

EFETIVIDADE DE DOIS MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BIOMPHALARIA* UTILIZANDO PREMISSAS DA TÉCNICA DE DNA BARCODE

MARIANA FABRIS XAVIER¹; DEMETRIUS DA SILVA MARTINS²; PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN²; CAROLINE DOS SANTOS DUARTE²; JULIANA CORDEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas – marifxr@gmail.com

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Universidade Federal de Pelotas e IFSUL – CAMPUS Pelotas – demetriusmartins@yahoo.com.br

³Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética - Universidade Federal de Pelotas – jlncdr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A família de caramujos de água doce Planorbidae abrange importantes gêneros que atuam como hospedeiros intermediários de trematódeos que causam doenças para o homem e outros animais. Os principais gêneros de importância epidemiológica são *Bulinus* e *Biomphalaria*. O primeiro não ocorre nas Américas e o segundo é encontrado na África, Ásia, América do Sul e Antilhas (REY, 2001), além de recentes introduções no continente Europeu (LOFTY et al. 2005; POINTIER et al. 2005; MAJOROS et al. 2008). No Brasil, o gênero *Biomphalaria* está representado por 11 espécies e uma subespécie. *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são as espécies de hospedeiros invertebrados mais suscetíveis e, portanto, mais importantes na disseminação do parasita em todo o território. Além disso, *B. amazonica*, *B. cousini* e *B. peregrina* podem ser infectadas pelo parasita em condições laboratoriais, sendo consideradas vetores potenciais (PARAENSE, 1975; CARVALHO et al., 2008). O parasita *Schistosoma mansoni* é o causador da esquistossomose, doença que atinge cerca de seis milhões de pessoas no mundo (BRASIL, 2007). Assim, uma identificação rápida e correta das espécies de caramujos que fazem parte desse ciclo, ou que apresentam capacidade de serem infectados, se faz necessária. A identificação específica baseada em dados morfológicos dentro desse gênero é considerada muito laboriosa devido ao rotineiro uso de processos inadequados de fixação das amostras e da escassez de taxonomistas especialistas, além da alta variabilidade intra e interespecífica dos caracteres utilizados (BRASIL, 2007; VIDIGAL et al., 2000). Um procedimento que pretende tornar a identificação de espécies mais prática e efetiva é a técnica de DNA Barcode. Esse método consiste em uma técnica padronizada envolvendo sequenciamento de um gene que servirá como um código de barras para cada espécie, posteriormente, estes dados serão depositados em um banco de livre acesso (HEBERT et al., 2003a). Porém, para que a técnica seja efetiva, é necessário escolher o gene que apresente padrões de valores de diferenciação entre espécies bem definidos (HEBERT et al., 2003b; HEBERT & GREGORY, 2005). O gene COI vem se mostrando adequado na identificação dentro do gênero *Biomphalaria* (VIDIGAL, 2013). Para outros filós, o gene também vem se mostrando eficaz como pode ser visto em levantamento feito por HERBERT (2003b). Inclusive, em um estudo feito com mamíferos por LUO et al. (2001) em que todos os

genes mitocondriais são comparados, o COI demonstrou ser o mais representativo em diferenciação específica. Porém, outro marcador molecular, um fragmento do gene 16S, já foi utilizado para *Biomphalaria* e também se mostrou eficaz na diferenciação e agrupamento de espécies. (JANOTTI-PASSOS, 2010). Ainda, em estudo feito com anfíbios por VENCE et al. (2005), esse gene demonstrou ser mais eficiente que o COI. No entanto, poucos trabalhos procuram elucidar qual marcador é mais efetivo para técnica de DNA Barcode aplicada ao gênero *Biomphalaria*. Visto a importância e as dificuldades da correta identificação específica do gênero, esse trabalho objetiva testar a efetividade da utilização dos genes COI e 16S como marcadores moleculares da técnica de Barcode.

2. METODOLOGIA

As coletas dos indivíduos aqui analisados foram feitas no município de Bagé, utilizando conchas de captura. A triagem e identificação dos exemplares foram feitas no Laboratório de Malacologia da Universidade Federal de Pelotas. O DNA de nove indivíduos previamente identificados como pertencentes ao gênero *Biomphalaria* foi extraído utilizando kit DNeasy Blood & Tissue® (Qiagen) conforme protocolo fornecido pelo fabricante. As reações de PCR foram feitas em 25ul finais usando aproximadamente 25ng de DNA, 5pmol de cada primer, 1U *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 1,25µl de Mg e 1X de tampão de PCR. Os ciclos de PCR foram feitos com temperatura de anelamento de 53C° para os primers LCO e HCO (FOLMER et al., 1994) e de 50C° para os primers 16Sar e 16Br (Palumbi, 1996). Os primers LCO e HCO anelam na porção inicial do gene mitocondrial *citocromo oxidases 1 (COI)*, gerando um fragmento de aproximadamente 658 pb. E os primers 16Sar e 16SBr anelam no gene ribossomoal 16S, gerando um fragmento de aproximadamente 450pb. Os amplicons foram conferidos em gel de agarose 1%. Amostras positivas foram purificadas com ExoSAPIT® (USB) e enviadas para sequenciamento na empresa MACROGEN (www.macrogen.com). Em todos os casos, ambas as fitas (*forward* e *reverse*) foram sequenciadas. A qualidade do sinal gerado no sequenciamento foi verificada através do cromatograma das amostras no programa Chromas. Após, as sequências foram editadas utilizando o programa PreGap e Gap4 do pacote de programas Stagen Package (STADEN, 1996). O alinhamento foi feito na ferramenta ClustalW inserida no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Foram realizadas duas análises filogenéticas distintas, uma para o gene COI e uma para o gene 16S, nas análises foram acrescentadas sequências de cada gene disponíveis no GenBank para as espécies de *Biomphalaria* com distribuição no Brasil. Para a análise do gene COI foram utilizadas sequências de: *B. glabrata* (13 sequências), *B. occidentalis* (uma sequência), *B. tenagophila* (três sequências), *B. straminea* (duas sequências) e *B. peregrina* (quatro sequências). Para a análise do gene 16S foram utilizadas as sequências de: *B. glabrata* (28 sequências); *B. occidentalis* (12 sequências); *B. tenagophila* (10 sequências); *B. straminea* (16 sequências), *B. oligoza* (uma sequência) e *B. peregrina* (10 sequências). Para as análises de COI, foi utilizada a sequência do planorbídeo *Gyraulus chinensis* como *outgroup* e para as análises com 16s foi utilizada a sequência de *Gyraulus parvus*. As análises filogenéticas foram

realizadas no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013) por meio do método de reconstrução filogenético Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), usando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), conforme adotado pela técnica de DNA Barcode. Os valores de confiança para cada clado foram calculados através do teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações. As análises de distância genética também foram feitas no programa MEGA6 utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma premissa da técnica de *DNA barcode* é que a divergência genética intraespecífica é sempre menor do que a divergência interespecífica e que essa diferença é tão clara que gera uma lacuna (*gap*) entre esses valores. Essa lacuna entre os valores de divergência genética intra e interespecífico é chamado de *Barcode Gap*. Assim, para que a técnica de *DNA barcode* seja eficiente na identificação de espécies, o gene a ser utilizado como marcador deve apresentar essas características e gerar um *Barcode gap* bem definido (HERBERT & GREGORY, 2005). Segundo HERBERT (2003b), indivíduos de mesma espécie devem apresentar menos de 0,03% de divergência genética, se a divergência for acima desse valor, os indivíduos serão considerados de espécies diferentes. Assim, um bom marcador molecular não deve gerar divergências com valores de 0,03%, pois esse é o intervalo de valores em que o *Barcode gap* deve estar posicionado separando as amostras em espécies distintas. Para avaliarmos qual marcador apresentou melhor desempenho na diferenciação de espécies, procuramos analisar a formação de *Barcode gap* na distribuição de valores de divergência genética gerados por cada marcador. Os valores de divergência genética apresentados pelo COI tiveram a seguinte distribuição: 30% foram de 0 a 0,2%; 5% foram de 0,4 a 0,08%; 40% foram de 0,09 a 0,10% e 20% foram de 0,11 a 0,14%. Não apresentando nenhum valor de divergência genética de 0,03%. Claramente, houve a formação de um *Barcode gap* entre os valores de 0,03% e 0,4%. A distribuição dos valores de divergência genética gerado pelo marcador 16S foi mais homogênea, apresentando a seguinte disposição: 30% foram de 0 a 0,2%, 5% foram de 0,3%; 15% foram de 0,4 a 0,8%; 25% foram de 0,9 a 0,10% e 30% foram de 0,11 a 0,14. Não havendo a formação de um *Barcode gap*. As sequências geradas nesse trabalho, tanto do gene COI quanto do gene 16S, comparadas as de *B. peregrina* do GenBank, apresentaram a menor divergência genética, abaixo de 0,03%. Ao avaliarmos as relações filogenéticas recuperadas pela nossa metodologia, os indivíduos de Bagé agruparam com as sequências de *B. peregrina* com valor de bootstrap de 99% para 16S e 100% para COI, corroborando com os valores de divergência genética e demonstrando que as amostras geradas por esse trabalho são de indivíduos da espécie *B. peregrina*.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que o marcador COI é o mais eficiente na identificação e diferenciação de espécies do gênero *Biomphalaria* utilizando premissas da técnica de *DNA Barcode*, pois há uma clara formação de *Barcode gap* nos valores de divergência genética gerados por ele.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, 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.

HERBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003a.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S., DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase sbunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, 2003b.

HERBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

LOTFY, W.M.; DEJONG, R.J.; ABDEL-KADER, A.; LOKER, E.S. A molecular survey of *Biomphalaria* in Egypt. Is *B. glabrata* present? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, p. 131-139, 2005.

LUO, A.; ZHANG, A.; HO, S.Y.; XU, W.; ZHANG, Y.; SHI, W.; CAMERON, S. L.; ZHU, C. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. **BMC Genomics**, v. 12, n. 84, 2011.

MAJOROS, G.; FEHÉR, Z.; DELI, T.; FOLDVÁRI, G., Establishment of *Biomphalaria tenagophila* snails in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1812-1814, 2008.

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

POINTIER, J.P.; JARNE, D. P. Biological invasions: the case of planorbid snails. **Journal of Helminthology**, v. 79, p. 249-56, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

VENCES, M.; THOMAS, M.; MEIJDEN, A. V.; CHIARY, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v.2, n.5, 2005.

JANOTTI-PASSOS, L.K.; RUIZ, J.C.; CALDEIRA, R.L.; MURTA, S.M.F.; COELHO, P.M.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic analysis of *Biomphalaria*

tenagophila (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p, 504-511, 2010.

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, 2000.

VIDIGAL, T.H.D.A.; COSCARELLI, D.; MONTRESOR, L.C. Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives. **Lundiana**, v. 11, n. 1/2, p. 47-63, 2013.