Contribuição para a caracterização molecular e histológica de *Lymnaea stagnalis*

Contribution to the molecular and histological characterization of *Lymnaea stagnalis*

Fernando Rui Lopes de Lemos Pereira Rodrigues

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

2020

Orientador

Doutora Laura Guimarães

Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Coorientadores

Professora Doutora Aurélia Saraiva

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Professor Doutor António Paulo Carvalho

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Autor:

Fernando Rui Lopes de Lemos Pereira Rodrigues

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Rua do Campo Alegre 1021/1055, 4169-007 Porto, Portugal

22 040 2900

Supervisores:

Doutora Laura Guimarães

Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Avenida General Norton de Matos s/n, 4450-208 Matosinhos, Portugal

Professora Doutora Aurélia Saraiva

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Rua do Campo Alegre 1021/1055, 4169-007 Porto, Portugal

Professor Doutor António Paulo Carvalho

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Rua do Campo Alegre 1021/1055, 4169-007 Porto, Portugal

Eu, Fernando Rui Lopes de Lemos Pereira Rodrigues, aluno com o número 201105620, do mestrado de Biologia Celular e Molecular no ano letivo 2018/2019, declaro por minha honra que sou o autor da totalidade do texto apresentado, não apresento texto plagiado, e tomei conhecimento das consequências de uma situação de plágio.

Porto, Janeiro 2020

Agradecimentos

Esta dissertação foi realizada no âmbito do projeto REWATER financiado pela EU e FCT / UEFISCDI / FORMAS através da ERA-NET Cofund WaterWorks2015 (Water JPI).









Sumário

O funcionamento de um organismo depende da expressão coordenada dos seus genes, em padrões típicos de cada sistema de órgãos ou tecido. A caracterização dos padrões de expressão basal destes genes fornece informação útil para a compreensão dos mecanismos de homeostase nos seres vivos. Apesar de ser um modelo biológico reconhecido em várias áreas, são ainda poucos os estudos moleculares disponíveis sobre *Lymnaea stagnalis*. O presente trabalho teve por objetivo principal a realização de uma caracterização histológica geral de alguns tecidos desta espécie e a avaliação do nível de expressão basal de doze genes de interesse, ligados a diferentes processos fisiológicos e de potenciais três genes de referência. Para a caracterização histológica utilizou-se uma coloração de Hematoxilina-Eosina. Para a avaliação da expressão génica utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR).

Os resultados obtidos permitiram obter informação sobre fixadores de interesse a utilizar com *Lymnaea stagnalis* e perceber a estrutura dos sistemas de órgãos amostrados para avaliação da expressão génica. Dos genes de referência testados, a combinação *18s* e *EF1a* mostrou maior estabilidade no tecido reprodutor, do que qualquer gene isoladamente ou qualquer outra combinação de genes. A combinação *18s* e *bTUB* mostrou maior estabilidade no pé e nos gânglios nervosos. Utilizando a normalização por estas combinações de genes obtiveram-se níveis de expressão basal de doze genes para os gânglios nervosos, tecido reprodutor e pé. Estes genes estão ligados à neurotransmissão colinérgica e serotonérgica (*AChR*, *AChBP*, *SERR* e *VMAT*), a defesas antioxidantes e recetores nucleares (*CAT*, *SOD*, *RXR*, *RAR*), assim como à formação da concha (*ENGR*) e à reprodução (*OVIP*, *YOLKF* e *ENK3*). Não foram identificadas diferenças significativas entre os níveis de expressão destes genes nos diferentes tecidos. Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas (38%, $p < 0,05$) entre os níveis de expressão dos genes *AChR* e *SERR* nos gânglios nervosos. Estes são recetores ligados à neurotransmissão colinérgica e serotonérgica, sugerindo os resultados que a primeira é mais proeminente nos gânglios nervosos do que a segunda. Além disso, encontraram-se correlações muito elevadas entre os genes *VMAT* e *ENK3* ($r = 0,90$), *CAT* e *YOLKF* ($r = 0,92$), e *VMAT* e *SOD* ($r = 0,95$). Estes resultados sugerem que os genes nestes pares poderão efetivamente pertencer a uma mesma via de sinalização, indicando algumas direções interessantes de trabalho futuro. O trabalho futuro deve também focar-se na clonagem e sequenciação dos produtos de RT-qPCR obtidos para confirmação dos produtos amplificados e conhecimento da estrutura dos genes.

Abstract

The functioning of an organism depends on the coordinated expression of its genes, in patterns typical of each organ system or tissue. Characterization of the basal expression patterns of these genes provides useful information for understanding the mechanisms of homeostasis in living beings. Despite being a recognized biological model in many areas, there are still few molecular studies available on *Lymnaea stagnalis*. The main objective of the present work was to perform a general histological characterization of some tissues of this species and to evaluate the basal expression level of twelve genes of interest, linked to different physiological processes and potential three reference genes. For the histological characterization, hematoxylin-eosin staining was used. For gene expression evaluation, the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique was used.

The results obtained provided information on fixatives of interest for use with *Lymnaea stagnalis* and to understand the structure of the sampled organ systems for evaluation of gene expression. Of the reference genes tested, the combination *18s* and *EF1a* showed greater stability in the reproductive tissue than any single gene or any other gene combination. The combination *18s* and *bTUB* showed greater stability in the foot and nerve ganglia than any other gene or combination. Normalization by these gene combinations allowed obtaining basal expression levels for twelve genes in nerve ganglia, reproductive tissue and foot. These genes are linked to cholinergic and serotonergic neurotransmission (*AChR*, *AChBP*, *SERR* and *VMAT*), antioxidant defenses and nuclear receptors (*CAT*, *SOD*, *RXR*, *RAR*), as well as shell formation (*ENGR*) and reproduction (*OVIP*, *YOLKF* and *ENK3*). No significant differences were identified between the expression levels of these genes in the different tissues. Statistically significant differences (38%, $p < 0.05$) were identified between *AChR* and *SERR* gene expression levels in the nervous ganglia. These are receptors linked to cholinergic and serotonergic neurotransmission, suggesting the results that the former is more prominent in the nerve ganglia than the latter. In addition, very high correlations were found between *VMAT* and *ENK3* ($r = 0.90$), *CAT* and *YOLKF* ($r = 0.92$), and *VMAT* and *SOD* ($r = 0.95$) genes. These results suggest the genes in these pairs may actually be on the same signaling pathway, indicating some interesting directions for future work. Future work should also focus on cloning and sequencing RT-qPCR products obtained for confirmation of amplified products and knowledge of gene structure.

Palavras-chave

Lymnaea stagnalis, Histologia, Genómica, transcriptase reversa, PCR quantitativo

Índice

Agradecimentos 3
Sumário 4
Abstract 5
Índice 6
Abreviaturas 7
Lista de tabelas 7
Lista de figuras 8
1. Introdução 9
1.1 *Lymnaea stagnalis* como modelo experimental 10
1.2 Anatomia e histologia geral de alguns sistemas de órgãos de *L. stagnalis* 12
1.3 Estudos de expressão génica em *L. stagnalis* 14
1.4 Objetivos 17
2. Materiais e Métodos 17
2.1 Animais estudados 17
2.2 Estudo histológico 18
2.3 Estudo de genómica 18
2.4 Análise dos dados 20
3. Resultados e discussão 21
3.1 Estudo histológico 21
3.2 Estudo genómico 24
3.2.1 Eficiência dos “primers” e genes de referência 24
3.2.2 Genes ligados à neurotransmissão colinérgica e serotonérgica 27
3.2.3 Genes ligados a defesas antioxidantes e recetores nucleares 29
3.2.4 Genes envolvidos na formação da concha e na reprodução 31
3.2.5 Correlação entre os genes analisados 33
4. Conclusões e perspetivas futuras 36
5. Referências 37

Abreviaturas

EF1a – "Elongation factor 1α" (Fator de alongamento alfa 1)

bTUB1 – "β-tubulin isotype 1" (Isótipo 1 da β-tubulina)

OVIP – "Ovipostatin" (Ovipostatina)

YOLKF – "Yolk ferritin" (Ferritina vitelogénica)

SAA6 – "Sperm-associated antigen 6" (Antigénio 6 associado ao esperma)

ENK1 – "Enkurin 1" (Encurina 1)

ENK3 – "Enkurin 3" (Encurina 3)

TEK2 – "Tektin 2" (Tectina 2)

TEKA1 – "Tektin A1" (Tectina A1)

ENGR – "Engrailed"

AChR – "Acetylcholine receptor" (Recetor da acetilcolina)

AChBP – "Acetylcholine binding protein" (Proteína de ligação da acetilcolina)

SERR – "Serotonin receptor" (Recetor da serotonina)

CAT – "Catalase" (Catalase)

SOD – "Superoxide dismutase" (Superóxido dismutase)

RAR – "Retinoic acid receptor" (Recetor retinóico)

RXR – "Retinoid X receptor" (Recetor retinóico X)

VMAT2 – "Vesicular monoamine transporter 2" (Transportador vesicular de monoaminas 2)

RT – Transcriptase reversa

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PCA – Análise de componentes principais

Lista de tabelas

Tabela 1 Sequências selecionadas para avaliação da expressão génica

Tabela 2 "Primers" utilizados no estudo genómico

Tabela 3 Eficiência dos "primers" utilizados

Tabela 4 Valores de Ct ("threshold cycle"), ou ciclo quantitativo, e respetivo erro padrão obtidos para os genes avaliados

Tabela 5 Valores de estabilidade obtidos pelo algoritmo *NormFinder* para os genes de referência testados

Lista de figuras

Figura 1 Exemplar de *Lymnaea stagnalis*, fotografia de Nicola Baines (CC BY-NC) tirada de www:biodiversity4all.org

Figura 2 Representação esquemática de parte do aparelho reprodutor de Lymnaea stagnalis retirada de Plesch *et al.* (1971) vs – vesícula seminal, spo – espermoviducto, ag – glândula da albumina, mg – glândula mucípara, og – glândula ootecal, u – útero, v – vagina, bc – bolsa copuladora, gp – gonoporo, sp – espermiducto, pg – próstata, vd – vaso deferente, pr - prepúcio

Figura 3 Sistema nervoso central de *Lymnaea stagnalis*, escala 1mm. Imagem retirada de Feng *et al.* (2009), LBuG – gânglio bucal esquerdo, RBuG – gânglio bucal direito, LCeG – gânglio cerebral esquerdo, RCeG – gânglio cerebral direito, LPeG – gânglio podal esquerdo, RPeG – gânglio podal direito, LPlg – gânglio pleural esquerdo, RPlG – gânglio pleural direito, LPaG – gânglio parietal esquerdo, RPaG – gânglio parietal direito, VG – gânglio visceral

Figura 4 Glândula digestiva (GD) e glândula hermafrodita (GH). Nesta última é possível observar o epitélio folicular (ef), oócitos (oo), espermatogónias / espermatócitos (spt), espermatídeos (spm) e espermatozoides (sp) (H&E).

Figura 5 Glândulas do oviduto (H&E)

Figura 6 Glândula digestiva ou hepatopâncreas de *L. stagnalis* (H&E) (10 x)

Figura 7 Ácino da glândula digestiva onde se observa as células digestivas (cd), as células excretoras (ce) e as células de cálcio (cc) (40x)

Figura 8 Expressão relativa obtida para os genes envolvidos na neurotransmissão colinérgica e serotonérgica.

Figura 9 Expressão relativa obtida para os genes que codificam enzimas antioxidantes e recetores nucleares ligados ao ácido retinóico.

Figura 10 Expressão relativa do gene ENGR obtida nos gânglios, pé e sistema reprodutor de *L. stagnalis.*

Figura 11 Expressão relativa de genes envolvidos na função reprodutora.

Figura 12 Mapa de correlações obtido para os genes analisados.

1. Introdução

O estudo dos padrões de expressão génica de um dado sistema de órgãos ou tecido fornece informação útil para a compreensão das complexas redes de genes envolvidas no funcionamento normal de um organismo (Mesquita *et al.* 2015, San-Segundo *et al.* 2016). Neste sentido, a técnica de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) constitui uma ferramenta útil e expedita para analisar a expressão de um gene. A RT-qPCR permite medir a abundância do transcrito de um dado gene, sendo uma técnica quantitativa (Urbatzka *et al.* 2013, San-Segundo *et al.* 2016). Esta técnica é bastante utilizada na avaliação da expressão de um ou vários genes selecionados com um objetivo de investigação específico, por exemplo genes escolhidos pelo seu potencial de envolvimento num determinado processo biológico em estudo. É também utilizada como método de validação de estudos de expressão génica em larga escala, como é o caso dos estudos de transcritómica por "microarrays" (Mesquita *et al.* 2015, Teles *et al.* 2019). Efetivamente, esta técnica é considerada a mais precisa e fiável para validar dados obtidos por outros métodos, devido à sua elevada sensibilidade, deteção em tempo real do progresso da reação, velocidade de análise e medição precisa do material examinado na amostra.

A confrontação dos resultados de estudos de expressão génica com o estudo histológico dos tecidos em que estes mostram expressão fornece uma compreensão aprofundada da sua função no organismo, sobretudo em situações em que esta se encontra alterada, quer por situações patológicas naturais, quer por exposição a fatores de stresse ambiental (*e.g.* alterações de temperatura, exposição a compostos químicos tóxicos). Neste sentido, a caracterização do nível de expressão basal de genes de interesse para o funcionamento de um determinado sistema fisiológico e da sua estrutura histológica fornece, não só conhecimento fundamental, mas também uma base essencial para o planeamento de estudos subsequentes. Apesar de ser um modelo biológico reconhecido em várias áreas, são ainda poucos os estudos moleculares disponíveis sobre *Lymnaea stagnalis* e, em particular, sobre o seu sistema reprodutor.

Este trabalho insere-se num estudo mais amplo que utiliza esta espécie de caracol pulmonado de água doce para avaliação dos efeitos da contaminação química detetada em ecossistemas aquáticos. No sentido de dar resposta a algumas das lacunas identificadas, teve por objetivo principal o estudo histológico de alguns tecidos desta espécie e a correspondente avaliação do nível de expressão basal de doze genes de interesse, ligados a diferentes processos fisiológicos, e de três potenciais genes de referência.

1.1 *Lymnaea stagnalis* como modelo experimental

Lymnaea stagnalis (Linnaeus, 1758) (figura 1) é uma espécie de caracol de água doce que tem sido utilizado desde há várias décadas como modelo biológico (Amorim *et al.* 2019), particularmente em estudos de eletrofisiologia. Recentemente, foi também reconhecido como espécie modelo para avaliação dos efeitos de contaminantes ambientais detetados nos ecossistemas de água doce (OCDE 2016, Amorim *et al.* 2019). Esta escolha foi devida a características, detalhadas adiante, favoráveis à realização de ensaios toxicológicos, bem como à necessidade de selecionar um modelo adequado à avaliação dos efeitos de substâncias químicas na reprodução de moluscos (OCDE 2016). Em particular, foi estabelecido um protocolo padronizado para a realização de ensaios de reprodução com esta espécie, definindo diversos critérios a ser usados em estudos futuros, tais como condições de crescimento (alimentação, fotoperíodo, temperatura) e indicações sobre o plano experimental a adotar, entre outros (OCDE 2016).



Figura 1 Exemplar de *Lymnaea stagnalis*, fotografia de Nicola Baines (CC BY-NC) tirada de www.biodiversity4all.org

Por outro lado, a utilização desta espécie como modelo experimental adequa-se também à legislação atual sobre utilização de animais para fins experimentais. Em 2010, o Parlamento Europeu emitiu a diretiva 2010/63/EU para "a proteção de animais usados para fins científicos", que veio complementar a diretiva 86/609/EEC criada em 1986 pelo Conselho Europeu. Estas diretivas regulam a utilização de animais para fins experimentais através de diversos critérios e de acordo com os princípios dos três Rs (*Replace*, *Reduce*, *Refine*) introduzidos por Russel e Burch (1959). Estes princípios são: i) substituir sempre que possível o uso de animais por técnicas alternativas; ii) reduzir ao mínimo o número de animais

utilizados quando é necessário utilizá-los; e iii) "refinar" ou apurar os procedimentos de modo a minimizar o sofrimento dos animais utilizados em experimentação científica (ThethreeRs 2018). Na legislação nacional encontram-se protegidos por esta legislação os cefalópodes e os vertebrados e seus estádios larvares com alimentação independente. Os restantes invertebrados são, em geral, considerados como não sencientes ou com menor capacidade para experienciar dor, sofrimento, aflição ou dano duradouro (Directive 2010).

Geralmente, a escolha de um organismo modelo passa por selecionar uma espécie que seja abundante e de fácil aquisição, que tenha um ciclo de vida curto e que seja de fácil manutenção em laboratório (Siddig *et al.* 2016). No entanto, segundo Chapman (2002), para algumas finalidades (*e.g.* estudos ambientais) as espécies em estudo devem ser dominantes ou importantes (se possível tendo em conta o local em estudo) e identificadas através de estudos ecológicos ao nível da comunidade. Deve também ser priorizado o potencial ganho de informação mesmo que isso requeira mais esforço na obtenção de espécimes e/ou condições laboratoriais mais rigorosas, desde que se mantenha um equilíbrio razoável entre esforço desenvolvido e informação obtida. Salienta também que se comece a considerar mais a possibilidade de estudos conjuntos com outras espécies, por razões mencionadas previamente. Contudo, como é evidente, um dos principais aspetos a considerar para uma espécie modelo é que as suas características fisiológicas, celulares e moleculares, assim como o seu genoma e os seus comportamentos, possam ser muito bem conhecidos.

Lymnaea stagnalis é um molusco gastrópode pulmonado de água doce, de distribuição holárctica, que apresenta os requisitos acima mencionados (Amorim *et al.* 2019). Habita águas lênticas, isto é, de pouca circulação, tais como as margens de lagos, riachos, reservatórios, entre outros (Budha 2010). É classificado como um raspador, alimentando-se predominantemente de vegetação aquática, mas podendo também recorrer a detritos e restos de outros animais presentes no habitat. Ocasionalmente exibe canibalismo, comendo caracóis mais pequenos (Step 1901). Os ovos são depositados em massas gelatinosas, medindo 2 a 3 cm de comprimento e contendo entre 50 a 120 ovos (Olsen *et al.* 2001). É um hermafrodita simultâneo, mas normalmente ocorre acasalamento, durante o qual cada indivíduo age exclusivamente como um dos sexos. Este animal é de manutenção laboratorial fácil e apresenta um ciclo de vida curto, atingindo a maturidade reprodutiva em cerca de 60 dias (OCDE 2016).

A avaliação da reprodução é extremamente importante para determinar o risco dos contaminantes químicos para a espécie, no entanto é pouco informativa sobre os processos celulares e moleculares subjacentes ao funcionamento deste sistema. O esclarecimento destes processos é relevante para a realização de investigação envolvendo a reprodução e fatores que possam interferir com esta. A identificação e estudo de genes que possam estar ligados à função de interesse, o conhecimento da estrutura dos tecidos em que se expressam,

e das suas potenciais alterações e consequências a níveis mais elevados de organização biológica são úteis para a compreensão dos modos de ação dos tóxicos ou a investigação em áreas distintas, que vão deste a farmacologia à avaliação do impacto das alterações climáticas.

1.2 Anatomia e histologia geral de alguns sistemas de órgãos de *L. stagnalis*

Os primeiros estudos histológicos sobre esta espécie surgiram em meados do século XX (Amorim *et al.* 2019). Entre os sistemas mais estudados encontram-se o sistema reprodutor, pelas características hermafroditas deste animal, e o sistema nervoso, que serviu de base a trabalhos que trouxeram grande conhecimento na área da neurofisiologia. Na figura 2 encontra-se uma esquematização dos componentes do sistema reprodutor, com exceção da glândula hermafrodita. *Lymnaea stagnalis* é um animal hermafrodita que possui apenas uma gónada, denominada de glândula hermafrodita por produzir esperma e óvulos. Esta glândula está localizada na extremidade posterior do corpo e é envolvida pela glândula digestiva (Lőw *et al.* 2016). A esta glândula segue-se uma vesícula seminal (vs) e um espermoviducto (spo) (figura 2). O sistema reprodutor é composto seguidamente por diversos órgãos dedicados a cada um dos sexos. Na componente feminina surge um oviduto, onde se pode distinguir histologicamente as glândulas da albumina (ag), mucípara (mg) e ootecal (og) (figura 2). A glândula da albumina produz o fluido que alimenta os embriões, sendo seguida pelas glândulas mucípara e ootecal que produzem, respetivamente, a bainha interna e externa das massas de ovos. Seguidamente, surgem o útero (u), onde são armazenadas as massas de ovos pré-postura, e a vagina (v) (figura 2). Pertencente ainda à porção feminina e próximo da vagina surge uma bolsa copuladora (bc) ligada ao gonoporo (gp) (Plesch *et al.* 1971).

O segmento masculino é constituído por um espermiducto (sp), que conduz o esperma até à próstata (pg) e, seguidamente, ao aparelho copulador, designado também por complexo peniano, localizado no prepúcio (pr, figura 2) (Plesch *et al.* 1971). Um estudo toxicológico realizado por Weber e colaboradores (2013) fornece também uma coleção de imagens histológicas que servem como uma boa base de comparação.

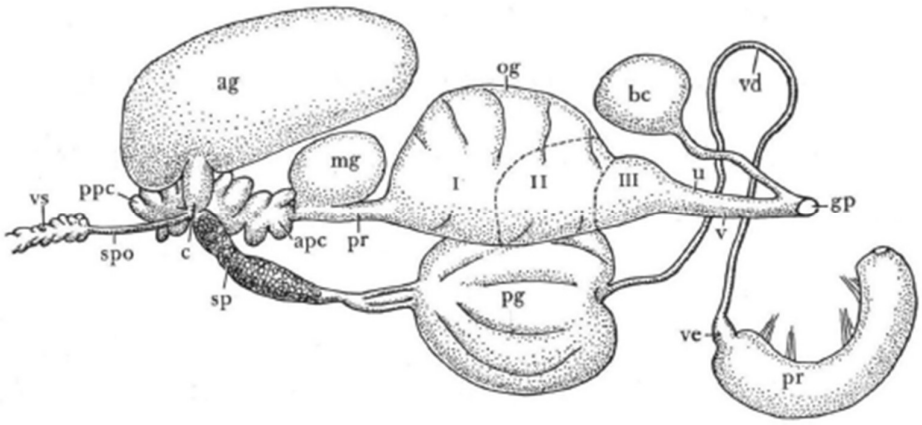


Figura 2 Representação esquemática de parte do aparelho reprodutor de *Lymnaea stagnalis* retirada de Plesch *et al.* (1971) vs – vesícula seminal, spo – espermoviducto, ag – glândula da albumina, mg – glândula mucípara, og – glândula ootecal, u – útero, v – vagina, bc – bolsa copuladora, gp – gonoporo, sp – espermiducto, pg – próstata, vd – vaso deferente, pr - prepúcio

Um outro sistema essencial é o tudo digestivo, pelas suas funções de secreção e destoxificação. No sistema digestivo observa-se uma estrutura característica localizada na região bucal semelhante a uma língua, denominada de rádula. É uma estrutura comum a todos os moluscos com exceção dos bivalves, composta por fileiras de dentes quitinosos, associada ao odontóforo. Posteriormente surgem o esófago, o estômago e a glândula digestiva. Esta é frequentemente denominada de hepatopâncreas. É uma glândula acinosa composta de grande dimensão. Vários estudos realizados sobre a histologia da glândula digestiva referem a existência de três tipos de células principais presentes neste órgão, as células digestivas, as células excretoras e as células de cálcio (Carriker 1946, Carriker e Bilstad 1946, Lopes *et al.* 2001).

O sistema nervoso central é composto por nove gânglios centrais dispostos à volta do esófago, num arranjo circular paralelo ao eixo dorso-ventral da cabeça (figura 3): os gânglios podais esquerdo e direito, os gânglios cerebrais esquerdo e direito, os gânglios pleurais esquerdo e direito, os gânglios parietais esquerdo e direito, um único gânglio visceral, e dois gânglios bucais esquerdo e direito mais isolados (Janse 1973). Histologicamente, os gânglios são constituídos por uma zona central denominada de neurópilo que corresponde aos axónios e uma região periférica onde se localizam os corpos celulares dos neurónios. Todas as estruturas ganglionares são envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo.

O pé desta espécie apresenta uma forma vagamente triangular quando esticado, afunilando-se na direção posterior. É responsável pela aderência do animal às superfícies através da secreção de muco, e pela locomoção através da combinação de movimentos ciliares da camada epitelial e de contração muscular de um sistema de fibras musculares lisas que percorre o pé longitudinalmente (Pavlova 2010). O músculo da columela, que tem origem no epitélio do manto, faz a ligação do corpo à concha e é responsável pela capacidade de

retração do pé. Este músculo está organizado num feixe grosso e desce até ao pé dividindo-se em três grupos de fibras que cobrem diferentes áreas deste órgão locomotor. Outros sistemas musculares, como o músculo longitudinal presente principalmente na região anterior do corpo (cabeça) e do manto, têm também alguns prolongamentos menores até certas áreas do pé (Plesch *et al.* 1974).

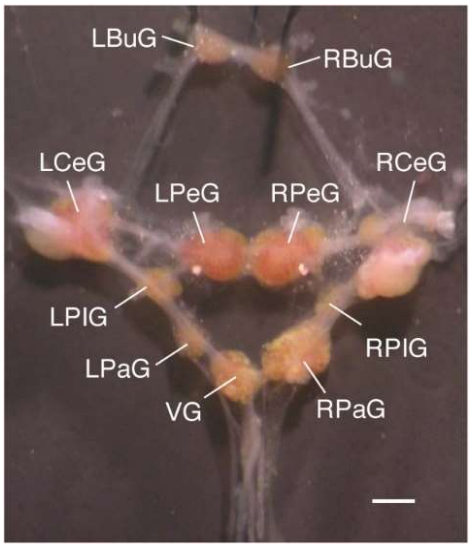


Figura 3 Sistema nervoso central de *Lymnaea stagnalis*, escala 1mm. Imagem retirada de Feng *et al.* (2009), LBuG – gânglio bucal esquerdo, RBuG – gânglio bucal direito, LCeG – gânglio cerebral esquerdo, RCeG – gânglio cerebral direito, LPeG – gânglio podal esquerdo, RPeG – gânglio podal direito, LPIg – gânglio pleural esquerdo, RPIG – gânglio pleural direito, LPaG – gânglio parietal esquerdo, RPaG – gânglio parietal direito, VG – gânglio visceral

1.3 Estudos de expressão génica em *L. stagnalis*

Existem na literatura científica alguns trabalhos de sequenciação em larga escala que identificaram transcritos com expressão relevante em *L. stagnalis*. Estes foram obtidos para sistema específicos, como é o caso do sistema nervoso (Sadamoto *et al.* 2012), ou a partir de amostras compostas por vários tecidos do animal (Bouétard *et al.* 2012). Não é, no entanto, clara a expressão que alguns destes genes potencialmente ligados ao sistema reprodutor possam ter na glândula hermafrodita ou noutros tecidos. É também de notar que, para a maioria destes genes conhecidos, não há informação sobre o nível de expressão constitutiva em diferentes tecidos de *L. stagnalis*. Entre estes encontram-se, por exemplo: o gene *OVIP* ("ovipostatin"), cuja expressão resulta na produção de uma proteína na próstata que quando injetada na vagina leva a uma redução na postura (Koene *et al.* 2010), ou o gene *YOLKF* ("yolk ferritin"), que codifica para a produção da proteína vitelogénica, sintetizada na glândula digestiva e transportada na hemolinfa até aos oócitos, constituindo um dos principais componentes da massa vitelina (Bottke e Sinha 1979, Bottke *et al.* 1988). Outro gene, o *SAA6* ("sperm-associated antigen 6"), codifica para a formação de uma proteína conservada

envolvida na estrutura do flagelo e na motilidade dos espermatozoides. Estudos com ratinhos *knockout* mostraram que animais sem esta proteína apresentam anomalias morfológicas nos espermatozoides e, consequentemente, infertilidade (Sapiro *et al.* 2002). Esta proteína foi também detetada noutros moluscos, como *Crassostrea gigas* (Mendoza-Porras 2014), atualmente *Magallana gigas*. O gene *ENK* ("enkurin"), descrito por (Sutton *et al.* 2004), codifica para a produção de uma proteína localizada no acrossoma dos espermatozoides nas últimas fases de desenvolvimento do esperma. O estudo original foi realizado em ratinhos, mas a proteína foi, entretanto, detetada noutros animais, incluindo moluscos. Esta proteína participa na reação acrossómica mediando o influxo de cálcio para o espermatozoide. Os genes *TEK2* ("tektin 2") e *TEKA1* ("tektin A1") codificam para a produção de tectinas. As tectinas são uma família de proteínas citoesqueléticas associadas aos microtúbulos, importantes para a formação de flagelos e cílios. Consequentemente, têm um papel vital no desenvolvimento e desempenho dos espermatozoides. Estas proteína foram inicialmente identificadas numa espécie de ouriço-do-mar e posteriormente em mamíferos, insetos e outros animais (Norrander *et al.* 1992, Larsson *et al.* 2000, Amos 2008, Klinbunga *et al.* 2009, Amparyup *et al.* 2010).

Relativamente ao sistema nervoso, encontram-se na literatura genes de interesse para o seu desenvolvimento e função. O gene *ENGR* ("engrailed") é um fator de transcrição do tipo homeodomínio expresso em várias fases do desenvolvimento embrionário, nomeadamente no desenvolvimento do sistema nervoso central. Foram encontradas proteínas homólogas em todos os grupos de moluscos com concha, estando nestes animais também envolvido na delimitação das zonas de formação e desenvolvimento das conchas (Jacobs *et al.* 2000, Nederbragt *et al.* 2002, Samadi e Steiner 2009). A expressão do gene *AChR* ("acetylcholine receptor") dá origem à formação de uma proteína transmembranar ativada pela ligação do neurotransmissor acetilcolina. Conhecem-se dois tipos de recetores colinérgicos: os nicotínicos (recetores nicotínicos da acetilcolina) e os muscarínicos (recetores muscarínicos da acetilcolina). Estes são assim conhecidos por reagirem particularmente, para além da ligação da acetilcolina, à ligação da nicotina ou da muscarina, respetivamente. O gene *AChBP* ("acetylcholine binding protein") codifica para a formação de uma proteína de ligação à acetilcolina. Esta proteína é secretada no sistema nervoso central, pelas células da glia de *L. stagnalis*, apresentando elevada similaridade ao domínio extracelular dos recetores nicotínicos. A sua função é a de modular a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas (Smit *et al.* 2001, Sixma e Smit 2003, Eiden *et al.* 2004, Smit *et al.* 2006). O gene *SERR* ("serotonin receptor") codifica para a formação de um recetor da serotonina. Nos mamíferos, estes recetores são constituídos por sete famílias, seis do tipo de recetores acoplados à proteína G e uma de canais iónicos, encontrados nos sistemas nervosos. São ativados pela ligação do neurotransmissor serotonina e modulam a libertação

de vários outros neurotransmissores (Frazer Alan 1999). De momento ainda é difícil classificar precisamente os *SERR* em invertebrados devido aos métodos envolvidos na realização desta classificação (*i.e.*, perfis farmacológicos) (Sugamori *et al.* 1993, Tierney 2001). Em relação com as monoaminas envolvidas na transmissão colinérgica e serotonérgica está o gene *VMAT2* ("vesicular monoamine transporter 2"). A sua expressão origina a formação de uma proteína membranar presente em células nervosas e endócrinas, responsável pelo transporte de monoaminas, em particular neurotransmissores, do espaço sináptico para o interior da célula pré-sináptica e para vesículas secretoras no interior da célula. Estas monoaminas são posteriormente libertadas por exocitose para o espaço extracelular nas sinapses nervosas.

A um nível importante para os tecidos em geral, pelo seu papel antioxidante e pela sua contribuição para a sinalização celular por espécies reativas de oxigénio (Kim *et al.* 2007), identificam-se os genes *CAT* e *SOD*, responsáveis pela produção das enzimas catalase e Cu/Zn superóxido dismutase, respetivamente. Estas são proteínas com funções vitais nas vias de defesa antioxidante, encontrando-se presentes em quase todos os organismos expostos ao oxigénio. Um outro grupo de genes de interesse é o dos recetores nucleares ligados ao ácido retinóico. Estes são recetores essenciais que mostram grande conservação ao longo da escala taxonómica e estão envolvidos em importantes redes transcricionais e vias de sinalização. São recetores nucleares de tipo II, isto é, formam heterodímeros com outros recetores nucleares, atuando como fatores de transcrição para regular a expressão de outros genes (Amoutzias *et al.* 2007). Ligam-se, por exemplo, com o recetor CAR ("constitutive androstane receptor), para regular a expressão de proteínas ligadas ao metabolismo e à excreção de xenobióticos, ou com os recetores PPAR ("Peroxisome-proliferator-activated receptors"), no caso dos vertebrados, para regular a expressão de genes ligados às vias de sinalização redox (Kim e Yang 2013). Neste grupo incluem-se os *RXR* ("retinoid X receptors") e os *RAR* ("retinoic acid receptors").

A correta utilização da técnica de RT-qPCR exige uma validação interna, de modo a que os resultados de expressão obtidos para os genes em estudo possam ser reproduzidos por outros autores. Esta normalização permite corrigir ou controlar problemas relacionados com diferenças que possam ter origem em variações associadas à extração de mRNA, à integridade do mRNA extraído, à eficiência da reação de transcrição reversa e das próprias condições de realização da reação (Urbatzka *et al.* 2013). Esta normalização é habitualmente efetuada através da utilização de um gene de referência, contra o qual é determinado o nível de expressão do gene de interesse. Os genes de referência funcionam como controlos internos, dado que durante as experiências são afetados pelas mesmas fontes de variação a que estão sujeitos os genes de interesse para o estudo. São expressos nas células, e os seus mRNAs estão presentes durante a preparação das amostras, armazenamento, extração de RNA e também durante os processos enzimáticos inerentes à técnica, como por exemplo o

tratamento com transcriptase reversa. Um bom gene de referência deve apresentar uma expressão estável em todos os tecidos, independentemente das condições experimentais e estádios do ciclo de vida (Urbatzka *et al.* 2013). Na realidade, tais genes nem sempre são fáceis de identificar. Neste sentido, estudos recentes identificam vantagens na normalização com combinações de genes de referência para o cálculo da expressão de um gene (Urbatzka *et al.* 2013, Teles *et al.* 2019). Alguns genes têm sido utilizados como genes de referência para *L. stagnalis* em diferentes estudos. Entre eles, o *EF1a* ("Elongation factor 1α") codifica para uma proteína que compõe a subunidade alfa do complexo fator de alongamento 1, cuja função é o transporte dos *tRNAs*, com respetivos aminoácidos ligados, para os ribossomas. Também o gene *bTUB1* ("β-tubulin isotype 1"), cuja expressão origina a formação de uma das proteínas que compõe o citoesqueleto eucariótico, através da formação dos microtúbulos após a sua polimerização. Ainda o gene *18S rRNA* (18s), que codifica para a síntese de um dos componentes da subunidade pequena 40S dos ribossomas eucarióticos. É um gene altamente conservado nos organismos eucarióticos sendo, por isso, frequentemente utilizado em estudos filogenéticos.

1.4 Objetivos

Apesar do vasto conhecimento sobre esta espécie em termos de eletrofisiologia ou desenvolvimento embrionário, existem poucos estudos de genómica que identifiquem genes de interesse fisiológico a utilizar em estudos de expressão génica ou providenciem níveis de expressão basal em diferentes tecidos. Os objetivos específicos deste trabalho foram, assim, a quantificação da expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos de órgãos selecionados, e avaliação de genes de referência adequados, aliados a uma caracterização histológica geral dos órgãos. Pretendeu-se, especificamente, uma abordagem multidisciplinar que permitisse obter uma melhor compreensão de funções importantes e obter conhecimento sobre os níveis basais de expressão dos genes selecionados. O trabalho iniciou-se com o estudo histológico a partir do qual se selecionaram para avaliação da expressão génica o sistema reprodutor, o pé e o sistema nervoso.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais estudados

Os espécimes de *Lymnaea stagnalis* utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de uma cultura laboratorial mantida na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto de acordo com o protocolo padronizado da OCDE (2016). Na cultura, os animais são mantidos em tanques contendo água desclorada, com arejamento contínuo, a uma temperatura de 20

± 1 ºC, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de obscuridade. O alimento fornecido foi alface. Desta cultura foram retirados animais com um comprimento médio de 4,1 ± 0,6 cm para realização dos estudos histológico (n=6) e genómico (n=6)

2.2 Estudo histológico

O estudo histológico foi realizado através do processamento de material biológico proveniente de exemplares adultos de *L. stagnalis* de uma cultura laboratorial mantida de acordo com os critérios descritos no protocolo da OCDE previamente mencionado. Após anestesia com uma solução de 5% $MgCl_2$ em água carbonatada, a concha foi removida cortando com uma tesoura de dissecação de pontas afiadas ao longo da espiral. Depois de removida a concha, o corpo foi dissecado iniciando com uma incisão no manto na direção antero-posterior e os órgãos removidos e fixados. Em alguns casos os exemplares foram fixados inteiros imediatamente após a remoção da concha. A solução utilizada como fixador foi uma solução de formol tamponado a 10%. A duração da fixação foi de 48h.

Todo o procedimento realizado teve lugar no laboratório de histologia da FCUP. O processamento dos tecidos foi realizado no processador automático *Shandon Citadel 2000*, em que as peças histológicas (órgãos ou exemplares completos) foram desidratadas e impregnadas em parafina, após terem sido diafanizadas com salicilato de metilo. A inclusão em parafina foi realizada na estação *Thermo Scientific HistoStar*. Os blocos obtidos foram cortados com um micrótomo manual *Leica RM2035*, colocados em lâminas e secos numa estufa a 40ºC. A coloração de hematoxilina/eosina foi realizada na estação *Shandon Varistain 24-4*, onde as preparações foram desparafinadas, reidratadas e coradas, seguindo-se a diafanização em xilol e montagem em *Entellan* da *Merck Millipore*.

2.3 Estudo de genómica

Para a análise da expressão por transcriptase reversa e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) dos genes selecionados, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e, depois de removida a concha, conservados de imediato em RNA*later* de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até transporte para o laboratório e armazenamento em arca refrigerada. Posteriormente foram isolados os órgãos de interesse de seis espécimes diferentes.

O RNA de cada órgão isolado foi extraído utilizando um *kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* da GE Healthcare e de acordo com o protocolo do fabricante. Depois de extraído, o RNA foi quantificado em placas *micro-volume Take3* num espectrofotómetro de microplaca *Synergy HT* da BioTek. O cDNA foi sintetizado com o *kit* de transcriptase reversa q*Script cDNA Synthesis Kit* da Quantabio segundo as instruções do fabricante.

Selecionaram-se para avaliação da expressão as sequências a seguir indicadas na tabela 1. Alguns dos genes foram selecionados com base num estudo genómico prévio de genes reprodutores realizado numa outra família de moluscos (Mendoza-Porras 2014), nomeadamente os das encurinas, tectinas, e do SAA6, com o intuito de detetar a sua presença em *L. stagnalis*. As sequências dos genes escolhidos que não tinham sido empiricamente detetados na espécie-alvo do estudo (ENK1, ENK3 e TEK2 de *C. Gigas*, TEKA1 de *H. asinina* e SAA6 de *C. virginica*) foram alinhadas com o seu genoma, utilizando as diferentes variedades de BLAST existentes no National Centre for Biotechnology Information (NCBI) conforme necessário, de modo a prever a sua presença e, consequentemente, a obtenção de resultados positivos. Outros dos genes de interesse escolhidos neste trabalho estão relacionados com os mecanismos de defesa antioxidante e a neurotransmissão colinérgica e serotonérgica, assim como os genes de referência já mencionados.

A partir das sequências contidas no Genbank (NCBI), procedeu-se ao desenho de "primers" utilizando a ferramenta Primer-BLAST, também acessível no NCBI, tendo por base as respetivas sequências obtidas. Na tabela 1 apresenta-se um resumo dos genes selecionados, com indicação do número de acesso das sequências nucleotídicas no NCBI. Na tabela 2 apresentam-se os "primers" desenhados para cada sequência selecionada. Foram desenhados "primers" para um total de 16 genes de interesse e três genes de referência.

Antes da avaliação da expressão foi testada a eficiência de cada par de "primers" utilizando uma reta padrão de 8 diluições. A expressão génica foi avaliada por qPCR com *SYBRGreen* (Biorad) num *Mastercycler realplex 4* da Eppendorf. Cada poço de reação continha: 10 µL *SybrGreen* (Biorad), 4 µL água, 2 µL de *primer forward* e *reverse* e 2 µL de cDNA para um volume total de 20 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicado no programa seguidamente definido: 2 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 54 °C; e 30 s a 72 °C, depois dos 40 ciclos seguiram-se 10 min a 72 °C, 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C e depois uma subida gradual de 20 min até 95 °C onde permanece durante 15 s.

Tabela 1 Sequências selecionadas para avaliação da expressão génica

Proteína	Abreviatura	Código de acesso (mRNA)	Função
Elongation factor 1-α	*EF1a*	DQ278441.1	Medeia o recrutamento de tRNA para os ribossomas
β-tubulin isotype 1	*bTUB1*	KX387888.1	Citoesqueleto, várias isoformas
18S rRNA	*18S*	Z73984.1	RNA estrutural dos ribossomas
Ovipostatin	*OVIP*	KT378132.1	Proteína produzida na próstata, presente no fluido seminal, inibe postura
Yolk ferritin	*YOLKF*	X56779.1	Principal proteína da massa vitelina, equivalente à vitelogenina de vertebrados
Sperm-associated antigen 6	*SAA6*	XM_011429552.2	Estrutura flagelar/motilidade dos espermatozoides
Enkurin, isoform 1	*ENK1*	XM_020073649.1	Proteína acrossómica, medeia o influxo de cálcio para o espermatozoide durante a reação acrossómica
Enkurin, isoform 3	*ENK3*	XM_020073651.1	Proteína acrossómica, medeia o influxo de cálcio para o espermatozoide durante a reação acrossómica
Tektin 2	*TEK2*	XM_020066003.1	Proteínas do axonema de células flageladas/ciliadas (espermatozoides) (encontradas em gónadas masculinas)
Tektin A1	*TEKA1*	EU827257	Proposta participação na espermatogénese em *H. asinina*
Engrailed	*ENGR*	AB331395.1	Papel na segmentação e neuro-desenvolvimento
Acetylcholine receptor	*AChBP*	DQ167344.1	Modulador de neurotransmissão colinérgica
Acetylcholine binding protein	*AChR*	AF364899.1	Modulador de neurotransmissão colinérgica
Serotonin receptor	*SERR*	L06803.1	Modulador de neurotransmissão serotonérgica
Vesicular monoamine transporter 2	*VMAT*	AF484094.1	Transportador de monoaminas
Catalase	*CAT*	FJ418795.1	Papel na defesa antioxidante
Superoxide dismutase	*SOD*	AY332385.2	Papel na defesa antioxidante
Retinoic acid receptor	*RAR*	GU932671.1	Recetor nuclear do ácido *trans*-retinóico
Retinoid X receptor	*RXR*	AY846875.1	Recetor nuclear do ácido 9-*cis*-retinóico

2.4 Análise dos dados

A seleção dos genes de referência a utilizar na normalização da expressão dos genes de interesse foi realizada através da aplicação do algoritmo de normalização *NormFinder* como recomendado por Urbatzka e colaboradores (2013). A avaliação final da expressão foi calculada de acordo com o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001). Os dados obtidos estão apresentados em valores de Ct ("threshold cycle") e sob a forma de diagramas de caixa e fio da expressão normalizada para os genes de referência (delta-delta Ct). Utilizou-se a análise de variância a um fator (ANOVA) para analisar possíveis diferenças dos níveis de expressão obtidos entre os três tecidos testados com valor de confiança de 95%. Possíveis diferenças de expressão entre genes analisados no mesmo tecido foram analisadas com o teste *t* para amostras emparelhadas. Para estes testes paramétricos a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias foram previamente avaliadas utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respetivamente. Foi ainda efetuada uma análise de correlação dos valores de expressão génica obtidos para os três tecidos, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas com o programa R-Cran.

Tabela 2 "Primers" utilizados no estudo genómico

Proteína	Primer forward	Primer reverse	Tamanho amplificado (bp)
EF1a	AAGAGATGGGCAAGGGTTCC	AATACCACGCTCACGCTCAG	74
bTUB1	TCAGACACAGTTGTGGAGCC	AGTGAGTGGGGCAAATCCTG	297
18S	GAGCTGCGGCTTAATTTGAC	CCACCGAGGCGAACTATTTA	159
OVIP	CCCTATACGTTGCATACCACCA	TGCTCCTTTTCAGTGTACCACG	126
YOLKF	GCAGGATGTGTATTTGCGGG	GCATCTTTCTCATCGTCAGCC	172
SAA6	GGTGGCTAAACACTCCCCTC	GGGACTGCTCCTGCATCTAC	183
ENK1	GGGCCTGAAAACCTCCAAGA	GCCTGATGGCTCCAAGAGAT	130
ENK3	CCGATGAGGAGAGGAGGAGA	ACCTTCTGTGGTTGTCTTGGG	136
TEK2	TGATGTGGTGCAGGATGAGG	GGAGTTGCTGTCTGGCTTCT	140
TEKA1	ATTCCTATCCAGCCCCGAGT	AACATCCACGGCATCACACT	160
ENGR	AAACTGTTCCGCTCTCTGGA	CGTGACAACTGTCGCTTGTT	246
AChBP	AAGTGGACGTGGTCTTTTGG	CCAGTTGCGGTGTAAGGAC	167
AChR	CGGTCCTTGTGCTCAATTTT	AAGGACATTGGCCATCAGAC	217
SERR	CTTTTTCAGACGTGCGATGA	TTGGCACTGTCTTCTGTTGC	186
VMAT	TGGAGCACATCAAAGACTCG	GCCTTGGAGGCAAACATAAA	192
CAT	ATGGTAACTGGGACCTGGTG	TTGTTTCTGGACGCAGAGTG	158
SOD	GGAATCACGGGAACAATCAC	CCCACCGTGAGACTTGTTTT	183
RAR	CATCCGCTATGAGCTTGACA	GCATGGCGTACTCTGTCTCA	163
RXR	CTCACTTATGCTTGCCGTGA	CATGTCATTGTTGGCTCCAC	170

3. Resultados e discussão

3.1 Estudo histológico

Apresenta-se a seguir a caracterização geral efetuada para o sistema reprodutor e a glândula digestiva.

Entre os órgãos do sistema reprodutor, foi possível observar a glândula hermafrodita (figura 4 com oócitos em fases iniciais de desenvolvimento bem como diferentes tipos de células da espermatogénese, nomeadamente espermatogónias, espermatídeos e espermatozoides. Não foi possível observar o aspeto histológico das diferentes regiões do oviduto, muito embora sejam observáveis várias regiões glandulares (figura 5).

Nas figuras 6 e 7 é bem visível o arranjo acinar da glândula digestiva. É possível distinguir três tipos diferentes de células: as células digestivas, localizadas na base dos ácinos e onde são bem visíveis os núcleos basais cuja função é a absorção dos nutrientes; as células excretoras, de maiores dimensões e mais claras, contendo numerosos grânulos de pequeno tamanho; e as células de cálcio, caracterizadas pela presença de aglomerados de sais de cálcio.

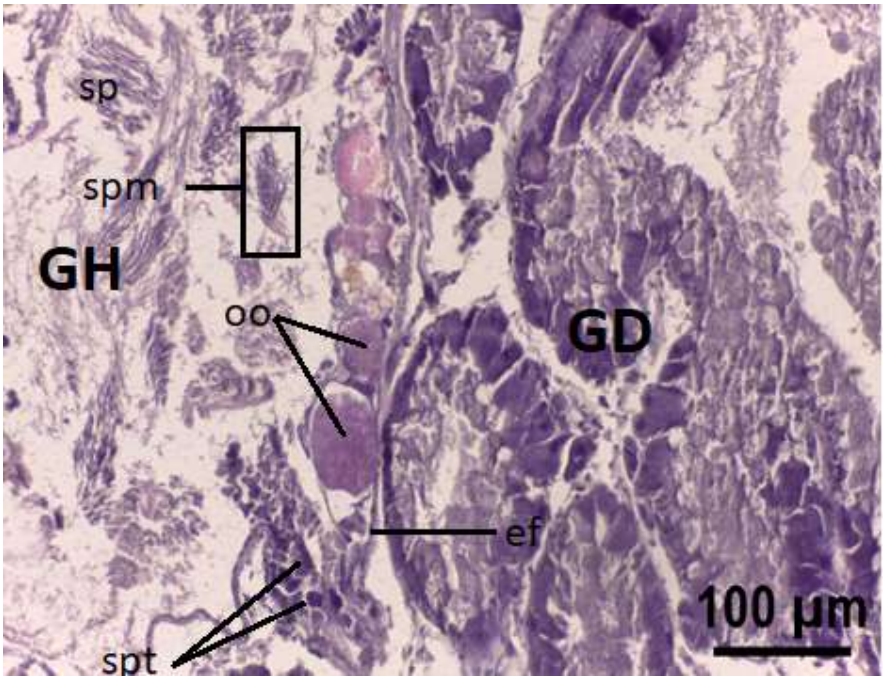


Figura 4 Glândula digestiva (GD) e glândula hermafrodita (GH). Nesta última é possível observar o epitélio folicular (ef), oócitos (oo), espermatogónias / espermatócitos (spt), espermatídeos (spm) e espermatozoides (sp) (H&E).

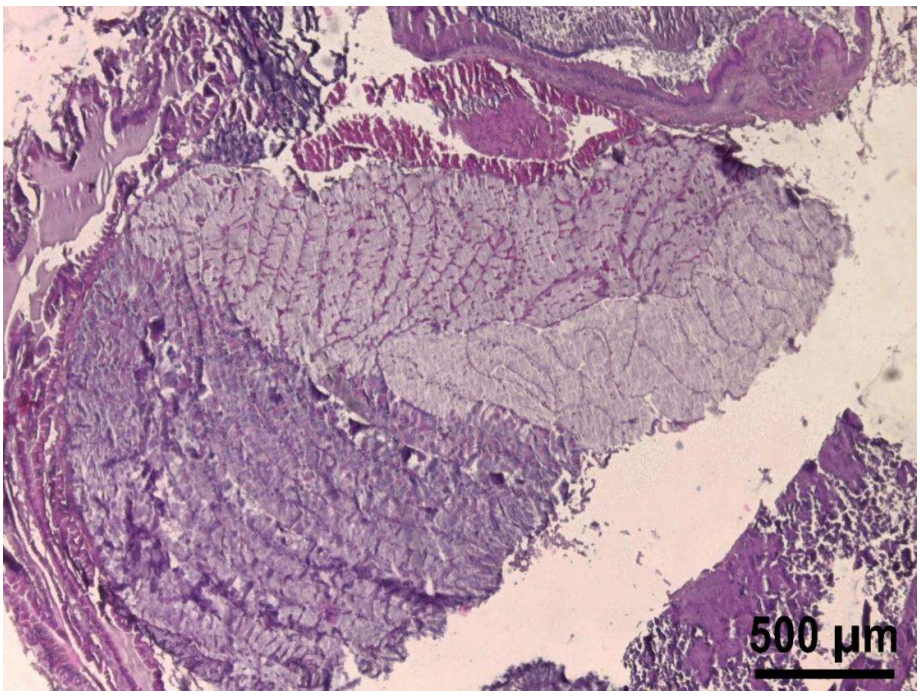


Figura 5 Glândulas do oviduto (H&E)

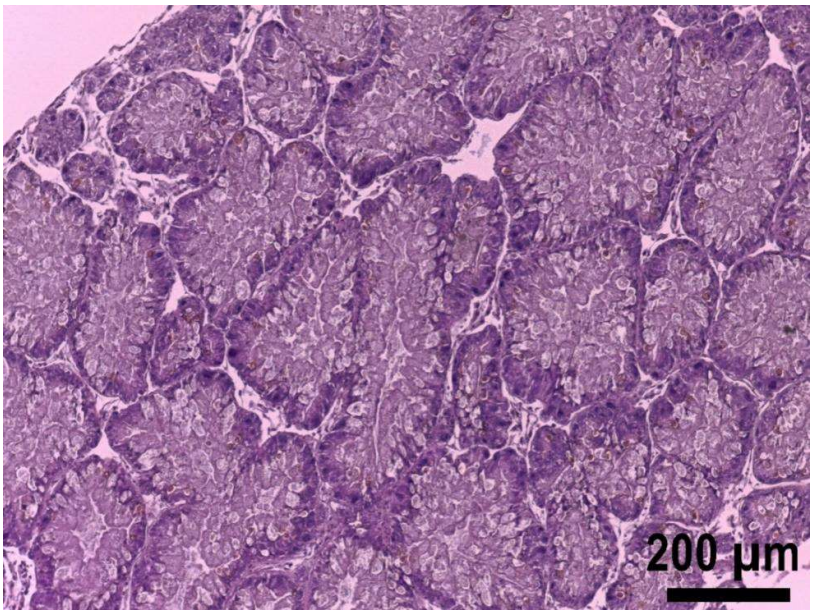


Figura 6 Glândula digestiva ou hepatopâncreas de *L. stagnalis* (H&E) (10 x)

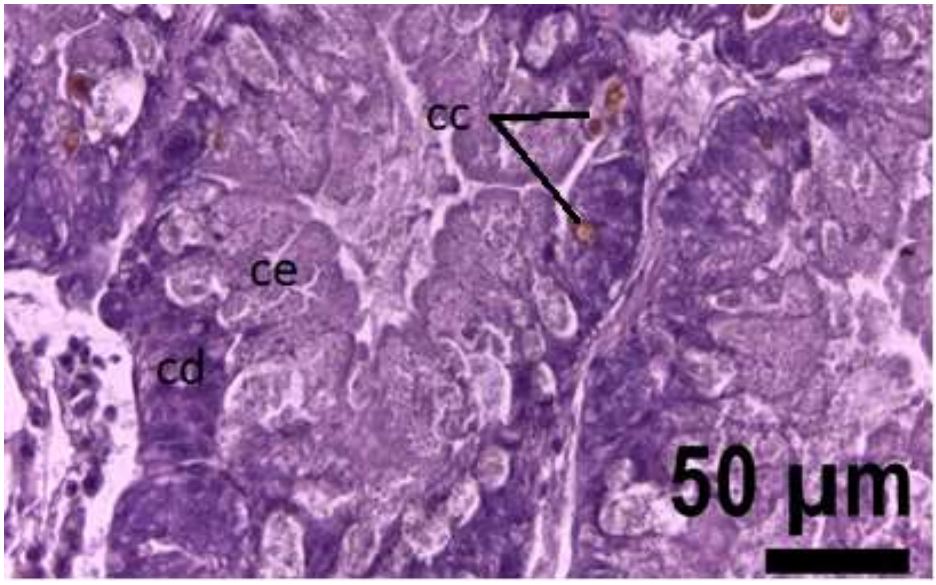


Figura 7 Ácino da glândula digestiva onde se observa as células digestivas (cd), as células excretoras (ce) e as células de cálcio (cc) (40x)

Durante as observações efetuadas, verificou-se que várias das preparações histológicas apresentavam sinais de autólise o que sugere que o processo moroso de relaxamento e dissecção anteriores à fixação devem ser alterados por forma a garantir obtenção de tecidos/órgãos corretamente preservados.

3.2 Estudo genómico

3.2.1 Eficiência dos "primers" e genes de referência

O material genético utilizado foi extraído de três fontes: o músculo podal (pé), os gânglios do sistema nervoso central e glândulas do sistema reprodutor. Após a extração de RNA e síntese de cDNA o estudo de expressão iniciou-se com a avaliação da eficiência dos "primers" desenhados. Os resultados desta avaliação mostraram que os primeiros "primers" desenhados para os genes *SAA6*, *ENK1*, *TEK2* e *TEKA1* não forneceram resultados satisfatórios de eficiência, tendo-se desenhado "primers" novos para cada um desses genes. Os segundos pares de "primers" testados para estes genes resultaram também em valores demasiado baixos de eficiência. Este resultado é possivelmente devido ao facto de terem sido desenhados a partir de sequências nucleotídicas de espécies aparentadas a *L. stagnalis* ao contrário dos restantes "primers" desenhados no âmbito deste trabalho. Embora estas sejam sequências conservadas, variações naturais inerentes a cada espécie podem fazer variar o nível de homologia entre genes de espécies diferentes. Em estudos futuros com interesse na amplificação e sequenciação destes genes será adequado desenhar "primers" degenerados para a sua identificação em *L. stagnalis* (Iserte *et al.* 2013).

Na tabela 3 apresentam-se os valores de eficiência dos "primers" obtidos para os restantes genes testados. Estes valores foram utilizados no cálculo da expressão dos genes analisados.

A tabela 4 apresenta os valores de Ct obtidos para os genes quantificados. Para os genes de referência, os valores obtidos foram em seguida analisados com o programa *NormFinder* para determinação do gene ou combinação de genes mais estável em cada tecido.

Uma das vantagens do algoritmo do *NormFinder* é que, na avaliação da melhor combinação, ao invés de propor os genes que apresentam maior semelhança entre si, propõe os genes ou combinação de genes que apresentam menor variação na expressão. Desta forma é evitada a possibilidade de se selecionar para normalização genes que possam estar co-regulados, o que pode levar a uma representação errónea dos genes alvo (Andersen *et al.* 2004, Urbatzka *et al.* 2013). Indicam-se na tabela 5 os melhores valores de estabilidade obtidos para um único gene de referência e para a melhor combinação, conforme resultado da análise efetuada com o *NormFinder*.

Tabela 3 Eficiência dos "primers" utilizados

Proteína	Primer forward	Primer reverse	Tamanho amplificado (bp)	Eficiência (%)
EF1a	AAGAGATGGGCAAGGGTTCC	AATACCACGCTCACGCTCAG	74	100
bTUB1	TCAGACACAGTTGTGGAGCC	AGTGAGTGGGGCAAATCCTG	297	121
18S	GAGCTGCGGCTTAATTTGAC	CCACCGAGGCGAACTATTTA	159	102
OVIP	CCCTATACGTTGCATACCACCA	TGCTCCTTTTCAGTGTACCACG	126	101
YOLKF	GCAGGATGTGTATTTGCGGG	GCATCTTTCTCATCGTCAGCC	172	116
ENK3	CCGATGAGGAGAGGAGGAGA	ACCTTCTGTGGTTGTCTTGGG	136	119
ENGR	AAACTGTTCCGCTCTCTGGA	CGTGACAACTGTCGCTTGTT	246	103
AChBP	AAGTGGACGTGGTCTTTTGG	CCAGTTGCGGTGTAAGGAC	167	94
AChR	CGGTCCTTGTGCTCAATTTT	AAGGACATTGGCCATCAGAC	217	94
SERR	CTTTTTCAGACGTGCGATGA	TTGGCACTGTCTTCTGTTGC	186	97
VMAT	TGGAGCACATCAAAGACTCG	GCCTTGGAGGCAAACATAAA	192	99
CAT	ATGGTAACTGGGACCTGGTG	TTGTTTCTGGACGCAGAGTG	158	98
SOD	GGAATCACGGGAACAATCAC	CCCACCGTGAGACTTGTTTT	183	105
RAR	CATCCGCTATGAGCTTGACA	GCATGGCGTACTCTGTCTCA	163	93
RXR	CTCACTTATGCTTGCCGTGA	CATGTCATTGTTGGCTCCAC	170	99

Tabela 4 Valores de Ct ("threshold cycle"), ou ciclo quantitativo, e respetivo erro padrão obtidos para os genes avaliados

Tecido	Tecido reprodutor		Gânglios		Pé	
Gene	Ct médio	Erro padrão	Ct médio	Erro padrão	Ct médio	Erro padrão
18S	12,5	0,47	10,2	0,11	12,2	0,53
EF1	17,2	0,45	15,5	0,20	16,7	0,15
bTUB1	18,8	0,37	17,6	0,23	18,4	0,11
AChBP	23,4	0,19	13,6	0,46	19,2	0,89
AChR	27,5	0,79	24,4	0,34	28,3	0,34
CAT	19,4	1,20	21,8	0,34	22,2	0,55
SOD	19,5	0,49	19,1	0,30	18,8	0,27
RXR	23,8	0,64	22,2	0,41	21,8	0,25
RAR	25,9	0,51	26,9	0,23	27,0	0,35
ENGR	28,4	0,88	26,2	0,76	25,8	0,30
SERR	26,6	0,35	22,8	0,77	25,0	0,28
VMAT2	32,7	0,59	21,1	0,48	24,6	0,32
OVIP	25,3	0,54	24,0	0,41	26,8	0,48
YOLKF	20,0	0,42	29,1	0,41	29,3	0,32
ENK3	29,6	0,33	30,0	0,33	29,8	0,16

De acordo com os resultados da tabela 5, escolheu-se a combinação *18s* + *EF1a* para normalizar a expressão quantificada no sistema reprodutor e a combinação *18s* + *bTUB* para normalizar a expressão determinada no pé enquanto que se utilizou o EF1a isolado para os gânglios. As figuras 8-12 apresentam os resultados de expressão relativa obtidos para os genes testados.

Tabela 5 Valores de estabilidade obtidos pelo algoritmo *NormFinder* para os genes de referência testados

Tecido/órgão	Melhor gene	Melhor combinação
Sistema reprodutor	*bTUB* = 0,033	*18s* e *EF1a* = 0,032
Pé	*bTUB* = 0,042	*18s* e *bTUB* = 0,038
Gânglios	*EF1a* = 0,014	*18s* e *bTUB* = 0,016

3.2.2 Genes ligados à neurotransmissão colinérgica e serotonérgica

A expressão relativa média do gene *AChBP* (figura 8) variou entre um mínimo de 1,00 ± 0,71 (média ± desvio padrão) no tecido reprodutor e um máximo de 1,61 ± 1,81 no pé (figura 8). Para o gene *AChR* a expressão relativa média variou entre 1,06 ± 0,55 nos gânglios e 1,39 ± 0,98 no tecido reprodutor (figura 8). A expressão relativa média do gene *SERR* variou entre um mínimo de 0,66 ± 0,25 nos gânglios e um máximo de 1,09 ± 0,79 no tecido reprodutor. A expressão média do gene do *VMAT2* variou entre um mínimo de 1,28 ± 1,24 no pé e um máximo de 1,52 ± 1,56 no tecido reprodutor (figura 8).

De acordo com os resultados da ANOVA não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre tecidos para nenhum dos genes avaliados. A expressão relativa média dos genes analisados em cada tecido foi também semelhante, exceto para os recetores da acetilcolina e da serotonina nos gânglios. Com efeito, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o nível de expressão do *AChR* e do *SERR* nos gânglios, de 38% (t = 2,79, df = 5, p = 0,038).

Relativamente a estudos anteriores, este trabalho detetou expressão do gene *AChBP* tanto nos gânglios como no tecido reprodutor e no pé. Num estudo anterior, Smit e colaboradores (2001) identificaram uma forma solúvel de AChBP derivada da glia. Esta é análoga dos domínios de ligação dos recetores nicotínicos da acetilcolina. De acordo com o estudo, a libertação pré-sináptica de acetilcolina induz a secreção de AChBP pela glia, para a fenda sináptica, regulando a transmissão colinérgica entre neurónios do sistema nervoso central (Smit *et al.* 2001). Posteriormente, Banks *et al*. (2009) realizaram uma análise imunohistoquímica no sistema nervoso central, onde observaram a expressão desta proteína nos gânglios.

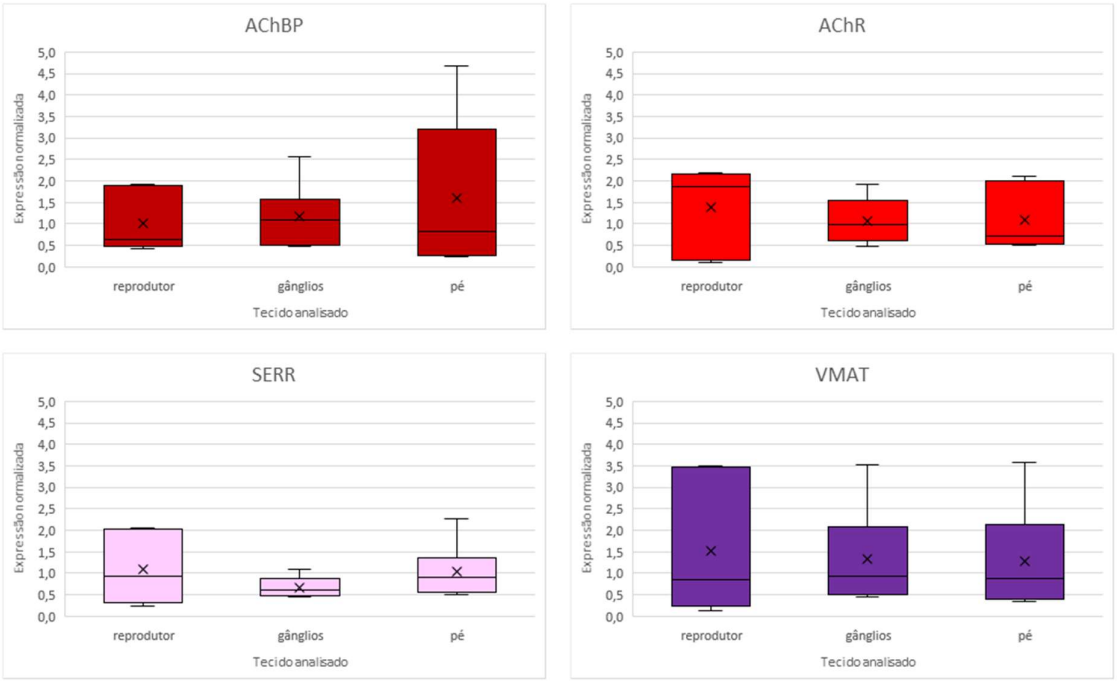


Figura 8 Expressão relativa obtida para os genes envolvidos na neurotransmissão colinérgica e serotonérgica.

As AChBP foram também identificadas em vários gastrópodes e também anelídeos (Saur *et al.* 2012). Globalmente, estas são proteínas solúveis homólogas, quer em estrutura quer em função, ao domínio de ligação dos recetores nicotínicos colinérgicos, possuindo uma estrutura quaternária pentamérica que é completamente conservada (Saur *et al.* 2012). A sua estrutura permite a ligação seletiva de vários agonistas e antagonistas, incluindo toxinas naturais. A transmissão colinérgica encontra-se de uma forma generalizada nos tecidos dos animais e recentemente foi identificada a sua presença na hemolinfa do caracol *Biomphalaria glabrata (Saur et al. 2012).* Pelas suas características de solubilidade e afinidade estrutural acima mencionadas, estes autores discutem o seu possível papel na proteção contra efeitos nocivos de fitotoxinas. É, pois, possível que isoformas de AChBP se expressem noutros tecidos para além do sistema nervoso central. Estudos futuros deverão focar-se na sequência dos produtos de amplificação obtidos por qPCR e na deteção/quantificação da proteína final nestes tecidos e elucidação da sua função.

Sobre o recetor da acetilcolina, é de notar que van Nierop *et al*. (2006) identificaram 12 subunidades do recetor nicotínico da acetilcolina (LnAChR A a L) em *L. stagnalis*. Nesse trabalho avaliaram a sua expressão no sistema nervoso central e em vários tecidos do animal, como a glândula hermafrodita, a glândula da albumina, a massa bucal, o rim, o pé e o manto, entre outros. No entanto, não foi detetada expressão da subunidade LnAChR A (avaliada no presente trabalho) fora do sistema nervoso central da espécie (van Nierop *et al.* 2006). No presente trabalho foram desenhados “primers” para esta subunidade que possui um resíduo de ácido glutâmico na posição E265 relacionado com a seletividade para catiões (van Nierop

et al. 2006). Os "primers" usados no presente trabalho são diferentes dos usados por van Nierop e colegas (2006), sendo por isso possível que tenha sido detetada uma isoforma desta subunidade no tecido reprodutor e no pé. De modo a confirmar os resultados será pertinente realizar uma sequenciação dos produtos de amplificação obtidos para garantir a identificação da sequência amplificada e caracterizar possíveis variações entre tecidos.

Relativamente ao *SERR* e ao *VMAT2*, um estudo prévio de Benatti e colaboradores (2017) analisou a sua expressão nos gânglios de *L. stagnalis*, tendo encontrado valores médios de expressão semelhantes aos obtidos no presente estudo. Num outro estudo, por Barbas e colaboradores (2002), foi caracterizado em *Aplysia californica* um recetor de serotonina com 68% de identidade partilhada com o *SERR* de *Lymnaea stagnalis*. *Aplysia californica* é uma lesma do mar próxima dos gastrópodes pulmonados. A expressão deste recetor foi avaliada no sistema nervoso central, rim, brânquia, ovotestis, massa bucal e coração. Contudo, só foi detetada expressão no sistema nervoso (Barbas *et al.* 2002). É de notar, no entanto, que um trabalho anterior verificou, utilizando técnicas de microscopia eletrónica, imunohistoquímica e cromatografia líquida de alta resolução, a existência de serotonina no pé de *L. stagnalis*, embora em quantidades menores do que no tecido nervoso (McKenzie *et al.* 1998). Os autores observaram especificamente que o tecido contendo serotonina se concentrava na superfície ventral do pé, debaixo das áreas ciliadas da epiderme. Além disso, por fluorescência, mostraram a presença de axónios contendo serotonina em nervos que inervam o pé, embora tenham detetado poucos corpos celulares de neurónios, o que sugere que a maior parte dos nervos observados deriva dos gânglios centrais (McKenzie *et al.* 1998). Também no caso do sistema reprodutor, trabalho prévio sugere o envolvimento do recetor da serotonina na mediação ou modulação dos processos reprodutivos no caracol de água doce *Biomphalaria glabrata* (Muschamp e Fong 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem ainda que a neurotransmissão colinérgica nos gânglios nervosos será mais proeminente do que a serotonérgica. Em estudos futuros será importante caracterizar o nível de expressão destes genes nos gânglios também em juvenis e quantificar os níveis destes neurotransmissores no sistema nervoso central para melhor compreender este padrão de expressão.

3.2.3 Genes ligados a defesas antioxidantes e recetores nucleares

A expressão relativa média do gene da CAT variou entre um mínimo de 0,65 ± 0,58 (média ± desvio padrão) no tecido reprodutor e um máximo de 1,57 ± 1,87 no pé (figura 9). A expressão média do gene da SOD variou entre um mínimo de 1,15 ± 0,96 no pé e um máximo de 1,40 ± 1,23 no tecido reprodutor (figura 9). A expressão média do gene *RXR* variou entre um mínimo de 1,13 ± 0,85 no pé e um máximo de 1,26 ± 0,90 no tecido reprodutor (figura 9). Por seu lado, a expressão média do *RAR* variou entre um mínimo de 0,99 ± 0,57 no tecido

reprodutor e um máximo de 1,19 ± 1,01 no pé (figura 9). A análise estatística não detetou diferenças significativas entre os níveis de expressão observados nos diferentes tecidos, para qualquer dos genes testados (ANOVA, $p > 0,05$).

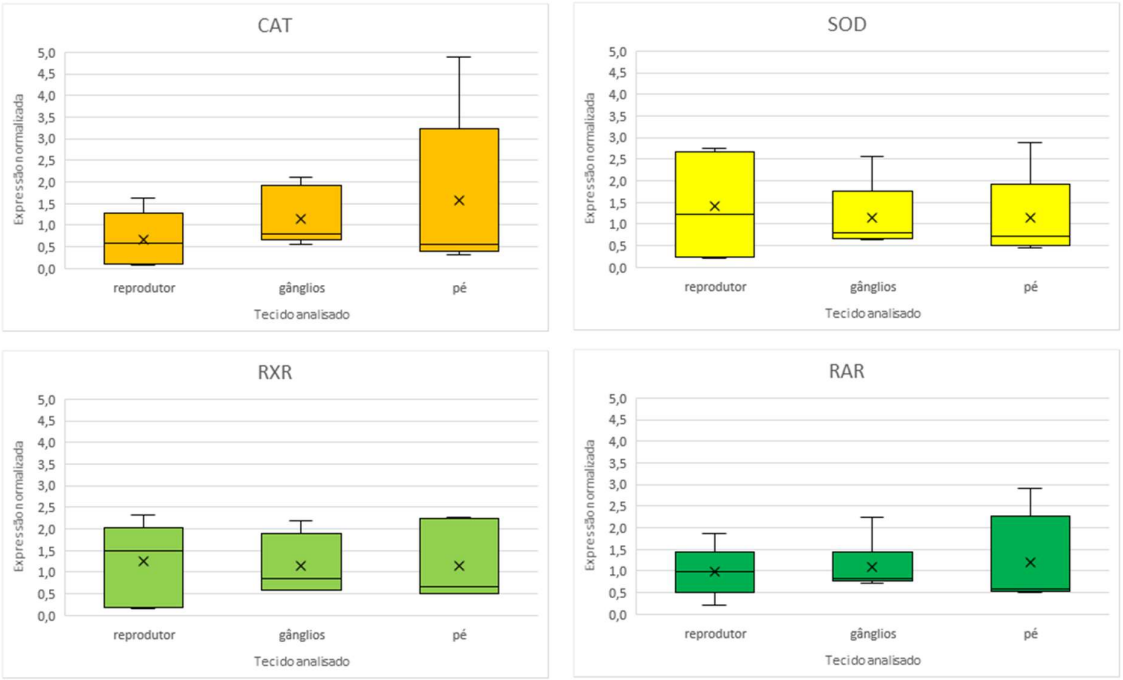


Figura 9 Expressão relativa obtida para os genes que codificam enzimas antioxidantes e recetores nucleares ligados ao ácido retinóico.

A catalase é uma enzima antioxidante que atua na conversão do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. O peróxido de hidrogénio é um radical livre de oxigénio, que se forma durante reações celulares induzidas pela exposição a metais, capaz de causar dano oxidativo nas macromoléculas das células (*i.e.*, proteínas, lípidos, DNA) (Atli e Grosell 2016). Ekanayke *et al*. (2008) caracterizaram a expressão do gene da catalase em *Haliotis discus discus*, um gastrópode marinho filogeneticamente distante de *L. stagnalis*, na brânquia, no manto, na gónada e no trato digestivo. Estes autores detetaram níveis de expressão mais elevados na brânquia e no trato digestivo do que na gónada. A expressão do gene da Cu/Zn-SOD foi também avaliada em brânquia, músculo e hepatopâncreas de *H. discus discus (Kim et al. 2007)*, apresentando níveis de variação elevados, dependendo do tecido analisado. Posteriormente, Bouétard *et al.* (2013) estudaram a expressão dos genes da CAT e da SOD na hemolinfa e no complexo gonado-digestivo de *L. stagnalis* em resposta a uma exposição de 48h a um herbicida dipiridil (diquat). Os níveis de expressão determinados no presente trabalho para os genes da CAT e da SOD são semelhantes aos níveis encontrados por Bouétard *et al*. (2013) para os animais controlo. A deteção de expressão destas enzimas no pé de *L. stagnalis* é também consistente com as determinações de atividade destas enzimas efetuadas por outros autores (Atli e Grosell 2016) neste mesmo órgão da espécie.

São ainda escassos na literatura os trabalhos que avaliam a expressão dos recetores

do ácido retinóico em invertebrados. Em *L. stagnalis* destacam-se os trabalhos de Bouétard *et al.* (2013) e Carter *et al.* (2014). A expressão do RXR detetada no presente estudo mostrou níveis semelhantes aos encontrados em hemolinfa e no complexo gonado-digestivo de adultos da linhagem Renilys de *L. stagnalis* (Bouétard *et al.* 2013). Estes autores não determinaram a expressão do RAR. Esta foi, no entanto, medida no sistema nervoso central de adultos de *L. stagnalis* (Carter *et al.* 2014). Nesse trabalho os autores indicam ter obtido níveis aproximadamente duas vezes superiores aos aqui reportados.

3.2.4 Genes envolvidos na formação da concha e na reprodução

Para o *ENGR* os valores mais baixos de expressão média relativa foram encontrados no pé (1,30 ± 1,24, média ± desvio padrão) enquanto os valores mais elevados foram encontrados nos gânglios (2,02 ± 2,56) (figura 10). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão medidos nos três tecidos (ANOVA, $p > 0,05$).

A expressão do *ENGR* foi até ao momento estudada em larvas de *L. stagnalis* por qPCR e hibridização *in situ* (Iijima *et al.* 2008, Hohagen *et al.* 2015). Estes estudos mostraram a sua expressão durante os estádios de gástrula e trocófora, na ectoderme periférica da área da glândula da concha. Estes trabalhos corroboraram o papel do *ENGR* na formação da concha, bastante conservado nos moluscos. Tanto quanto foi possível encontrar na literatura, o presente trabalho é o primeiro a apontar a expressão deste gene em caracol adulto. No entanto, trabalhos recentes têm mostrado a sua contribuição para a homeostase de tecidos do adulto noutras espécies de invertebrados. Um exemplo é o trabalho de Luo *et al.* (2017) em *Drosophila*, esse estudo mostrou que o *Engrailed* atua juntamente com o *Nejire* para

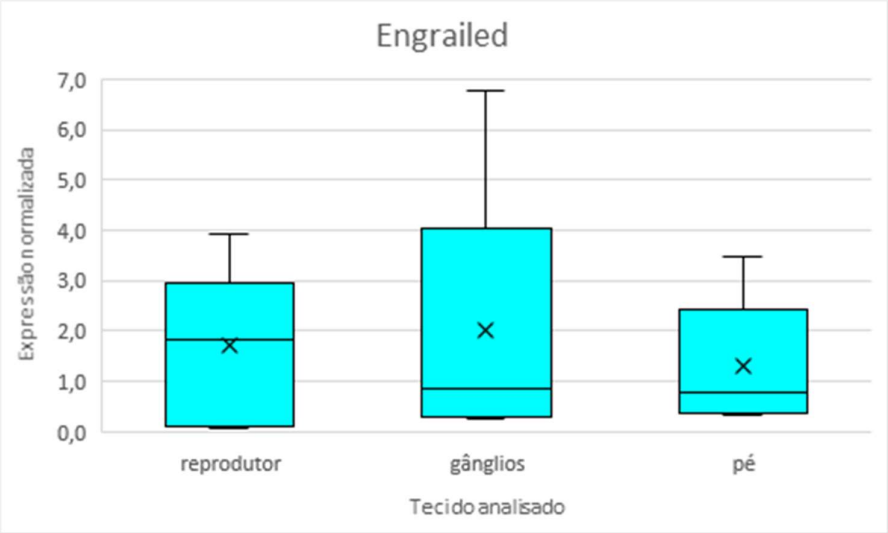


Figura 10 Expressão relativa do gene ENGR obtida nos gânglios, pé, e sistema reprodutor de *L. stagnalis*.

controlar a expressão de um outro gene (*Dpp*, "Decapentaplegic") que promove a renovação das células estaminais germinativas (Luo *et al.* 2017).

Os genes *OVIP* e o *YOLKF* mostraram valores de expressão relativa média mais baixos no sistema reprodutor (*OVIP*: 1,21 ± 1,08; *YOLKF*: 1,02 ± 0,72) e mais elevados no pé (*OVIP*: 1,59 ± 1,62; *YOLKF*: 1,33 ± 1,41) (figura 11). Contudo, estas diferenças não são estatisticamente significativas (ANOVA, $p > 0,05$). A expressão relativa média do gene *ENK3* (figura 11) variou entre um mínimo de 1,05 ± 0,60, quantificada no pé, e um máximo de 1,22 ± 0,85, quantificada nos gânglios (figura 11). Também para este gene não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão quantificados nos diferentes tecidos.

A ovipostatina é uma proteína identificada pela primeira vez em *L. stagnalis* (Koene *et al.* 2010). É produzida na próstata e transferida juntamente com o esperma para o caracol recetor (a atuar como fêmea) durante o acasalamento. O estudo em que foi identificada verificou também que esta proteína reduz a produção de massas de ovos, mas não afeta o sucesso reprodutivo ou a alimentação do animal recetor (Koene *et al.* 2010). Uma vez que reduz a postura de massas de ovos, com influência potencial na viabilidade das populações deste caracol, os autores sugerem a existência de uma função ou mecanismo associados a esta proteína que aumenta o *fitness* da espécie. Neste mecanismo, a redução das massas

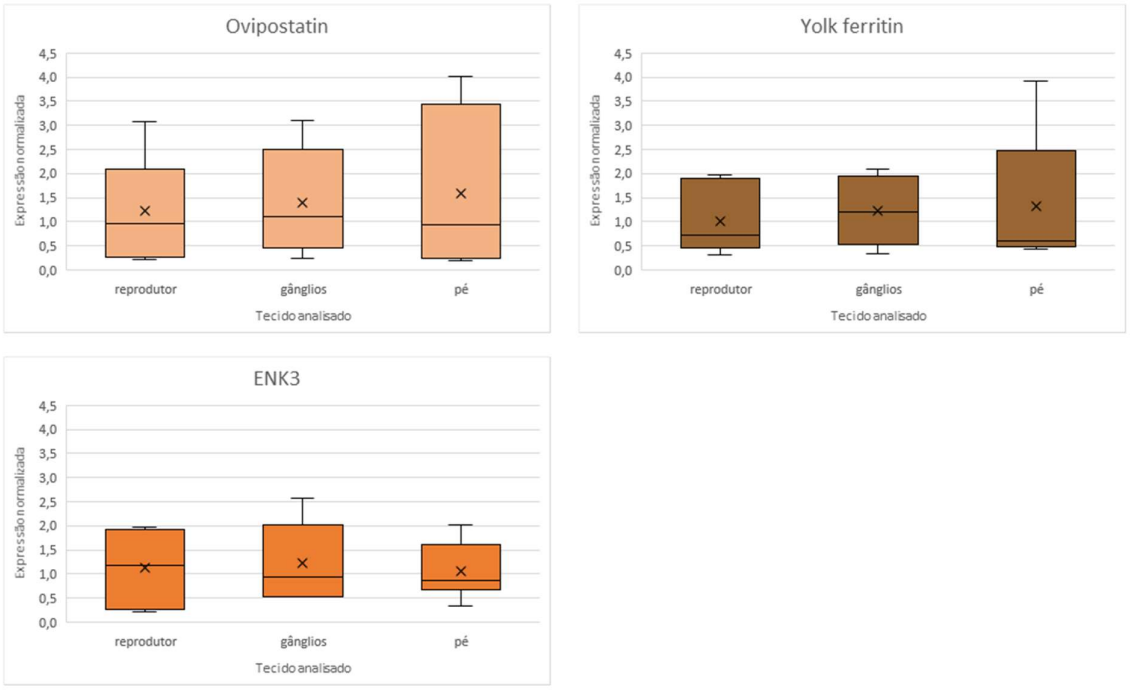


Figura 11 Expressão relativa de genes envolvidos na função reprodutora.

de ovos seria um efeito colateral. De entre as hipóteses que os autores avançam, a mais plausível parece ser a de que, ao diminuir a postura de novas massas, esta estratégia poderá permitir a maior disponibilidade de recursos para o desenvolvimento de cada ovo,

aumentando assim a sua qualidade em detrimento da quantidade. É de assinalar também que, segundo os autores, a deposição do esperma com ovipostatina no recetor coincide com uma inibição dos neurónios centrais que controlam o comportamento de deposição dos ovos nesta espécie (Koene *et al.* 2009). Numa avaliação semiquantitativa por qPCR, Koene *et al.* (2010) verificaram também a expressão deste gene noutros tecidos deste caracol, para além da próstata: sistema nervoso central, pé, complexo peniano e vesícula seminal. Não foi detetada expressão na glândula da albumina. No seu trabalho, a expressão foi claramente mais elevada na próstata, seguida do sistema nervoso central e do pé.

A ferritina foi considerada a principal proteína vitelogénica nos caracóis de água doce (Bottke *et al.* 1988). É uma proteína que armazena ferro, sintetizada na glândula digestiva e secretada para a hemolinfa. De acordo com estes autores, a gónada e o manto não exprimem ou sintetizam esta proteína. Juntamente com a glândula digestiva, estes tecidos, sintetizam um outro tipo de ferritina (soma ferritina) que permanece nos tecidos atuando na sua manutenção (Bottke *et al.* 1988). Em *L. stagnalis*, as ferritinas foram clonadas em 1994 por Von Darl e colegas (1994). De acordo com a caracterização feita por estes autores, a região 5' UTR ("untranslated region") do mRNA da soma ferritina contém uma sequência de 28 bp que mostra 64% de identidade com o elemento de resposta ao ferro IRE ("iron-responsive element") dos mRNAs de ferritina de animais vertebrados. A ferritina vitelogénica não contém nenhum IRE. Os autores notaram ainda que ambas as ferritinas desta espécie são mais semelhantes ao tipo de subunidade H das ferritinas dos vertebrados do que ao tipo L. Além disso, ambas contêm a sequência de resíduos de aminoácidos específica do tipo H, que corresponde ao centro ferroxidase (Von Darl *et al.* 1994). Por esta razão, não é de excluir a possibilidade de ter sido amplificada nalgum dos tecidos examinados a soma ferritina. A clonagem e caracterização dos produtos de amplificação obtidos ajudará a elucidar este aspeto.

Tanto quanto foi possível esclarecer, a presença do gene *ENK* em invertebrados foi até ao momento identificada no mexilhão (Bartel *et al.* 2012), tendo sido proposto como um marcador útil para estudar o isolamento reprodutivo nesta espécie. A sequência estudada neste trabalho foi obtida através de "primers" elaborados a partir de uma sequência prevista para *Crassostrea gigas* por análise bioinformática automática baseada no método Gnomon (XM_020073651.1, Genbank). A clonagem e caracterização do gene em *Lymnaea stagnalis,* a partir dos produtos de amplificação obtidos, permitirão a sua identificação na espécie, assim como o seu estudo filogenético.

3.2.5 Correlação entre os genes analisados

O mapa de correlação apresentado na figura 12 permite observar a existência de padrões na variação de expressão dos genes estudados. Da sua observação, nota-se

facilmente que a expressão de certos genes como o da AChBP, o da ovipostatina e o do recetor da serotonina se apresenta pouca associada à expressão dos restantes genes.

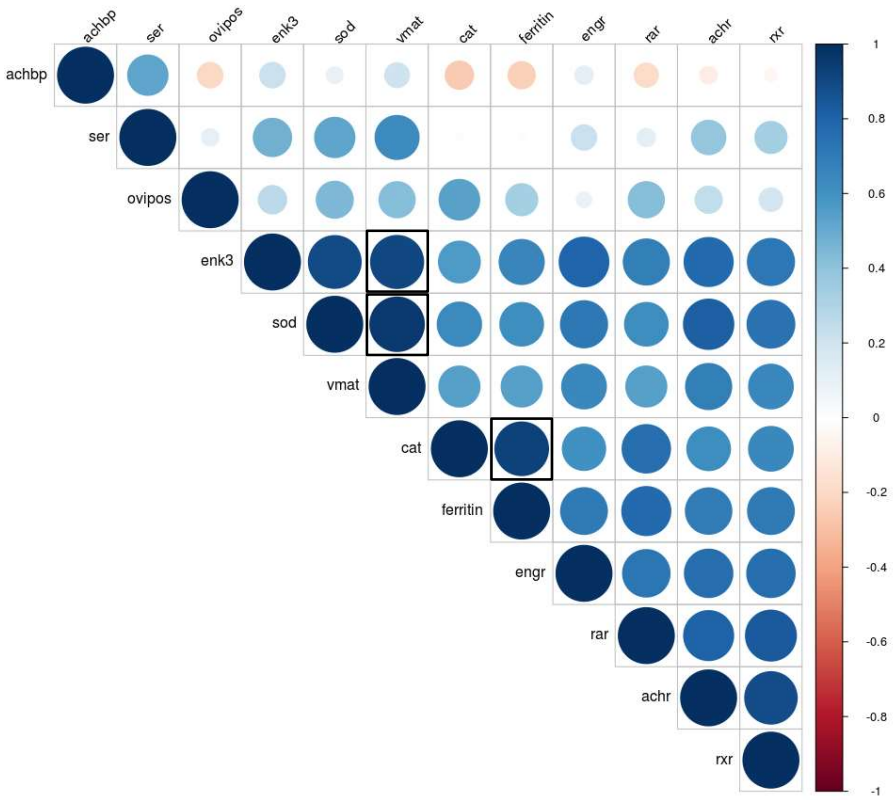


Figura 12 Mapa de correlações obtido para os genes analisados.

Por outro lado, entre os genes com variação associada, apenas se encontram correlações positivas. De entre as correlações observadas é de salientar em particular as correlações muito fortes observadas entre os genes *VMAT* e *ENK3* (0,90), *CAT* e *YOLKF* (0,92), e *VMAT* e *SOD* (0,95). É importante notar, que a correlação observada entre um dado par de genes pode dever-se à expressão de outros genes não medidos, eles próprios influenciando genes em vias de sinalização diferentes cuja variação de expressão pode por isso aparecer associada. Contudo, a correlação tão elevada (≥ 0,90) observada para os três pares de genes acima indicados sugere que cada par poderá efetivamente pertencer a uma mesma via de sinalização, indicando algumas direções interessantes de trabalho futuro. Sabe-se, por exemplo, de estudos relacionados com doenças humanas, que o metabolismo da dopamina, também presente em *L. stagnalis*, é bastante complexo e ligado ao stresse oxidativo (Meiser *et al.* 2013). A dopamina é sintetizada nas neurites dos neurónios dopaminérgicos pela ação combinada da tirosina hidroxilase e da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos, sendo importada para vesículas sinápticas pela VMAT2. A dopamina que se vai perdendo ou escoando destas vesículas no seu percurso sofre

degradação por desaminação oxidativa pela enzima monoamina oxidase. Neste processo ocorre a geração de espécies reativas de oxigénio, incluindo o anião superóxido que é neutralizado por ação da enzima SOD (Meiser *et al.* 2013).

Globalmente, o presente trabalho permitiu obter valores basais de expressão de genes de interesse para diferentes funções fisiológicas na espécie estudada. Observou-se variabilidade elevada nos valores de expressão de alguns genes que poderá ser devida a diferenças de idade ou maturação entre os animais analisados, e deve ser tida em conta no planeamento de experiências futuras. Um aspeto essencial, que pode ter contribuído para a deteção de expressão de alguns dos genes em tecidos em que se esperam níveis de expressão residuais (*e.g.*, *SERR* no pé ou alguns genes determinados no sistema nervoso central) foi a fixação prévia em RNA*later*, antes de se efetuar a dissecção e isolamento dos tecidos a analisar.

4. Conclusões e perspetivas futuras

O trabalho realizado permitiu uma caracterização histológica geral de alguns tecidos de *L. stagnalis.* Resultou também na determinação de genes de referência a utilizar em trabalhos futuros com os tecidos analisados, e valores de expressão basal para doze genes envolvidos em funções vitais da espécie em estudo, incluindo a neurotransmissão serotonérgica e colinérgica, defesas antioxidantes e proteínas com papel essencial na mobilidade do esperma, na deposição de ovos ou na vitelogénese. Com base nos resultados obtidos, o trabalho a realizar futuramente consiste na clonagem e sequenciação dos produtos de RT-qPCR obtidos para confirmação das sequências amplificadas, em particular do *ENK3* cujos "primers" foram elaborados a partir da sequência de uma outra espécie de molusco, confirmação dos produtos amplificados e conhecimento da estrutura dos genes nos diferentes tecidos. Este passo ajudará a elucidar sobre expressão dos genes de interesse em tecidos em que não foi detetada anteriormente ou de suas possíveis isoformas.

5. Referências

Amorim, J.; Abreu, I.; Rodrigues, P.; Peixoto, D.; Pinheiro, C.; Saraiva, A.; Carvalho, A. P.; Guimarães, L. and Oliva-Teles, L. (2019). "Lymnaea stagnalis as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies." Science of The Total Environment **669**: 11-28.

Amos, L. A. (2008). "The tektin family of microtubule-stabilizing proteins." Genome Biology **9**(7): 229-229.

Amoutzias, G. D.; Pichler, E. E.; Mian, N.; De Graaf, D.; Imsiridou, A.; Robinson-Rechavi, M.; Bornberg-Bauer, E.; Robertson, D. L. and Oliver, S. G. (2007). "A protein interaction atlas for the nuclear receptors: properties and quality of a hub-based dimerisation network." BMC Systems Biology **1**: 34-34.

Amparyup, P.; Klinbunga, S. and Jarayabhand, P. (2010). "Identification and Expression Analysis of Sex-Specific Expression Markers of Thai Abalone Haliotis asinina, Linneaus, 1758." Journal of Shellfish Research **29**(3): 765-773.

Andersen, C. L.; Jensen, J. L. and Ørntoft, T. F. (2004). "Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets." Cancer Research **64**(15): 5245.

Atli, G. and Grosell, M. (2016). "Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (Lymnaea stagnalis) during acute copper exposure." Aquatic Toxicology **176**: 38-44.

Banks, G.; Kemenes, I.; Schofield, M.; O'Shea, M. and Korneev, S. A. (2009). "Acetylcholine binding protein of mollusks is unlikely to act as a regulator of cholinergic neurotransmission at neurite-neurite synaptic sites in vivo." The FASEB Journal **23**(9).

Barbas, D.; Zappulla, J. P.; Angers, S.; Bouvier, M.; Castellucci, V. F. and DesGroseillers, L. (2002). "Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HTap2) expressed in the CNS of Aplysia californica." Journal of Neurochemistry **80**(2): 335-345.

Bartel, M.; Hartmann, S.; Lehmann, K.; Postel, K.; Quesada, H.; Philipp, E. E. R.; Heilmann, K.; Micheel, B. and Stuckas, H. (2012). "Identification of sperm proteins as candidate biomarkers for the analysis of reproductive isolation in Mytilus: a case study for the enkurin locus." Marine Biology **159**(10): 2195-2207.

Benatti, C.; COLLIVA, C.; BLOM, J. M. C.; OTTAVIANI, E. and TASCEDDA, F. (2017). "Transcriptional effect of serotonin in the ganglia of *Lymnaea stagnalis*." Invertebrate survival journal **14**.

Bottke, W.; Burschyk, M. and Volmer, J. (1988). "On the origin of the yolk protein ferritin in snails." Roux's archives of developmental biology **197**(7): 377-382.

Bottke, W. and Sinha, I. (1979). "Ferritin as an exogenous yolk protein in snails." Wilhelm Roux's archives of developmental biology **186**(1): 71-75.

Bouétard, A.; Besnard, A.-L.; Vassaux, D.; Lagadic, L. and Coutellec, M.-A. (2013). "Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail Lymnaea stagnalis." Aquatic Toxicology **126**: 256-265.

Bouétard, A.; Noirot, C.; Besnard, A.-L.; Bouchez, O.; Choisne, D.; Robe, E.; Klopp, C.; Lagadic, L. and Coutellec, M.-A. (2012). "Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail Lymnaea stagnalis, with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced stress." Ecotoxicology **21**(8): 2222-2234.

Budha, P. B., Dutta J. & Daniel, B.A. (2010). "Lymnaea stagnalis. The IUCN Red List of Threatened Species 2010." Retrieved 30/11, 2017, from http://www.iucnredlist.org/details/155475/0.

Carriker, M. R. (1946). "Morphology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis apressa* Say." Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters **38**: 88.

Carriker, M. R. and Bilstad, N. M. (1946). "Histology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis apressa* Say." Transactions of the American Microscopical Society **65**: 25.

Carter, C. J.; Rand, C.; Mohammad, I.; Lepp, A.; Vesprini, N.; Wiebe, O.; Carlone, R. and Spencer, G. E. (2014). "Expression of a retinoic acid receptor (RAR)-like protein in the embryonic and adult nervous system of a protostome species." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **324**(1): 51-67.

Chapman, P. M. (2002). "Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology." Marine Pollution Bulletin **44**(1): 7-15.

Directive (2010). DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, OJ L276.

Eiden, L. E.; Schäfer, M. K. H.; Weihe, E. and Schütz, B. (2004). "The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine." Pflügers Archiv **447**(5): 636-640.

Ekanayake, P. M.; De Zoysa, M.; Kang, H.-S.; Wan, Q.; Jee, Y.; Lee, Y.-H.; Kim, S.-J. and Lee, J. (2008). "Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (Haliotis discus discus) catalase." Fish & Shellfish Immunology **24**(3): 267-278.

Feng, Z.-P.; Zhang, Z.; van Kesteren, R.; Straub, V.; van Nierop, P.; Jin, K.; Nejatbakhsh, N.; Goldberg, J.; Spencer, G.; Yeoman, M.; Wildering, W.; Coorssen, J.; Croll, R.; Buck, L.; Syed, N. and Smit, A. (2009). "Transcriptome analysis of the central nervous system of the mollusc Lymnaea stagnalis." BMC Genomics **10**(1): 451.

Frazer Alan, H. J. G. (1999). Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia, Lippincott-Raven

Hohagen, J.; Herlitze, I. and Jackson, D. J. (2015). "An optimised whole mount in situ hybridisation protocol for the mollusc Lymnaea stagnalis." BMC Developmental Biology **15**(1): 19.

Iijima, M.; Takeuchi, T.; Sarashina, I. and Endo, K. (2008). "Expression patterns of engrailed and dpp in the gastropod Lymnaea stagnalis." Development Genes and Evolution **218**(5): 237-251.

Iserte, J. A.; Stephan, B. I.; Goñi, S. E.; Borio, C. S.; Ghiringhelli, P. D. and Lozano, M. E. (2013). "Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides." Biotechnology research international **2013**: 383646-383646.

Jacobs, D. K.; Wray, C. G.; Wedeen, C. J.; Kostriken, R.; DeSalle, R.; Staton, J. L.; Gates, R. D. and Lindberg, D. R. (2000). "Molluscan engrailed expression, serial organization, and shell evolution." Evolution & Development **2**(6): 340-347.

Janse, C. (1973). "A Neurophysiological Study of the Peripheral Tactile System of the Pond Snail Lymnaea Stagnalis (L.)." Netherlands Journal of Zoology **24**(2): 93-161.

Kim, K.-Y.; Lee, S. Y.; Cho, Y. S.; Bang, I. C.; Kim, K. H.; Kim, D. S. and Nam, Y. K. (2007). "Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, Haliotis discus discus." Fish & Shellfish Immunology **23**(5): 1043-1059.

Kim, T. and Yang, Q. (2013). "Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system." World journal of cardiology **5**(6): 164-174.

Klinbunga, S.; Amparyup, P.; Khamnamtong, B.; Hirono, I.; Aoki, T. and Jarayabhand, P. (2009). "Identification, Characterization, and Expression of the Genes TektinA1 and Axonemal Protein 66.0 in the Tropical Abalone Haliotis asinina." Zoological Science **26**(6): 429-436.

Koene, J. M.; Hoffer, J. and Brouwer, A. (2009). "Reduced egg laying caused by a male accessory gland product opens the possibility for sexual conflict in a simultaneous hermaphrodite." Animal Biology **59**(4): 435-448.

Koene, J. M.; Sloot, W.; Montagne-Wajer, K.; Cummins, S. F.; Degnan, B. M.; Smith, J. S.; Nagle, G. T. and ter Maat, A. (2010). "Male Accessory Gland Protein Reduces Egg Laying in a Simultaneous Hermaphrodite." PLoS ONE **5**(4): e10117.

Larsson, M.; Norrander, J.; Gräslund, S.; Brundell, E.; Linck, R.; Ståhl, S. and Höög, C. (2000). "The spatial and temporal expression of Tekt1, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme." European Journal of Cell Biology **79**(10): 718-725.

Lopes, M.; Rodrigues, A. and Marigómez, I. (2001). Morphology and histology of the digestive gland of Oxychilus (Drouetia) atlanticus (Morelet & Drouët) (Gastropoda: Pulmonata).

Lőw, P.; Molnár, K. and Kriska, G. (2016). Atlas of Animal Anatomy and Histology. Springer International Publishing

Luo, L.; Siah, C. K. and Cai, Y. (2017). "Engrailed acts with Nejire to control decapentaplegic expression in the tje Drosophila ovarian stem cell niche." Development **144**(18): 3224.

McKenzie, J. D.; Caunce, M.; Hetherington, M. S. and Winlow, W. (1998). "Serotonergic innervation of the foot of the pond snail Lymnaea stagnalis (L.)." Journal of Neurocytology **27**(6): 459-470.

Meiser, J.; Weindl, D. and Hiller, K. (2013). "Complexity of dopamine metabolism." Cell communication and signaling : CCS **11**(1): 34-34.

Mendoza-Porras, O. (2014). "Exploiting genomic data to identify proteins involved in abalone reproduction." Journal of proteomics **v. 108**: pp. 337-353-2014 v.2108.

Mesquita, S. R.; van Drooge, B. L.; Oliveira, E.; Grimalt, J. O.; Barata, C.; Vieira, N.; Guimarães, L. and Piña, B. (2015). "Differential embryotoxicity of the organic pollutants in rural and urban air particles." Environmental Pollution **206**: 535-542.

Muschamp, J. W. and Fong, P. (2001). "Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail Biomphalaria glabrata: Reduction of egg laying and induction of penile erection." Journal of Experimental Zoology **289**: 202-207.

Nederbragt, A. J.; van Loon, A. E. and Dictus, W. J. A. G. (2002). "Expression of Patella vulgata Orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in Adjacent Domains during Molluscan Shell Development Suggests a Conserved Compartment Boundary Mechanism." Developmental Biology **246**(2): 341-355.

Norrander, J. M.; Amos, L. A. and Linck, R. W. (1992). "Primary structure of tektin A1: comparison with intermediate-filament proteins and a model for its association with tubulin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(18): 8567-8571.

OCDE (2016). Test No. 243: Lymnaea stagnalis Reproduction Test. OECD Publishing

Olsen, L.; Sunesen, J. and Pedersen, B. (2001). Small Freshwater Creatures, Oxford University Press.

Pavlova, G. A. (2010). "Muscular waves contribute to gliding rate in the freshwater gastropod Lymnaea stagnalis." Journal of Comparative Physiology A **196**(4): 241-248.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR." Nucleic Acids Research **29**(9): e45-e45.

Plesch, B.; C. B, J. and Boer, H. H. (1974). Gross Morphology and Histology of the Musculature of the Freshwater Pulmonate Lymnaea Stagnalis (L.).

Plesch, B.; DE JONG-BRINK, M. and Boer, H. H. (1971). "Histological and Histochemical Observations On the Reproductive Tract of the Hermaphrodite Pond Snail Lymnaea Stagnalis (L.)." Netherlands Journal of Zoology **21**(2): 180-201.

Russel, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. London

Sadamoto, H.; Takahashi, H.; Okada, T.; Kenmoku, H.; Toyota, M. and Asakawa, Y. (2012). "De Novo Sequencing and Transcriptome Analysis of the Central Nervous System of Mollusc Lymnaea stagnalis by Deep RNA Sequencing." PLoS ONE **7**(8): e42546.

Samadi, L. and Steiner, G. (2009). "Involvement of Hox genes in shell morphogenesis in the encapsulated development of a top shell gastropod (Gibbula varia L.)." Development Genes and Evolution **219**(9): 523-530.

San-Segundo, L.; Guimarães, L.; Fernández Torija, C.; Beltrán, E. M.; Guilhermino, L. and Pablos, M. V. (2016). "Alterations in gene expression levels provide early indicators of chemical stress during Xenopus laevis embryo development: A case study with perfluorooctane sulfonate (PFOS)." Ecotoxicology and Environmental Safety **127**: 51-60.

Sapiro, R.; Kostetskii, I.; Olds-Clarke, P.; Gerton, G. L.; Radice, G. L. and Strauss Iii, J. F. (2002). "Male Infertility, Impaired Sperm Motility, and Hydrocephalus in Mice Deficient in Sperm-Associated Antigen 6." Molecular and Cellular Biology **22**(17): 6298-6305.

Saur, M.; Moeller, V.; Kapetanopoulos, K.; Braukmann, S.; Gebauer, W.; Tenzer, S. and Markl, J. (2012). "Acetylcholine-Binding Protein in the Hemolymph of the Planorbid Snail Biomphalaria glabrata Is a Pentagonal Dodecahedron (60 Subunits)." PLoS ONE **7**(8): e43685.

Siddig, A. A. H.; Ellison, A. M.; Ochs, A.; Villar-Leeman, C. and Lau, M. K. (2016). "How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators." Ecological Indicators **60**: 223-230.

Sixma, T. K. and Smit, A. B. (2003). "Acetylcholine Binding Protein (AChBP): A Secreted Glial Protein That Provides a High-Resolution Model for the Extracellular Domain of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **32**(1): 311-334.

Smit, A. B.; Celie, P. H. N.; Kasheverov, I. E.; Mordvintsev, D. Y.; van Nierop, P.; Bertrand, D.; Tsetlin, V. and Sixma, T. K. (2006). "Acetylcholine-binding proteins." Journal of Molecular Neuroscience **30**(1): 9-10.

Smit, A. B.; Syed, N. I.; Schaap, D.; van Minnen, J.; Klumperman, J.; Kits, K. S.; Lodder, H.; van der Schors, R. C.; van Elk, R.; Sorgedrager, B.; Brejc, K. a.; Sixma, T. K. and Geraerts, W. P. M. (2001). "A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission." Nature **411**: 261.

Step, E. (1901). Shell Life: An Introduction to the British Mollusca, F. Warne & Company.

Sugamori, K. S.; Sunahara, R. K.; Guan, H. C.; Bulloch, A. G.; Tensen, C. P.; Seeman, P.; Niznik, H. B. and Van Tol, H. H. (1993). "Serotonin receptor cDNA cloned from Lymnaea stagnalis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(1): 11-15.

Sutton, K. A.; Jungnickel, M. K.; Wang, Y.; Cullen, K.; Lambert, S. and Florman, H. M. (2004). "Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm." Developmental Biology **274**(2): 426-435.

Teles, M.; Reyes-López, F. E.; Balasch, J. C.; Tvarijonaviciute, A.; Guimarães, L.; Oliveira, M. and Tort, L. (2019). "Toxicogenomics of Gold Nanoparticles in a Marine Fish: Linkage to Classical Biomarkers." Frontiers in Marine Science **6**(147).

ThethreeRs (2018, 22-02-2018). "The three Rs." Retrieved 5-08-2019, 2019, from http://www.understandinganimalresearch.org.uk/how/three-rs/.

Tierney, A. J. (2001). "Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **128**(4): 791-804.

Urbatzka, R.; Galante-Oliveira, S.; Rocha, E.; Castro, L. F. C. and Cunha, I. (2013). "Normalization strategies for gene expression studies by real-time PCR in a marine fish species, Scophthalmus maximus." Marine Genomics **10**: 17-25.

van Nierop, P.; Bertrand, S.; Munno, D. W.; Gouwenberg, Y.; van Minnen, J.; Spafford, J. D.; Syed, N. I.; Bertrand, D. and Smit, A. B. (2006). "Identification and Functional Expression of a Family of Nicotinic

Acetylcholine Receptor Subunits in the Central Nervous System of the Mollusc Lymnaea stagnalis." Journal of Biological Chemistry **281**(3): 1680-1691.

Von Darl, M.; Harrison, P. M. and Bottke, W. (1994). "cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail Lymnaea stagnalis L." European Journal of Biochemistry **222**(2): 353-366.

Weber, K.; Mahnke, D.; Sieratowicz, A.; Kiporou, E. and Oehlmann, J. (2013). Endocrine modulators in snails. Karbe E, Drommer W, Germann P-G, Morawietz G and Kellner R. Classic Examples in Toxicologic Pathology, 5th edition, European Society of Toxicologic Pathology, CD-ROM