 79-85.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Che E, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome *Nature* 1981; 290: 457-465.
- Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol* 1982; 156: 683-717.
- Avise JC. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans R Soc Lond B* 1986; 312: 325-342.
- Avise JC, Giblin-Davidson C, Laerm J, Patton JC, Lansman RA. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc Natl Sci USA* 1979; 76(12): 6694-6698.
- Bandyopadhyay PK, Stevenson BJ, Cady MT, Olivera BM, Wolstenholme DR. Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod *Lophiotoma* (*Xenuroturris*) *cerithiformis*: gene order and gastropod phylogeny. *Toxicon* 2006; 48: 29-43.
- Barbosa L. Transferência de resistência ao *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria tenagophila* por transplante do órgão hematopoiético de linhagem resistente (Taim, RS) para linhagem suscetível (Cabo Frio, RJ). Dissertação de Mestrado defendida no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais 2001
- Barbosa FS, Coelho MV. Alguns aspectos epidemiológicos relacionados com a transmissão da esquistossomose em Pernambuco, Brasil. *Publ Avulsas do Cento de Pesquisas Aggeu Magalhães* 1956; 5: 31-47.

- Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK, Coelho PM. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO in *Biomphalaria tenagophila*. Parasite Immunology 2006; 28: 209-212.
- Barrel BG, Anderson S, Bankier AT, de Bruijn MHL, Chen E, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77: 3164-3166.
- Baxter ML. Counting angels with DNA. Nature 2003; 421: 122-124.
- Bermingham E, Martin AP. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. Mol Ecol 1998; 7(4): 499-517.
- Bezerra FSM, Machado JA, Martins RL, Chaves MM, Correa RF, Coelho PMZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant in *Biomphalaria tenagophila* snails to the parasite. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 73-75.
- Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell 1981; 26: 167-180.
- Bonnaud L, Boucher-Rodoni R, Monnerot M. Phylogeny of decapod cephalopds based on partial 16S rDNA nucleotide sequences. C R Acad Sci III 1994; 317: 581-588.
- Bonnaud L, Boucher-Rodoni R, Monnerot M. Relationship of some coleoid cephalopods established by 3' end of the 16S rDNA and cytochrome c oxidase III gene sequence comparison. Am Malacol Bull 1996; 12: 87-90.
- Bonnaud L, Boucher-Rodoni R, Monnerot M. Phylogeny of cephalopds inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 1997; 7: 44-54.
- Boore JL, Brown WM. Mitochondrial genomes and phylogeny of mollusks. Nautilus 1994a; (Suppl.2): 61-78.
- Boore JL, Brown WM. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. Genetics 1994b; 138(2): 423-443.
- Boore JL, Collins TM, Stanton D, Daehler LL, Brown WM. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitocohodnrrial DNA rearrangements. Nature 1995; 376: 163-165.
- Boore, JL. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus macromphalus* (Mollusca: Cephalopoda). BMC Genomics 2006; 7(1): 182.

- Boore, JL. Survey and summary animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1767-1780.
- Boore JL, Medina M, Rosenberg LA. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the Bivalve *Mytilus edulis*. *Mol Biol Evol* 2004; 21(8): 1492-1503.
- Breton S, Burger G, Stewart DT, Blier PU. Comparative analysis of gender-associated, complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics* 2006; 172(2): 1107-1119.
- Brown DS. Freshwater snails of Africa and their medical importance, 2ed., Taylor & Francis, London, 1994; 609 p.
- Brown GC, Simpson MV. Intra and interspecific variation in the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics* 1981; 97: 125-143.
- Brown WM, George MJr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 1967-1971.
- Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrados 2ed. Guanabara Koogan; 2007.
- Cao L, Kenchington E, Zouros E, Rodakis GC. Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics* 2004; 167(2): 835-850.
- Campbell G, Jones CS, Lockyer AE, Hughes S, Brown D, Noble LR, Rollinson D. Molecular evidence supports an african affinity of the neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc Biol Sci* 2000; 267: 2351-2358.
- Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância média no Brasil. Série Esquistossomose nº 7. FIOCRUZ/ Centro de Pesquisas René Rachou 52 p; 2005.
- Chen WJ, Bonillo C, Leointre G. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanatomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Mol Phylogenet Evol* 2003; 26: 262-288.
- Cheng S, Chang Sheng-Yung, Gravitt P, Respass R. Long PCR. *Nature* 1994; 369: 684-685.

- Clamp M, Cuff J, Searleand SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics applications note* 2004; 20: 426–427.
- Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence gene organization, and genetic code. *J Mol Evol* 1985; 22: 252-271.
- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:2777-2781.
- Clark TL, Meinke LJ, Foster JE. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bull Entomol Res.* 2001; 91: 419-427.
- Coelho JR, Bezerra FS. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(1):111-112.
- DeJong RJ, Morgan JAT, Paraense WL, Pointier JP, Amarista M, Ayeh-Kumi PFK, Babiker A, Barbosa CS, Brémond P, Canese AP, Souza CP, Dominguez C, File S, Gutierrez A, Incani RN, Kawano T, Kazibwe F, Kpikpi J, Lwambo NJS, Mimpfoundi R, Njiokou F, Poda JN, Sene M, Velásquez LE, Yong M, Adema CM, Hofkin BV, Mkoji GM, Loker ES. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol* 2001; 18(12): 2225-2239.
- Dejong RJ, Morgan JAT, Wilson WD, Al-Jaser MH, Appleton CC, Coulibaly G, D'Andrea PS, Doenhoff MJ, Haas W, Idris MA, Magalhães LA, Moné H, Mouahid G, Mubila L, Pointier JP, Webster JP, Zanotti-Magalhães EM, Paraense WL, Mkoji GM, Loker ES. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. *Mol Ecol* 2003; 12: 3041-3056.
- DeJong RJ, Emery AM, Adema CM. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 2004; 90(5): 991-997.
- Després L, Imbert-Establet D, Combes C, Bonhomme F, Monnerot M. Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 47: 139-142.

- Dreyer H, Steiner G. The complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the gadilid scaphopod *Siphonodontalium lobatum* (Mollusca). *Mol Phylogenet Evol* 2004; 31(2): 605-617.
- Ewing B, Green P. Genome Res. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. 1998; 8(3):186-194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment: *Genome Res* 1998; 8(3): 175-185.
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-791.
- Ferris SD, Sage RG, Huang GM, Nielsen JT, Ritte U, Wilson AC. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2290-2294.
- Folmer O, Blacj M, Hoech W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biot* 1994; 3: 294-299.
- Foster, PG, Jermim, LS, Hickey, DA Nucleotide composition bias affects amino acids content in proteins coded by animal mitochondria. *J Mol Evol*, 1997; 44: 282-288.
- Freitas JR, Boschi MB, Santos MBL. Suscetibilidade de “híbridos” de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1985; 1: 6-12.
- Garesse R. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* 1988; 118(4): 649-663.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Sci USA* 1980; 77(11): 6715-6719.
- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Res* 1998; 8(3): 195-202.
- Gotting, KJ. Malakozologie. Grundriss der Weichtierkunde. Stuttgart: Gustav Fisher, 1974; 320p.
- Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R. The complete mitochondrial genome of the Nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of Opisthobranchs. *Mol Biol Evol* 2002; 19(10): 1672-1685.
- Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R. Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda). *Mol Biol Evol* 2004; 21(2): 303-313.

- Grassé P P. *Traité de Zoologie*. Paris: Masson, 1960-1968. 1960; 2: 1151-2209.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52: 696-704.
- Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol* 1989; 46: 06-11.
- Hatzoglou E, Rodakis GC, Lecanidou R. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 1995; 140: 1353-1366.
- Hills DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology* 1993; 42:182-192.
- Hoffman RJ, Boore JL, Rown WM. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 1992; 131: 397-412.
- Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. Heteroplasmy suggest limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* 1991; 251:1488-1490.
- Hyman, LH. *Mollusca I: Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda, the coelomate Bilateria*. New York: McGraw-Hill, (Serie: The Invertebrates, v.6)1967; 792p.
- James RA, Leberg PL, Quattro JM, Vrijenhoek RC. Genetic diversity in black howler monkeys from Belize. *Am J Phys Anthropol* 1997; 102(3): 329-336.
- Jones CS, Rollinson D, Mimpfoundi R, Ouma J, Kariuki HC, Noble LR. Molecular evolution of freshwater snail intermediate hosts within the *Bulinus forskalii* group. *Parasitol.* 2001;123 :277-292.
- Knudsen B, Kohn AB, Nahir B, McFadden CS, Moroz LL. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea-slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura. *Mol Phylogenet. Evol* 2006; 38(2): 459-469.
- Kocher, TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6196-6200.
- Kurabayashi A, Ueshima R. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization. *Mol Biol Evol* 2000; 17 (2): 266-277.
- La Roche J , Snyder M, Cook DI, Fuller K, Zouros E. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Mol Biol Evol* 1990; 7(1): 45-64.

- Lagerkvist U. Unorthodox codon reading and the evolution of the genetic code. *Cell* 1981; 23: 305-306
- Lansman RA, Shade RO, Shapira JF, Avise JC. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J Mol Evol* 1981; 17: 214-226.
- Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair PF, Campbell NJ, Iwagami M, Littlewood DT, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Rollinson D, Herniou EA, Zarlenga DS, McManus DP. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders—a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol Biol Evol* 2000; 17 (7): 1123-1125.
- Lecanidou R, Douris V, Rodakis GC. Novel features of metazoan mtDNA revealed from sequence analysis of three mitochondrial DNA segments of the land snail *Albinaria turrita* (Gastropoda: Clausiliidae). *J Mol Evol* 1994; 38(4): 369-82.
- Li WH. *Molecular evolution* Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 1997.
- Lower TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 955-964.
- Lydeard C, Holznagel WE, Glaubrecht M, Ponder WF. Molecular phylogeny of a circum-global, diverse gastropod superfamily (Cerithioidea: Mollusca: Caenogastropoda): pushing the deepest phylogenetic limits of mitochondrial LSU rDNA sequences. *Mol Phylogenet. Evol* 2002; 22: 399-406.
- Lydeard C, Holznagel WE, Schnare MN, Gutell RR. Phylogenetic analysis of molluscan mitochondrial LSU rDNA sequences and secondary structures. *Mol Phylogenet Evol* 2000; 15: 83-102.
- Malek EA. Snails hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases In *Tropical America: a manual*. Pan American Health Organization, Scientific Publication, 1985; 478: 325.
- Mandahl-Barth G. Intermediate hosts of *Schistosoma*. African *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Bull WHO* 1957; 16: 1103-1163.
- Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PM, Negrão-Correa D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 2003; 91(6): 500-507.
- Maynard BT, Kerr LJ, McKiernan JM, Jansen ES, Hanna PJ. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backpack abalone *Haliotis rubra* (leach). *Mar Biotechnol* 2005; 7(6): 645-658.

- Milbury CA, Gaffney PM. Complete mitochondrial DNA sequence of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Mar Biotechnol 2005; 7(6): 697-712.
- Moritz C, Brown WM. Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: Variation in incidence and gene content among lizards. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 1987; 84: 7183-7187.
- Moritz C, Herdeman A, Geffen E, McRae P. Genetic population structure of the greater Bilby *Macrotis lagotes*, a marsupial in decline. Mol Ecol 1997; 6(10): 925-936.
- Okimoto R, Chamberlin HM, Macfarlane JL, Wostenholme DR. Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root knot nematodes (Meloidogyne): nucleotide sequences, genome localization and potencial for host-race identification. Nucl Acids Res 1991; 19:1619-1626.
- Palumbi SR. Nucleic acids II: The Polymerase Chain Reaction . In: DM Hillis, C Moritz, BK Mable (eds). Molecular Systematics .Sinauer Associates, Sunderland.1996; 233 p.
- Paraense WL. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1955; 53: 285-291.
- Paraense WL. Apertural lamellae in *Australorbis glabratus*. Proc Malacol Soc London 1957; 32:175-179.
- Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil . In Introdução à geografia médica do Brasil (Lacaz, C. S., Baruzzi, G. R. & Siqueira J. R., W., eds.), Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo cap. 1972; 10: 213-239.
- Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq Mus Nac Rio de Janeiro 1975; 55:105-128.
- Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. (Reis, F.A., Faria, I. & Katz, N., eds.), Biblioteca da Academia Mineira de Medicina 1986; 14: 117-128.
- Paraense WL. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 357-362.
- Paraense WL, Corrêa L. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop S Paulo 1963; 5: 15-22.
- Paraense WL, Corrêa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1978; 64(5): 822-826.

- Pellon AB, Teixeira I. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Divisão de Organização Sanitária, Rio de Janeiro 1950.
- Pereira SL, Miyaki CY, Russo CAM. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos, p. 117-129. In : Mاتيoli SR. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Editora, Ribeirão Preto, SP 2001; 202p.
- Pires ER, Vidigal TDHA, Teles HMS, Simpson JGA, Carvalho OS. Specific identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* populations by the Low Strngency Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92(1): 101-106.
- Rawlings TA, Collins TM, Bieler R. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. *Mol Biol Evol* 2001; 18(8):1604-1609.
- Richards CS. Apertural lamellae, epiphragms, and a estivation of planorbid mollusks. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12: 254-263.
- Rios EC. *Seashells of Brazil*. 2 ed., Rio Grande, RS: Furg1994; 492p.
- Rosa FM. *Biomphalaria tenagophila*: Estudos parasitológicos, genéticos e moleculares em descendentes do cruzamento entre linhagens resistente (Taim - RS) e susceptível (Joinville - SC) ao *Schistosoma mansoni*. Dissertação de Mestrado defendida no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais 2002.
- Rosa FM, Caldeira, RL, Carvalho OS, Godard ALB, Coelho PMZ. Dominant character of the marker of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae) strain, resistant to *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 85-87.
- Rosa FM, Godard AL, Azevedo V, Coelho PM. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville,SC) strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(1): 19-23.
- Rosa FM, Godard ALB, Negrão-Correa D, Rodrigues HA, Carvalho OS, Caldeira, RL, Teles HMS, Maciel E, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. *Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 247-251.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 2000; 16(10): 944-945.

- Saccone C, De giorgi C, Gissi G, Pesole e Reyes A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 1999; 238:195-209.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-425.
- Santos MBL, Freitas JR, Correa MCR, Coelho PMZ. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RGS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1979; 21: 281-286.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniats T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- Saraste, M. Structural features of cytochrome oxidase. *Q. Rev.Biophys* 1990; 23: 331-336.
- Schneider H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. 2nd ed., Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. 2003; 114p.
- Serb JM, Lydeard C. Complete mtDNA Sequence of the North American Freshwater Mussel, *Lampsilis ornata* (Unionidae): An Examination of the Evolution and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Genome Organization in Bivalvia (Mollusca). *Mol Biol Evol* 2003; 20(11): 1854-1866.
- Simison WB, Lindberg DR, Boore JL. Rolling circle amplification of metazoan mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 39(2): 562-567.
- Simon C, Paabo S, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of mitochondrial ribosomal RNA in insects as shown by the polymerase chain reaction. In M. Clegg and S. O'Brien. 1990; 235-244.
- Simonsen BT, Siegismund HR, Arctander P. Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequence and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Mol Ecol* 1998; 7(2): 225-237.
- Souza CP, Jannotti-Passos LK, Freitas JR 1995. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90(1):5-10.
- Spatz L, Vidigal THDA, Caldeira RL, Dias Neto E, Gonzalez Cappa SM. Carvalho OS.. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. *J Moll Stud* 1999; 65: 143-149.

- Stothard JR, Rollinson D 1997. Partial sequence from cytochrome oxidase subunit (COI) an differentiate *Bulinus globosus* and *B. nasatus*. Jour Nat.cHist. 31:727-737.
- Swofford DL. Paup*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, (* and other metodhs). Versin 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts 2002.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis M. Phylogenetic inference, p. 407-514. In Hillis DM, Mortiz C, Mable BK. Molecular Systemetics 2nded. , Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, xvi 1996; 655p.
- Thiele J. Handbuch der systematischen Weichtierkunde. Jena: Fischer 1929-1935; 1154p.
- Thiele, J. Handbook of systematic Malacology. 2 parts. Trad. Bieler,r; Mikkelsen, PM Washington, DC: Smithsonian Institution Libraries/ The National Science Foundation, 1992; 1189p.
- Terrett J, Miles S, Thomas RH. Complete DNA sequence of mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmontata).J Mol Evol 1996; 42:160-168.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, 1994; 22(22): 4673-4680.
- Tomita K, Ueda T, Watanabe K. 7-Methylguanosine at the anticodon wobble position of squid mitochondrial tRNA(Ser)GCU: molecular basis for assignment of AGA/AGG codons as serine in invertebrate mitochondria. Biochim Biophys Acta 1998; 1399(1): 78-82.
- Vidigal TH, Montresor LC, Simpson AJ, Carvalho OS. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase subunit I used for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 Suppl 1:47-52.
- Warrior R, Gall J. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* e *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. Arch Sci Geneva 1985; 38: 439-445.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. Molecular Biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California 1987.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 1953; 171: 737-738.

- Whelan S, Goldman N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* 2001; 18: 691-699.
- Whelan S, Lio P, Goldman N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genet* 2001; 17(5): 262-72.
- Wolstenholme DR, Dawid IG. A size difference between mitochondrial DNA molecules of urodele and anuran amphibians. *J Cell Biol* 1968; 39: 222-228.
- Wostenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology* 1992; 141: 173-216.
- Yamazaki N, Ueshima R, Terrett JA, Yokobori S, Kaifu M, Segawa R, Kobayashi T, Numachi K, Ueda T, Nishikawa K, Watanabe K, Thomas RH. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. *Genetics* 1997; 145(3): 749-758.
- Yokobori S, Paabo S. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(22): 10432-10435.
- Yokobori S, Fukuda N, Nakamura M, Aoyama T, Oshima T. Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol* 2004; 21(11): 2034-2046.
- Yoshida MA, Tsuneki K, Furuya H. Phylogeny of Selected Sepiidae (Mollusca, Cephalopoda) Based on 12S, 16S, and COI sequences, with comments on the taxonomic reliability of several morphological characters. *Zoolog Sci* 2006; 23(4): 341-351.
- Zilch, A. Euthyneura, Teil 2. In: W. Wenz, *Gastropoda*. Berlin: Borntraeger XII 1959-1960; 834p.
- Zouros E, Freeman KR, Ball AO, Pogson GH. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 1992; 359: 412-414.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)