

ANÁLISE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *BIOMPHALARIA PEREGRINA* (PLANORBIDAE) EM BAGÉ, RS

Mariana Fabris Xavier¹, Demetrius da Silva Martins², Patricia Jacqueline Thyssen², Juliana Cordeiro³

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia/IB/Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – e-mail: marifxr@gmail.com

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia/IB/Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

³Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética /IB/Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – e-mail: jlncdr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de *Biomphalaria* (Planorbidae) registradas para o Brasil, ao menos três são hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni* (Trematoda), sendo elas *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Além disso, experimentos demonstram que *B. amazonica*, *B. cousini* e *B. peregrina* podem ser infectadas pelo parasito em condições laboratoriais (PARAENSE, 1975; CARVALHO et al., 2008; TEODORO et al., 2010, 2011). *Biomphalaria peregrina* é considerada uma das espécies de planorbídeos mais amplamente distribuídas na região Neotropical. Além de ser um potencial hospedeiro de *S. mansoni* é também suscetível a *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda), outro parasito com capacidade de infectar o homem, causando angiostrongilose abdominal.

Atualmente, no Rio Grande do Sul foram registradas *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. oligoza*, *B. peregrina*, *B. tenagophila guaibensis* e *B. glabrata*. A identificação até o nível específico dentro do gênero *Biomphalaria* é bastante difícil utilizando apenas dados morfológicos. Isto é um reflexo do tamanho reduzido dos espécimes e de uso de processos inadequados de fixação, além da escassez de especialistas na área (MINISTERIO DE SAUDE, 2007). Outros fatores que dificultam a identificação são as variações intra e interespecíficas encontradas nos caracteres morfológicos utilizados (VIDIGAL et al., 2000) No entanto, o conhecimento sobre diferentes populações de diferentes espécies pode contribuir não só com a identificação das espécies registradas em território brasileiro, mas com a compreensão das relações filogenéticas existente entre as espécies de distribuição no Brasil e nos demais países da América do Sul. Essas informações abrem um leque para entender a distribuição da esquistossomose em nosso território e mapear potenciais novos hospedeiros deste agente etiológico.

A utilização de técnicas moleculares vem sendo considerada uma ferramenta promissora para auxiliar na caracterização dessas espécies nos casos em que a morfologia comparativa não é conclusiva (SPATZ et al. 2000; PEPE et al., 2009; VIDIGAL et al. 2000a). A Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês PCR) é uma técnica molecular que consiste na utilização de primers específicos para a amplificação de determinada sequência genética. Esta técnica tem permitido a identificação de diversos organismos como fungos, protozoários e alguns vírus através da utilização de marcadores moleculares específicos (HEBERT et al., 2003) . Atualmente, o gene mitocondrial COI vem ganhando destaque como marcador molecular devido a iniciativa do projeto internacional IBOL que consiste em criar um banco de dados de sequências gênicas para identificação de espécies. Este marcador, o COI, tem se mostrado eficiente na

identificação de planorbídeos do gênero *Biomphalaria* e os resultados gerados pela sua utilização corroboram com os obtidos por outros marcadores moleculares.

Neste estudo buscou-se utilizar o marcador molecular COI para aumentar a acurácia na identificação da espécie *Biomphalaria peregrina* proveniente de uma população do município de Bagé, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

As coletas foram realizadas usando conchas de captura e a triagem e identificação dos exemplares feita em laboratório. O DNA de nove indivíduos foi extraído com o kit de extração Qiagen conforme instruções do fabricante. As reações de PCR foram feitas em 25ul finais usando aproximadamente 25ng de DNA, 5pmol de cada primer, 1U Taq recombinant (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 1X de tampão de PCR. Os ciclos de PCR foram feitos com temperatura de anelamento de 50°C com o uso dos primers LCO e HCO (FOLMER et al., 1994). Esses primers anelam na porção inicial do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COI), gerando um fragmento de aproximadamente 658pb. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%. Amostras com uma banda foram purificadas com ExoSAPIT (USB). As amostras foram enviadas para sequenciamento na MACROGEN (www.macrogen.com). Em todos os casos, ambas as fitas (forward e reverse) foram sequenciadas. A qualidade do cromatograma foi verificada com o programa Chromas. As sequências foram editadas usando o programa PreGap e Gap4 do Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento foi feito na ferramenta ClustalW contida no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). As análises filogenéticas foram realizadas acrescentando sequências disponíveis no GenBank para as outras espécies de *Biomphalaria* com distribuição no Brasil: *B. glabrata* (AF199092, HQ339971, EF012167, AF199111, AF199094, AY380567, NC 005439, DQ084823, AF199096, DQ084824, AF199095, AF199093, AF199091), *B. occidentalis* (AF199090), *B. tenagophila* (AF199089, EF433576, NC 010220), *B. straminea* (AF199085, AF199084) e *B. peregrina* (JN621902, JN621903, JN621901, GU168593). Como *outgroup* foi usada a sequência de *Gyraulus chinensis* (AF199086). A análise filogenética foi realizada no programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) por meio do método de reconstrução filogenético Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), usando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), normalmente utilizado para análises do gene COI. Os valores de confiança para cada clado foi calculado por teste de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações. A análise de distância genética foi feita também no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

3. RESULTADOS

Foram obtidas 33 sequências alinhadas. Estas sequências possuem 204 sítios polimórficos ao longo dos 636pb analisados. Por meio do método de reconstrução de Neighbor-Joining, usando o modelo de evolução Kimura 2-parâmetros, as sequências obtidas dos indivíduos de Bagé agruparam com *B. peregrina*, como esperado. Porém, vê-se claramente dois clados dentro desta espécie. Analisando as distâncias genéticas entre as espécies, as comparações entre as sequências de Bagé e *B. peregrina* são as menores (0,013). Porém, quando comparamos as distâncias genéticas intraespecíficas, Bagé possui as maiores distâncias genéticas entre seus indivíduos. Esses dados podem estar

refletindo o achado na filogenia, onde encontramos dois clados, com alto suporte, para as sequências de Bagé.

4. CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que a análise do gene COI foi capaz de separar as diferentes espécies de *Biomphalaria*, mostrando que este pode ser mais um marcador que auxilia na identificação dessas espécies. Por outro lado, nossas análises levantaram questões sobre a estruturação genética da população de Bagé. Este ponto é uma perspectiva de trabalho que poderá ter continuação.

5. REFERÊNCIAS

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa Vigilância e controle da Esquistossomose (PCE). Ministério da Saúde. 2ª Ed. Brasília, DF: **Editora do Ministério da Saúde**. p. 178, 2007.

CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL, EDITORS. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**; p. 1123, 2008.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution** 39:783–791. 1985

FOLMER O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**. 3(5):294-9. 1994

HEBERT PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences** 270: 313–321

KIMURA M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** 16:111–120

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**, v.55, p. 105-128, 1975.

PEPE, M.S.; CALDEIRA, R.L.; CARVALHO, O.S; MÜLLER, G.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; RODRIGUES, A.P.; AMARAL, H.L. & BERNE, M.E. *Biomphalaria* molluscs (Gastropoda: Planorbidae) in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.104, n. 5, p.783-786, 2009.

SAITOU N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol** 4:406–425. 1987

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SILVA, M.C.A.; CAPPA, S.M.G. & CARVALHO, O.S. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme

digestion of the internal transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene
Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 6, p. 807-814, 2000.

STADEN R. The Staden sequence analysis package. **Mol Biotechnol** 5:233–241.
1996

TAMURA, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S..
MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,
Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.** 28,
2731–2739. 2011

VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G. & CARVALHO, O.S.
Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil.
Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 1, p. 57-66, 2000a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.R.;
MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.G. & CARVALHO, O.S.. Phylogenetic
relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae)
based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**, v. 121, p. 611-
620, 2000b.