

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de  
*Biomphalaria straminea* e análise comparativa com  
*Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*

por

**Christiane de Oliveira Goveia**

Belo Horizonte  
Março/2010

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de  
*Biomphalaria straminea* e análise comparativa com  
*Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*

por

**Christiane de Oliveira Goveia**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração de Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Roberta Lima Caldeira

Co-Orientação: Liana Konovalof Jannotti-Passos

Belo Horizonte

Março/2010

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G721s Goveia, Christiane Oliveira.  
2010

Seqüenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* / Christiane Oliveira Goveia. – Belo Horizonte, 2010.

xii, 66 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 69 - 78

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/transmissão 2.  
*Schistosoma mansoni*/parasitologia 3.  
*Biomphalaria*/genética 4. DNA Mitocondrial/genética I.  
Título. II. Caldeira, Roberta Lima (Orientação). III.  
Janotti-Passos, Liana Konovaloff (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de  
*Biomphalaria straminea* e análise comparativa com  
*Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*

por

**Christiane de Oliveira Goveia**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Roberta Lima caldeira (Presidente)

Prof. Dra. Betania Paiva Drumond

Prof. Dra. Raquel Lopes Martins Souza

Suplente: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Dissertação defendida e aprovada em: 04/03/2010.

# Agradecimentos

Agradeço à Deus por todas as alegrias e conquistas em minha vida.

Agradeço aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo e às minhas irmãs pela paciência. A minha mãe, um agradecimento especial, você é um presente de Deus.

Agradeço ao Marcos, amor da minha vida, por todo o carinho e apoio incondicional.

A todos os meus familiares que me incentivaram e me ajudaram de alguma forma.

À minha orientadora, Dra. Roberta Lima Caldeira, pelos ensinamentos, pela amizade, confiança e por ser um exemplo como pessoa e profissional.

À Dra Liana Konovalof Jannotti Passos, minha co-orientadora pelos incentivos e valiosas sugestões.

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho, pela confiança e também pelas oportunidades que me foram oferecidas.

À Equipe do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, em especial ao Dr. Jerônimo Ruiz e Patrícia de Cássia Ruy pela ajuda com os programas de Bioinformática. À Elisângela Monteiro e Fernanda Lourenço pelo suporte técnico no processo de sequenciamento, e ao Rommeo e Anderson Dunitini pela colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica, especialmente à Tatiana Teodoro e Cristiane Lafetá, pelas conversas, apoio e amizade de sempre.

À Cíntia Honório Vasconcelos, pela amizade incondicional.

A todos os meus amigos que me apoiaram sempre, em especial aos colegas do Santa Maria e da PUC.

À Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade deste curso.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e a Capes pelo apoio financeiro.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 O gênero <i>Biomphalaria</i> .....	14
1.2 Importância epidemiológica do gênero <i>Biomphalaria</i> no Brasil.....	15
1.3 DNA mitocondrial.....	18
1.3.1 Genoma mitocondrial de moluscos.....	21
1.3.2 Código de barra do DNA ( <i>DNA Barcode</i> ).....	22
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 Desenho esquemático da metodologia.....	29
4.2 Molusco.....	30
4.3 Extração de DNA.....	30
4.4 Reação em cadeia da polimerase das regiões 16S, COI, 12S e ND1.....	30
4.5 Sequenciamento dos produtos amplificados.....	32
4.6 Amplificação pela PCR dos fragmentos 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S e 16S-ND1.....	33
4.7 Clonagem molecular dos produtos de PCR.....	35
4.8 Sequenciamento dos clones.....	36
4.9 Análise das sequências obtidas no sequenciamento.....	38
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 Sequência parcial dos genes COI, 16S, ND1 e 12S.....	42
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase dos 4 fragmentos longos do DNA mitocondrial.....	42

5.3	Minipreps.....	43
5.4	Anotação e análise comparativa dos genes.....	44
5.5	Alinhamento múltiplo dos genes.....	46
5.5.1	Citocromo c oxidase subunidade I (COI).....	46
5.5.2	Citocromo c oxidase subunidade III (COIII).....	48
5.5.3	NADH1 Desidrogenase subunidade 1 (ND1).....	48
5.5.4	NADH2 Desidrogenase subunidade 2 (ND2).....	49
5.5.5	NADH3 Desidrogenase subunidade 3 (ND3).....	50
5.5.6	NADH4 Desidrogenase subunidade 4 (ND4).....	51
5.5.7	NADH5 Desidrogenase subunidade 5 (ND5).....	52
5.5.8	NADH6 Desidrogenase subunidade 6 (ND6).....	53
5.6	Sequência de nucleotídeos do COI.....	53
5.7	Ordem gênica.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>
8.1	Anexo 1 – Sequência parcial do gene COI.....	66
8.2	Anexo 2 – Sequência parcial do gene 16S.....	66
8.3	Anexo 3 – Sequência parcial do gene ND1.....	67
8.4	Anexo 4 – Sequência parcial do gene 12S.....	67
8.5	Anexo 5 – Sequência parcial do gene COIII.....	68
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Molusco do gênero <i>Biomphalaria</i> com desova.....	15
FIGURA 2: Mapa do Brasil com a distribuição espacial de <i>B. glabrata</i> .....	17
FIGURA 3: Mapa do Brasil com a distribuição espacial de <i>B. tenagophila</i> .....	17
FIGURA 4: Mapa do Brasil com a distribuição espacial de <i>B. straminea</i> .....	17
FIGURA 5: Desenho esquemático de uma mitocôndria.....	18
FIGURA 6: DNA mitocondrial de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	22
FIGURA 7: Desenho esquemático demonstrando alguns genes do DNAmT de <i>B. straminea</i> e a região onde foram desenhados os iniciadores.....	35
FIGURA 8: Desenho esquemático da metodologia de <i>primer walking</i> representando uma região alvo.....	37
FIGURA 9: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação pela PCR dos fragmentos longos.....	43
FIGURA 10: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando as minipreps obtidos com os quatro fragmentos do DNAmT utilizados.....	44
FIGURA 11: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína COI de <i>B. straminea</i> , <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> .....	47
FIGURA 12: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína COIII de <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	48
FIGURA 13: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND1 de <i>B. glabrata</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. straminea</i> .....	49
FIGURA 14: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND2 de <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	50
FIGURA 15: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND3 de <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	50
FIGURA 16: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND4 de <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	51
FIGURA 17: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND5 de <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	52
FIGURA 18: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND6 de <i>B. straminea</i> , <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> .....	53
FIGURA 19: Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene COI para <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. glabrata</i> .....	56
FIGURA 20: Desenho esquemático da ordem gênica de <i>B. glabrata</i> (sequência 1), <i>B. tenagophila</i> (sequência 2) e <i>B. straminea</i> .....	56



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Componentes básicos do DNA mitocondrial de animais.....	19
TABELA 2: Iniciadores utilizados para amplificar as regiões COI, 16S, ND1 e 12S do DNA mitocondrial de <i>B. straminea</i> .....	32
TABELA 3: Iniciadores desenhados para utilização no PCR longo.....	34
TABELA 4: Sequência dos iniciadores internos para metodologia de <i>Primer Walking</i> .....	38
TABELA 5: Código genético mitocondrial de invertebrados.....	40
TABELA 6: Códon de iniciação e parada encontrados em proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial de <i>B. straminea</i> (Bs), <i>B. tenagophila</i> (Bt) e <i>B. glabrata</i> (Bg).....	45
TABELA 7: Número de aminoácidos (aa) encontrados nas proteínas COI, COIII, ND2, ND3 ND4, ND5 e ND6 de <i>B. straminea</i> (Bs) e seu percentual de identidade com <i>B. tenagophila</i> (Bt) e <i>B. glabrata</i> (Bg).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>cm/s</b>	Centímetros por segundo
<b>CO</b>	Citocromo oxidase
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DNAmt</b>	ácido desoxirribonucléico mitocondrial
<b>dNTP</b>	deoxinucleotídeo trifosfato
<b>Kb</b>	kilobase
<b>M</b>	molar
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μg</b>	Micrograma
<b>ng</b>	Nanograma
<b>ND</b>	Nicotinamina Desidrogenase
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Refere-se a uma medida que indica se uma solução líquida é ácida, (pH < 7), neutra (pH = 7), ou básica/alcalina (pH > 7)
<b>qsp</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>Taq</b>	DNA polimerase termoestável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>%</b>	Por cento
<b>12S</b>	Subunidade menor do RNA ribossomal, subunidade 12
<b>16S</b>	Subunidade maior do RNA ribossomal, subunidade 16

## RESUMO

No Brasil, existem três espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Em virtude da importância epidemiológica dessas espécies, técnicas moleculares vêm sendo introduzidas no estudo destes moluscos. Com o desenvolvimento da técnica de sequenciamento automático de nucleotídeos, tornou-se possível aumentar consideravelmente as informações sobre o genoma de diversos organismos, inclusive sobre o DNA mitocondrial de moluscos, no qual os estudos vêm crescendo nos últimos anos. Das espécies do gênero *Biomphalaria*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* têm o seu genoma mitocondrial totalmente sequenciado. Neste trabalho foi parcialmente sequenciado e caracterizado o DNAm<sub>t</sub> de *B. straminea* e comparado aos de *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Para sequenciar o DNAm<sub>t</sub> de *B. straminea*, foi extraído o DNA total da região cefalopodal do molusco. Inicialmente as regiões 16S, citocromo c oxidase subunidade I (COI), 12S, citocromo c oxidase subunidade III (COIII) e ND1 foram parcialmente amplificadas e sequenciadas. A partir das sequências obtidas, iniciadores específicos foram desenhados para amplificar quatro fragmentos maiores do DNA mitocondrial de *B. straminea*: 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S e 16S-ND1, que foram clonados e sequenciados. Para a amplificação desses fragmentos foram utilizados iniciadores direcionados para a técnica de PCR longo e em seguida desenhados iniciadores internos (*primer walking*). Foram sequenciados 7.764 nucleotídeos, totalizando 2.588 aminoácidos, relativos aos genes: COI, COIII, ND1 (parcial), ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6. Foi realizada a comparação das sequências dos aminoácidos, dos códons de iniciação e de parada entre *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*, sendo encontradas diferenças no tamanho e na composição dos genes. A ordem dos genes de *B. straminea* foi a mesma que a de *B. tenagophila* e *B. glabrata*. A sequência nucleotídica do gene COI foi analisada devido ao seu potencial na separação de espécies, baseada na abordagem de código de barra de DNA (*DNA Barcode*). Esta análise permitiu distinguir *B. straminea* das outras duas espécies transmissoras da esquistossomose no Brasil.

## ABSTRACT

In Brazil, there are three intermediate host species of *Schistosoma mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*. Due to the epidemiologic relevance of these species, molecular techniques have been introduced in the study of these molluscs. The development of the technique for automatic sequencing of nucleotides has enabled a considerable increase of information about the genome of several organisms, including the mitochondrial DNA of molluscs whose studies have been increasing in recent years. The *B. glabrata* and *B. tenagophila* species present totally sequenced mitochondrial genomes. In this work, the mtDNA of *B. straminea* was partially sequenced and compared to those of *B. glabrata* and *B. tenagophila*. In order to sequence the mtDNA for *B. straminea*, the total DNA was extracted from cephalopodal region of the mollusc. The regions of 16S, cytochrome c oxidase sub-unit I (COI), 12S, cytochrome c oxidase sub-unit III (COIII) and ND1 were partially amplified and sequenced. The obtained sequences enabled the drawing of specific primers for amplification of four larger mitochondrial DNA fragments of *B. straminea*: 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S and 16S-ND1, which were cloned and sequenced. For the amplification of these fragments, there were utilized primers directed to the long PCR technique and drawing of primer walking. There were sequenced 7,764 nucleotides, with a total of 2,588 amino acids related to genes COI, COIII, ND1 (partial), ND2, ND3, ND4, ND5 and ND6. There were comparisons of amino acid sequences, start and stop between *B. straminea*, *B. tenagophila* and *B. glabrata*, with differences in gene size and composition. The *B. straminea* gene order was identical to *B. tenagophila* e *B. glabrata*. The nucleotide sequence of the COI gene was analyzed due to its potential in species separation, based on the DNA Barcode approach. This analysis enabled the differentiation from *B. straminea* from other two species that transmit schistosomiasis in Brazil.

*1 Introdução*

## 1.1 O gênero *Biomphalaria*

As espécies do gênero *Biomphalaria* encontram-se no filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae.

O termo *Biomphalaria* vem do latim *bis*: duas vezes + do grego *omphalos*: umbigo, em referência ao aprofundamento do giro central dos dois lados da concha. Os moluscos deste gênero possuem concha discoidal em espiral plana, com os lados aproximadamente paralelos, os orifícios genitais localizados no lado esquerdo do corpo e os tentáculos finos e longos. Os giros das conchas são esculpidos com estrias de crescimento e a abertura varia de acordo com a espécie (Paraense, 1975).

Estes moluscos são hermafroditas e em condições naturais reproduzem preferencialmente por fecundação cruzada, mas quando criados isoladamente são capazes de reproduzir por autofecundação, sendo um único exemplar capaz de produzir uma nova colônia (Paraense, 1955).

A oviposição geralmente é noturna e os ovos apresentam-se envolvidos por uma cápsula elástica, gelatinosa, resistente e transparente, denominada cápsula ovígera. Esta cápsula fica aderida à vegetação aquática ou quaisquer superfícies sólidas submersas, inclusive à concha de outros caramujos. Cada cápsula ovígera libera de 20 a 100 ovos que dependendo da temperatura, demoram cerca de oito dias para eclodir (Paraense, 1955; 1972; 1976).

Normalmente, estes moluscos são encontrados em uma variedade de coleções de água doce, parada ou de correnteza, naturais ou artificiais, com velocidade inferior a 30cm/s, e em pequenos córregos, margens de lagoas, brejos, poços, valas e pântanos. Os moluscos apresentam preferência por locais ricos em matéria orgânica e microflora, pouca turbidez, pH entre 6 a 8 e temperatura média entre 20°C e 25°C (Paraense, 1972).

Devido às fortes pressões ambientais, existem populações de moluscos adaptadas a diversas condições do meio ambiente, podendo resistir a grandes variações no local onde vivem. Esses moluscos desenvolveram alguns mecanismos de sobrevivência e escape como a diapausa, que é a parada brusca no desenvolvimento, controlada por fatores internos, mesmo quando as condições do meio são favoráveis; e a quiescência, que é determinada diretamente por condições desfavoráveis do meio, manifestando-se na forma de estivação ou hibernação. Na estivação ocorre a parada do desenvolvimento induzida pela elevação da

temperatura, já na hibernação a parada no desenvolvimento se dá em virtude da redução da temperatura. Além desses mecanismos, os moluscos podem enterrar-se na lama ou em solo úmido, o que possibilita resistir à dessecação e a ação de moluscidas. Esta resistência vai depender da capacidade do molusco em conservar recursos como água, oxigênio e energia, bem como neutralizar os produtos tóxicos do metabolismo. Geralmente os moluscos sobrevivem na natureza durante um ano e sua persistência nos focos decorre do ritmo de reprodução, que depende por sua vez, de diversos fatores ecológicos que podem influenciar na fecundidade, na postura e viabilidade dos ovos (Paraense, 1972). A figura 1 mostra um molusco do gênero *Biomphalaria*.



Figura 1 - Molusco do gênero *Biomphalaria* com desova (Carvalho *et al.*, 2005)

## 1.2 Importância epidemiológica do gênero *Biomphalaria* no Brasil

No Brasil são encontradas onze espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria*, sendo elas: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1948), *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. schrammi* (Crossi, 1864), *B. kuhniana* (Clessin, 1883), *B. intermedia* Paraense & Deslandes,

1962, *B. amazonica* Paraense 1966, *B. cousini* Paraense 1966, *B. oligoza* Paraense 1974, *B. occidentalis* Paraense 1981 e *B. t. guaibensis* Paraense 1984.

As três espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni* no Brasil são *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, sendo a primeira espécie, a mais importante nas Américas devido principalmente à sua alta compatibilidade com o trematódeo, o que facilita a infecção e eliminação de um número elevado de cercárias (Souza *et al.*, 1995). *B. glabrata* encontra-se distribuída por 806 municípios de 16 estados brasileiros e no Distrito Federal (Carvalho *et al.*, 2008) (figura 2).

*B. tenagophila* é encontrada em larga faixa costeira, desde o sul da Bahia até o Chuí no Rio Grande do Sul, sendo notificada em 603 municípios de 10 estados brasileiros e no Distrito Federal (Carvalho *et al.*, 2008) (figura 3). Trata-se da única espécie transmissora da esquistossomose em extensas áreas do Estado de São Paulo e também é responsável por focos isolados nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio de Janeiro (Paraense, 1986).

*B. straminea* é menos suscetível que *B. glabrata*, sendo responsável pela transmissão da esquistossomose na região Nordeste do país. Entretanto, entre as três espécies, esta possui a distribuição mais abrangente, sendo encontrada em 1.327 municípios distribuídos por 24 estados e no Distrito Federal (Carvalho *et al.*, 2008) (Figura 4). Estudos realizados por Souza *et al.* (1995) demonstram que apesar de possuir baixa taxa de infecção quando comparada às outras espécies hospedeiras, *B. straminea* é capaz de manter o ciclo da doença no campo. De fato, durante os anos de 1954 e 1955, análises com *B. straminea* oriundas de 17 municípios do Estado de Pernambuco revelaram taxas de infecção inferiores a 1% (Barbosa & Coelho, 1956). No entanto, Paraense & Corrêa (1963) ao avaliarem os dados de prevalência obtidos em 1950 em 14 desses municípios, depararam-se com taxas de infecção humana, superiores a 50%. Assim, Paraense & Corrêa (1989) concluíram que, apesar da *B. straminea* ser um hospedeiro pouco eficiente (menos de 1% é encontrado infectado e a taxa de infecção experimental é menor que 4%) essa espécie é uma importante vetora, pois mantém a prevalência elevada em algumas localidades. Uma hipótese para este fato é que muitos exemplares desta espécie morrem ao eliminar cercárias de *S. mansoni*.



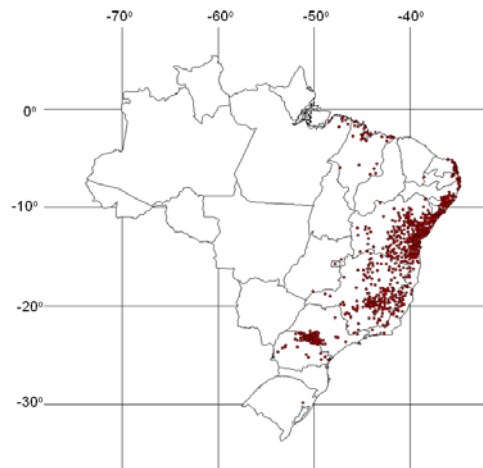


Figura 2 – Mapa do Brasil com a distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata* (Carvalho *et al.*, 2008)

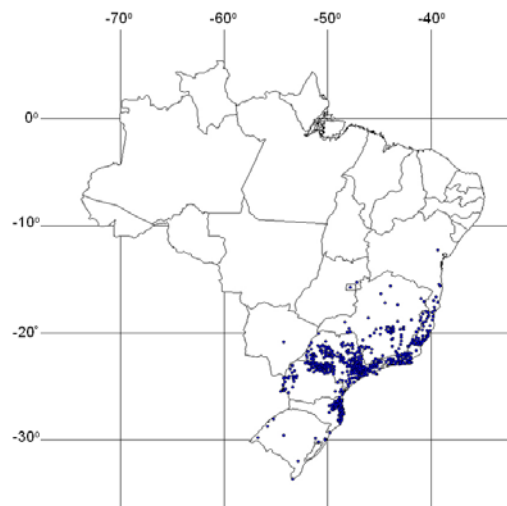


Figura 3 – Mapa do Brasil com a distribuição espacial de *Biomphalaria tenagophila* (Carvalho *et al.*, 2008).



Figura 4 – Mapa do Brasil com a distribuição espacial de *Biomphalaria straminea* (Carvalho *et al.*, 2008).

### 1.3 DNA mitocondrial

Acredita-se que as mitocôndrias representem os descendentes de células bacterianas primitivas que foram simbioticamente fagocitadas por ancestrais primitivos eucarióticos e finalmente evoluíram para organelas dentro das células animais, trazendo consigo o seu próprio DNA. Estruturalmente, esta organela apresenta a forma alongada de um bastonete e caracteriza-se pela presença de duas unidades de membrana fosfolipídicas: uma externa, lisa e contínua, e outra interna, com invaginações formando as cristas mitocondriais. Estas membranas são separadas por um espaço intermembranar. O espaço interno delimitado pela membrana é preenchido pela matriz mitocondrial (Figura 5). Imersos nessa matriz estão os grânulos densos, ribossomos e moléculas de RNA e DNA.

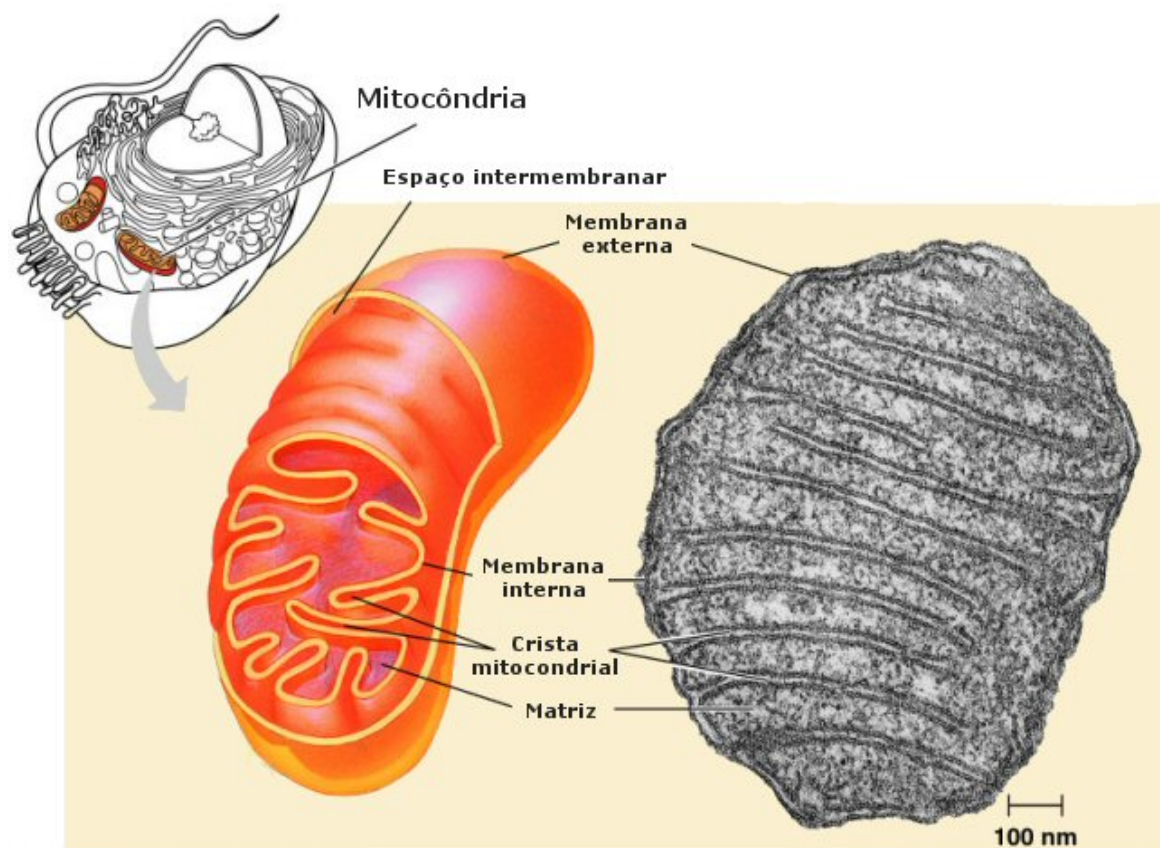


Figura 5 – Desenho esquemático de uma mitocôndria  
([http://www.cientic.com/tema\\_celula\\_img4.html](http://www.cientic.com/tema_celula_img4.html))

O DNAm dos animais é uma molécula circular dupla fechada contendo 37 genes que codificam: 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e 2 RNAs ribossomais (RNAr), constituindo-se em uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (Awise, 1986; Boore, 1999).

Na tabela 1 encontram-se os componentes básicos que constituem o DNAm, conforme revisão de Boore (1999).

Tabela 1 - Componentes básicos do DNA mitocondrial de animais

<b>Codificador de proteínas</b>	<b>Designação do DNAm em animais</b>	<b>Sinônimo</b>
Citocromo c oxidase subunidades I, II e III	COI, COII, COIII	<i>cox1, cox2, cox3,</i>
Citocromo b apoenzima	Cytb	<i>Cob</i>
Nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD) desidrogenase subunidades 1-6, 4L	ND1-6, ND4L	<i>nad1-6, nad4L</i>
Trifosfato de adenosina (ATP) sintetase subunidades 6,8	ATP6, ATP8	<i>atp6,atp8 ou A6, A8</i>
Subunidade maior do RNA ribossomal	16S	<i>LrRNA, ml</i>
Subunidade menor do RNA ribossomal	12S	<i>SrRNA, ms</i>
18 RNAs transportadores cada um especificando um aminoácido	Com a primeira letra do aminoácido correspondente	<i>trnX</i>
Dois RNAs transportadores específicos para leucina	Diferenciado pelo código reconhecido <i>L(CUN)</i> ou <i>L(UUR)</i>	<i>Diferenciado pelo código</i>
Dois RNAs transportadores específicos para serina	Diferenciado pelo código reconhecido <i>S(AGM)</i> ou <i>S(UCN)</i>	<i>Diferenciado pelo código</i>

A principal função da mitocôndria é liberar energia gradualmente das moléculas de ácidos graxos e glicose provenientes dos alimentos, produzindo calor e moléculas de ATP. Para desenvolver esta função, as proteínas codificadas pelos RNAs mensageiros: citocromo b (Cytb), subunidades I-III do citocromo c oxidase (COI, COII, COIII), subunidades 6 e 8 do complexo ATPsintetase (ATP6, ATP8) e subunidades 1-6 e 4L da NADH desidrogenase (ND1-ND6, ND4L) participam do sistema de fosforilação oxidativa e são diretamente responsáveis pela função respiratória. As demais subunidades deste complexo protéico e todas as enzimas envolvidas na replicação e transcrição do DNAm são importadas do citoplasma por meio de sinais específicos de um sistema de transporte através das membranas mitocondriais (Alberts *et al.*, 2004).

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

Os RNAt são pequenas moléculas que apresentam cerca de 80 nucleotídeos e possuem o anticódon, sequência trinucleotídica complementar ao códon que representa seu aminoácido (Alberts *et al.*, 2004). O anticódon reconhece o códon através do emparelhamento de bases complementares. Existem 22 tipos de RNAt mitocondriais e 64 códons diferentes, sendo necessário que alguns destes RNAt reconheçam diferentes códons.

Os RNAr têm um importante papel na síntese protéica. O genoma mitocondrial possui 2 genes para o RNAr, a subunidade maior denominada 16S e a subunidade menor denominada 12S.

O DNAm contém regiões não codificadoras de tamanhos variáveis com sítios de iniciação para a transcrição e replicação (Wolstenholme, 1992). Frações dessas regiões não codificadoras algumas vezes são duplicadas, resultando para alguns organismos, em moléculas de DNAm de tamanho variáveis. Os introns, regiões intergênicas, estão ausentes nas sequências dos DNAm de vários vertebrados (Anderson *et al.*, 1981; 1982; Bibb *et al.*, 1981) e invertebrados (Clary & Wolstenholme, 1985; Wolstenholme *et al.*, 1968). Estas e outras características são responsáveis por diferenças no tamanho do DNAm, que varia entre 14Kb e 42Kb

dependendo da espécie, e cuja exceção são os cnidários do gênero *Hydra*, com DNAm linear contendo 8 Kb de tamanho (Warrior & Gall, 1985; Gissi *et al.*, 2008).

Em animais o DNAm tem evoluído mais rápido que o DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979). A molécula não possui mecanismos eficientes de reparo acumulando mais mutações que o DNA nuclear (Clayton *et al.*, 1974) e, além disso, ocorre em um grande número de cópias por célula.

O pequeno tamanho deste genoma e a alta taxa de mutação quando comparado com o genoma nuclear fazem do DNAm um bom marcador em estudos comparativos entre espécies (Harrison, 1989; Boore, 1999; Rawlings *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 1997).

### 1.3.1 Genoma mitocondrial de moluscos

O estudo de sequências do DNAm de moluscos demonstra que esta é uma molécula circular no qual o tamanho é diferenciado entre o grupo e apresenta uma grande variação na organização dos genes (Boore & Brown, 1994; Kurabayashi *et al.*, 2000) e nas sequências (Lecanidou *et al.*, 1994), quando comparado com outros grupos. Hoffman *et al.* (1992) publicaram a primeira sequência completa do DNAm do molusco *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia), com tamanho de 17.100pb e verificaram ainda que a organização de seus genes foi diferente do reportado para outros metazoários, além de possuir um número de nucleotídeos não codificantes incomum, não apresentar o gene para ATP8 e ter um RNAt de Metionina extra. Grande *et al.* (2002) determinaram a sequência dos nucleotídeos do DNAm do molusco *Roboastrea europaea* (Gastropoda: Opisthobranchia) reportando o tamanho de 14.472pb. Maynard *et al.* (2005) sequenciaram o DNAm de *Haliotis rubra* (Mollusca: Gastropoda) cujo tamanho encontrado foi de 16.907pb. No gênero *Biomphalaria*, a sequência completa do DNAm de *B. glabrata* foi publicada em 2004 (DeJong *et al.*, 2004) e a de *B. tenagophila* em 2007 (Jannotti-Passos, 2007). O tamanho do DNAm encontrado para *B. glabrata* foi de 13.670pb e para *B. tenagophila* foi de 13.722pb. Estes genomas possuem o mesmo número de genes da maioria dos organismos sequenciados: 2 genes para o RNAr, 13 genes para RNAm e 22 genes para RNAt (Figura 6). Os genes encontrados nas fitas *plus* e *minus* que codificaram as proteínas de *B. tenagophila*, foram os mesmos de *B. glabrata*.

---

*Plus* – sentido na fita de DNA 5' > 3'

*Minus* – sentido na fita de DNA 3' > 5'

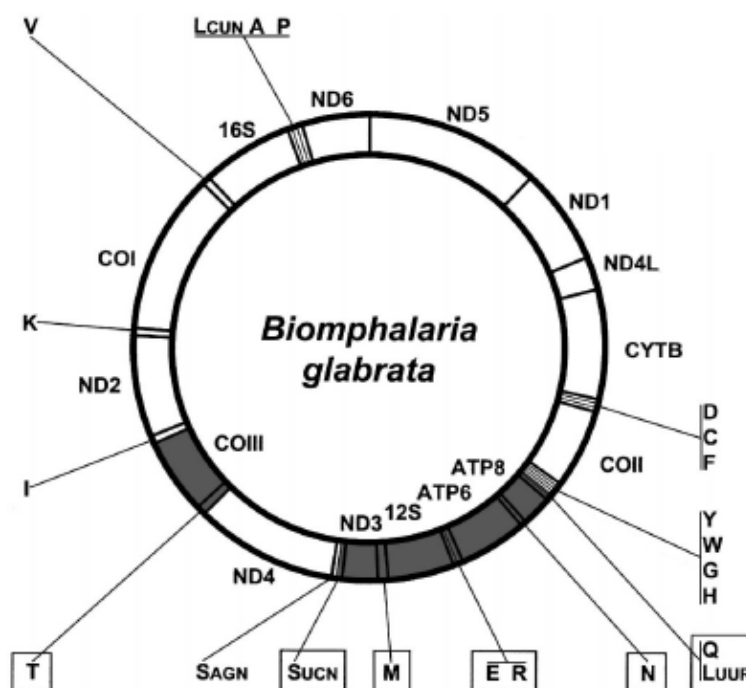


Figura 6 – DNA mitocondrial de *Biomphalaria glabrata*. RNAt – representados pela letra do código que eles representam, RNAt com anticódons variantes – Sagn, Suchn, Luur, Lcun; Genes representados na cor cinza - na fita *minus* – descritos no interior do círculo; Genes representados na cor branca - na fita *plus* – descrito fora do círculo (Dejong *et al.*, 2004)

Vários aspectos da evolução genômica podem ser desvendados a partir do genoma mitocondrial e análises comparativas de genes mitocondriais têm permitido gerar informações da evolução de organismos e de seus genomas (Boore, 1999), além de permitir a discriminação de espécies (Hebert *et al.*, 2003a).

### 1.3.2 Código de barra do DNA (*DNA Barcode*)

O código de barra do DNA ou *DNA Barcode* tem como proposta utilizar uma sequência gênica pequena como uma posição padrão no genoma. Para os animais foi estabelecido como *DNA Barcode* o gene mitocondrial COI (Hebert *et al.*, 2003b).

O COI é o catalisador terminal na cadeia respiratória mitocondrial e está diretamente envolvida no transporte de elétrons e na translocação de prótons através da membrana (Saraste, 1990; Gennis, 1992).

A escolha de um gene mitocondrial como *DNA barcode* baseou-se em algumas características deste DNA, tais como, o fato de ser amplamente distribuído entre os animais, ter alto número de cópias por célula, apresentar taxa de mutação diferente entre espécies, não sofrer recombinação, ter uma herança

predominantemente materna na maioria dos organismos e possuir baixo polimorfismo ancestral. O gene COI é o marcador de escolha por tratar-se da maior subunidade do citocromo oxidase (Clary e Wolstenholme, 1985; Beard *et al.*, 1993) e suas proteínas contêm domínios funcionais altamente conservados e regiões variáveis (Saraste, 1990; Gennis, 1992).

Projetos envolvendo insetos, pássaros e peixes, entre outros organismos, têm sido desenvolvidos com o intuito de obter marcadores genéticos para identificação de amostras (Dawnay *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2009; Alcaide *et al.*, 2009; Kerr *et al.*, 2009; Steinke *et al.*, 2009). Todos estes projetos têm o objetivo comum de construir um banco de dados de referência de *DNA barcodes* que irão aprimorar o conhecimento acerca da biodiversidade e permitir a identificação específica.

Segundo Eiziriki *et al* (2009), alguns aspectos são observados nesta iniciativa: sistematas especializados são responsáveis por identificar os espécimes-testemunho utilizando critérios morfológicos, moleculares, comportamentais, entre outros, que servirão de referência para o *DNA barcode*; estimula-se o uso de segmentos genômicos padronizados, de modo que bases de dados comparativas internacionais e de livre acesso possam ser estabelecidas e utilizadas. Em animais, recomenda-se como *DNA barcode* a utilização de um segmento do gene COI; uma base de dados integrada (*Barcode of Life Data Systems – BOLD Systems*) foi estabelecida para abrigar e disponibilizar os códigos de barra de DNA e todas as informações ligadas a este, tais como os dados morfológicos dos espécimes-testemunho, imagem e localização do ponto de coleta, dados brutos de sequência e outros marcadores associados como, por exemplo, outros genes do táxon em questão. Nesta base de dados existem ferramentas de busca para identificação de espécimes questionados e também pode ser utilizada como plataforma de trabalho para redes de pesquisa em áreas com normas de acesso protegido por senha (Ratnasingham *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que esta identificação de espécies não é equivalente à sistemática molecular ou taxonomia molecular, mas sim depende da ação da comunidade taxonômica (incluindo sistematas especialistas nos grupos e curadores de coleções científicas), uma vez que somente espécimes validados por estes especialistas poderão ser utilizadas como referência para estabelecer os caracteres diagnósticos de cada espécie, bem como a viabilidade de que os marcadores propostos efetivamente discriminem táxons.





O DNAm tem permitido desvendar vários aspectos da evolução de organismos e de seus genomas, além de permitir a discriminação de espécies e estudos de genética de populações.

No Brasil encontramos três espécies hospedeiras intermediárias do *S. mansoni*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Existem vários estudos acerca das duas primeiras espécies, entre eles a caracterização e análise do genoma mitocondrial.

No presente estudo objetivou-se ampliar o conhecimento acerca do DNAm de *B. straminea*, sendo realizado o sequenciamento e análise parcial do genoma mitocondrial desta espécie.

Ênfase foi dada à análise do COI, recomendado por vários pesquisadores, como região de escolha para identificação molecular de espécies, numa iniciativa denominada código de barra do DNA (*DNA barcode*).

Uma vez que o Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica é referência nacional na identificação e exame de moluscos do gênero *Biomphalaria*, e possui especialistas na taxonomia deste grupo, foi oportuna a análise comparativa do COI das três espécies hospedeiras para avaliar a proposta de *DNA barcode* para este grupo.

Com a obtenção parcial do DNAm de *B. straminea*, combinado às informações já disponíveis do DNAm de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, torna-se possível desenvolver análises comparativas e determinar marcadores moleculares para estudos genéticos e evolutivos com as três espécies hospedeiras intermediárias do *S. mansoni* no Brasil.



### 3.1 Objetivo geral

Sequenciamento e caracterização dos genes ND1 (parcial), ND2-6 e COI e III do DNA mitocondrial de *B. straminea* e compará-los com os de *B. glabrata* e *B. tenagophila* depositados no GenBank.

### 3.2 Objetivos específicos

Amplificar e sequenciar quatro pequenos fragmentos do DNAMt para possibilitar o desenho de iniciadores longos para amplificação das regiões 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S, 16S-ND1 do DNAMt de *B. straminea*;

Padronizar e otimizar a reação de PCR com os iniciadores longos desenhados;

Clonar as sequências nucleotídicas das quatro regiões amplificadas: 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S, 16S-ND1;

Sequenciar os quatro clones a partir de novos iniciadores utilizando a abordagem de iniciadores internos (*primer walking*);

Fazer a anotação das sequências nucleotídicas;

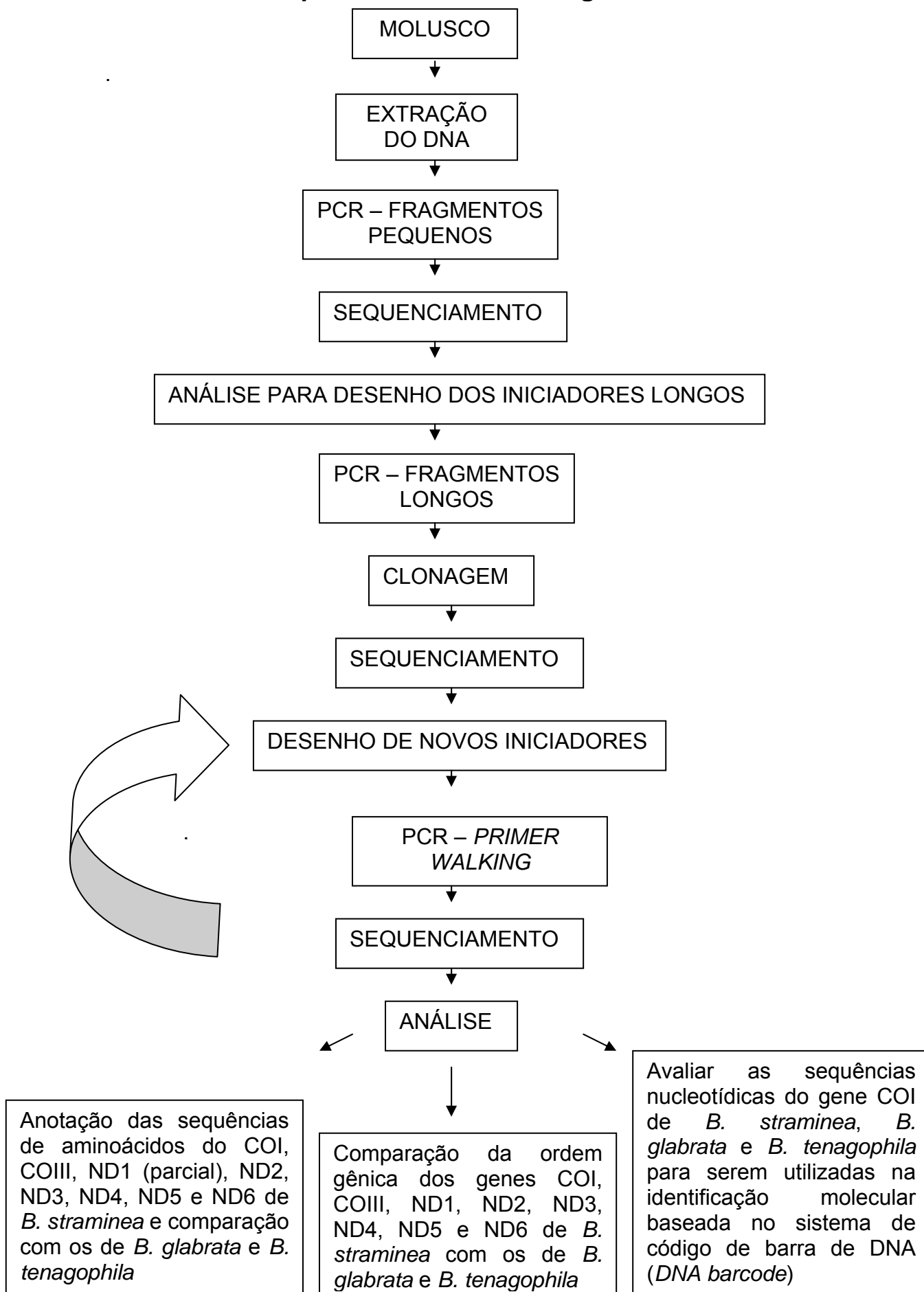
Comparar as sequências dos aminoácidos dos genes COI, COIII, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 de *B. straminea* com as de *B. glabrata* e *B. tenagophila* depositadas no GenBank;

Comparar a ordem gênica desses genes de *B. straminea* com as de *B. tenagophila* e de *B. glabrata*;

Avaliar as sequências nucleotídicas do gene COI de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* para serem utilizadas na identificação molecular de acordo com o sistema de código de barra do DNA (*DNA Barcode*).



## 4.1 Desenho esquemático da metodologia



## 4.2 Molusco

Foi utilizado um exemplar de *B. straminea* proveniente de uma população de Jaboticatubas - MG, mantida desde 1995 no Moluscário Lobato Paraense do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz. O exemplar foi identificado pela morfologia (Paraense, 1975) e análise molecular (Vidigal *et al.*, 2000) no Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou - Referência Nacional em Identificação e Exame de moluscos do gênero *Biomphalaria*.

## 4.3 Extração de DNA

Foi utilizado um fragmento da região cefalopodal do molusco para ser extraído o DNA através do Kit de extração Wizard<sup>®</sup> da Promega. Este fragmento foi incubado em 200µl de solução de lise nuclear junto com 1µl (20µg/ml) de proteinase K por 12 horas a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 80µl de solução de precipitação proteica<sup>®</sup>. A suspensão foi agitada vigorosamente com auxílio do vórtex por 20 segundos e em seguida centrifugada a 13.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200µl de isopropanol, homogeneizado por inversão durante 20 minutos e centrifugado a 13.000 RPM por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso com 500µl de etanol absoluto juntamente com 10µl de acetato de sódio 3M pH 5.2, por 2 horas a -70 °C. Após este período o DNA foi centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 500µl de etanol 70% e centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-hidratado com 30µl de solução de re-hidratação<sup>®</sup>, mantido por 30 minutos a 37°C e armazenado a -20°C. O DNA foi utilizado como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## 4.4 Reação em cadeia da polimerase das regiões 16S, COI, 12S e ND1

Na primeira reação de PCR foram utilizados iniciadores que amplificaram parte das regiões 16S, COI, 12S e ND1. As regiões COI e 16S foram amplificadas com iniciadores universais, nas demais regiões foram utilizados iniciadores

desenhados a partir das sequências de DNAm de *B. glabrata* (NC 005439) e *B. tenagophila* (NC 010220) depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2.

Para as reações de PCR foram utilizados em um volume final de 10 $\mu$ l, 1-10ng de DNA alvo, 50 pmoles de cada iniciador, 0,8 unidades de Platinum TaqDNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M de cada dNTP e tampão (10mM Tris - HCl, pH 8,5, 50 mM KCl). Após o preparo, cada reação foi coberta com uma gota de óleo mineral (aproximadamente 20 $\mu$ l) para evitar evaporação durante os ciclos de temperatura da PCR. As amostras foram amplificadas em termocicladores da marca MJ Research, modelo PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*) e o programa utilizado apresentava os seguintes ciclos: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguida de 32 ciclos de anelamento a 54°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e os fragmentos visualizados em transluminador com luz ultravioleta (UV) da marca UVP<sup>®</sup>, e as imagens digitalizadas através da máquina fotográfica acoplada ao equipamento.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para amplificar as regiões COI, 16S, ND1 e 12S do DNA mitocondrial de *B. straminea*

Iniciador	Localização (gene)	Sequências	Referências
LCO	COI	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Folmer <i>et al.</i> 1994
HCO	COI	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	Folmer <i>et al.</i> 1994
16SAR	16S	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	Palumbi 1996
16SBR	16S	5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	Palumbi 1996
ND1FIC	ND1	5' TTGCTGTTGCATTTTATACTTTA 3'	Desenhado a partir de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i>
ND1RIC	ND1	5' AATATACAAATTCCAAAAGGT 3'	Desenhado a partir de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i>
12SRIC	12S	5' TACCTCTACTATGTTACGACT 3'	Desenhado a partir de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i>
12SFIC	12S	5' ATCCAGTTAGTGATATTGAAC 3'	Desenhado a partir de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i>

#### 4.5 Sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos obtidos na PCR foram inicialmente purificados com a enzima ExoSap (USB Corporation), sendo utilizado 3µl da enzima juntamente com 7µl do produto da PCR. A reação foi mantida a 37°C por 45 minutos seguidos por 20 minutos a 80°C. Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento com o Kit *DYEnamic ET dye terminator* (Amersham Pharmacia Biotech, Madison-USA) com dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (*dye terminators*). Nas reações de sequenciamento foram utilizados 90ng do produto de PCR purificado, 5 pmoles de cada par de iniciadores separadamente (tabela 2) e 4µl do Kit *DYEnamic ET dye terminator* com volume final de 10µl. O programa utilizado no termociclador (Mastercycler, Eppendorf) para as reações de sequência foi: 30 ciclos de 95°C para desnaturação por 20 segundos, 55°C para o anelamento por 15 segundos e 60°C para extensão por 1 minuto. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados por precipitação de acordo com o seguinte



protocolo: a cada poço da placa de sequenciamento foi adicionado 1µl de acetato de amônio e 30µl de etanol 96% (Merck, Brasil). A placa foi agitada no vórtex rapidamente e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 45 minutos a -20°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µl de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 15 minutos a -20°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, a placa invertida sobre um papel absorvente e centrifugada por 1 segundo a 900 rpm. As amostras foram ressuspensas em 10µl de tampão de amostra (Amersham Biosciences – UK limited, England) e a placa agitada no vórtex por 2 minutos. Para obter as sequências nucleotídicas, as placas foram colocadas no sequenciador automático MEGABACE 500 DNA *Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech). Cada região foi sequenciada no mínimo três vezes para garantir a confiabilidade da sequência final e a análise realizada conforme descrito no item 4.9.

#### **4.6 Amplificação pela PCR dos fragmentos 12S-COIII, COIII-COI, COI-16S e 16S-ND1**

A partir das sequências obtidas acima e das sequências do COIII de *B. glabrata* e *B. tenagophila* obtidas do GenBank, iniciadores específicos foram desenhados para amplificar quatro fragmentos maiores do DNA mitocondrial de *B. straminea* (Tabela 3). Os iniciadores 12SFIL e COX3RIL foram usados para amplificar o fragmento 12S-COIII com aproximadamente 2000pb; os iniciadores COX3FIL e COIRIL para amplificar o fragmento COIII-COI (2000pb); os iniciadores COIFIL e 16SRIL para amplificar o fragmento COI-16S (1500pb) e os iniciadores 16SFIL e ND1RIL foram utilizados para amplificar o fragmento 16S-ND1 (3000pb). A figura 7 mostra um desenho esquemático do DNAm com a identificação dos locais onde os iniciadores ancoraram. Os reagentes da reação de PCR e o termociclador foram os mesmos descritos no item 4.4, exceto os iniciadores, que foram os descritos na tabela 3. O programa do PCR Longo (Cheng *et al.*, 1994), que consiste na utilização de iniciadores com aproximadamente 30 a 40 nucleotídeos e temperatura de extensão e anelamento idênticas, envolveu os seguintes ciclos: desnaturação inicial por 1 minuto a 94°C, anelamento e extensão a 68°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos com a desnaturação a 98°C por 15 segundos,

anelamento e extensão a 68°C por 15 minutos, sendo que no último ciclo o tempo de extensão foi alterado para 15 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio, e os fragmentos visualizados em transluminador com luz ultravioleta (UV) da marca UVP®, e as imagens digitalizadas através da máquina fotográfica acoplada ao equipamento.

Tabela 3 – Iniciadores desenhados para utilização no PCR longo. Cada par de primers está representado por uma cor.

Iniciador	Localização (gene)	Sequências
12SFIL	12S	5' AGTGCTTAGATAGTAAGATGTGTTCTAAAATAATAGGGTATC 3'
COX3RIL	COIII	5' TATTTTATATGTAAGAATCTATTGATGAGGTTTCAT 3'
COX3FIL	COIII	5' ATGAACCTCATCAATAGATTCTTACATATAAAAATA 3'
COIRIL	COI	5' TACAAATTACGATAAACGTTCCATCGTAATCCAGGAGCTCG 3'
COIFIL	COI	5' ACCCTCCTCTGAGTGGACCTATTGCTCATGGTGGTGCATCTGTAGA 3'
16SRIL	16S	5' CATTCCAGACTTTAATTAGAAGCCAATTGATTATGCTACCTTAGC 3'
16SFIL	16S	5' GCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTCTAATTAAGTCTGGAATG 3'
NDIRIL	ND1	5' CCATATTCTACATTAACCCAGAACTAGTTCAGATTCACCCTCA 3'

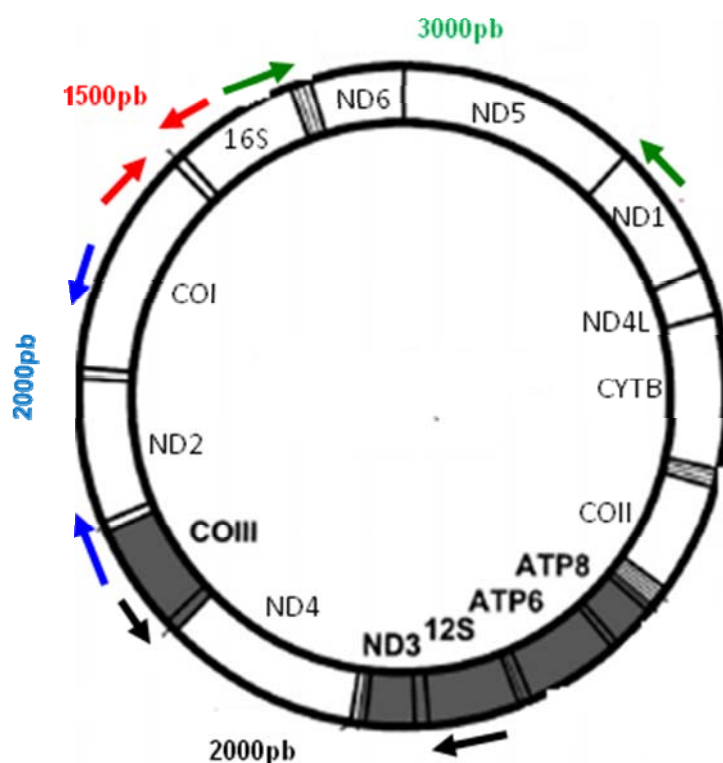


Figura 7 – Desenho esquemático demonstrando os genes do DNAm<sub>t</sub> de *B. straminea* e a região onde foram desenhados os iniciadores para desenvolvimento da Técnica de PCR Longo. Demais componentes do DNAm<sub>t</sub> foram omitidos nesta imagem. As setas indicam o sentido dos iniciadores e suas cores representam os pares de iniciadores descritos na tabela 3. Setas azuis: iniciadores COX3FIL e COIRIL, setas pretas: iniciadores 12SFIL e COX3RIL, setas vermelhas: iniciadores COIFIL e 16SRIL, setas verdes: iniciadores 16SFIL e NDIRIL.

#### 4.7 Clonagem molecular dos produtos de PCR

Os fragmentos obtidos pelo PCR longo foram clonados em diferentes plasmídeos de acordo com o seu tamanho: fragmentos de até 2.000pb foram clonados no TOPO TA cloning (Invitrogen - Life Technologies, Europa) e o fragmento de 3000 pb foi clonado no pGEM-T EASY (Promega). Os protocolos utilizados para a reação de ligação de cada plasmídeo foram os descritos pelos fabricantes e a partir deste procedimento, cada fragmento foi denominado de *miniprep*.

Bactérias *Escherichia coli* cepa TOP 10 F<sup>'</sup> foram preparadas para transformação química de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al* (1989). Estas células foram transformadas com os plasmídeos recombinantes da seguinte forma: 50µl de células competentes foram incubados a 4°C com 5µl do

produto da ligação durante 30 minutos. Em seguida, as células foram incubadas a 42°C por 45 segundos e colocadas no gelo por 2 minutos. Após este tempo foi adicionado às amostras 1ml de meio LB líquido (10g de peptona de caseína, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, qsp 1000mL de água milli-q, pH 7) e estas foram incubadas a 37°C sob agitação por 1 hora. Em seguida, as células foram centrifugadas a 13.000 RPM (Eppendorf Mini Spin, Alemanha) por 30 segundos. Foram descartados 800µl de LB do sobrenadante e o sedimento ressuspendido no restante do meio. Após esta etapa, as células foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (meio LB líquido acrescentado de 7,5g de ágar), 100µg/mL de ampicilina, 0,1 mM de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosida) (Ge Healthcare-Amersham, Europa), e 20 mg/mL de Xgal (5-bromo-4cloro-3indolil-B-D-galactopiranosida) (Invitrogen, USA). As placas de Petri foram mantidas na estufa por um período de 12 a 18 horas. Para verificar a presença do inserto nas colônias que cresceram, foi feita a PCR dessas colônias utilizando os iniciadores específicos da reação de PCR que originou o material clonado. Os produtos da PCR das colônias foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1% e corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados através de luz ultravioleta (UV) e as imagens digitalizadas através da máquina fotográfica acoplada ao equipamento. Os clones foram considerados positivos quando o fragmento obtido apresentava tamanho compatível com o esperado.

Algumas colônias que apresentavam o inserto foram transferidas para tubos de 50mL contendo 5mL de meio LB líquido acrescido de 5µl de ampicilina (100µg/mL) e incubadas sob agitação a 200 RPM por 16 horas a 37°C. A extração dos plasmídeos foi realizada por meio do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA, USA). O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante. As minipreps foram armazenadas a -20°C até o procedimento de sequenciamento.

## **4.8 Sequenciamento dos clones**

Os clones foram sequenciados conforme descrito no item 4.5, sendo utilizados os iniciadores descritos na tabela 3. As minipreps eram utilizadas como DNA molde nas reações de PCR e os produtos amplificados eram então purificados e submetidos ao sequenciamento (item 4.5). Após obtenção dessas primeiras sequências das minipreps, foram desenhados iniciadores internos que foram

utilizados na metodologia denominada *Primer Walking* (Tabela 4) para dar continuidade ao sequenciamento dos clones. Esta metodologia consiste na utilização de iniciadores que são desenvolvidos de acordo com o resultado obtido no sequenciamento, isto porque de acordo com o tamanho do fragmento, não é possível sequênciarlo com apenas uma reação. Neste trabalho, a cada nova reação de sequenciamento, as sequências nucleotídicas das extremidades eram utilizadas na construção de iniciadores internos que caminham na mesma sequência alvo (*primer walking*) (figura 8). A cada resultado de amplificação e sequenciamento, novos *primers* eram utilizados até que se obtivesse a sequência completa dos genes alvos.

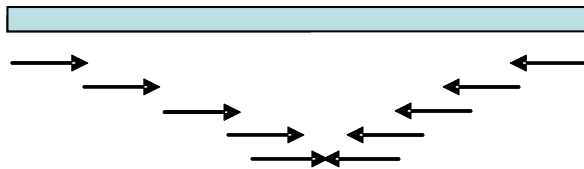


Figura 8 – Desenho esquemático da metodologia de *primer walking* representando uma região alvo.

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores internos para metodologia de *Primer Walking*

Iniciador	Localização (gene)	Sequências
12SF2C	12S	5' AACTAGGATTAGATACCCTAC 3'
COX3RIW	COIII	5' ATACATATATTTCTATAA 3'
12SF3C	ND3	5' TGCTTAGATAGTAAGATGT 3'
COX3R2W	ND4	5' ACACAAGAATTAATCATGG 3'
COX3FIW	COIII	5' AAGTCTCCCGATGAACTT 3'
COXIRIC	COI	5' TCAGGAGGTAAAAATAAATC 3'
COX3F2W	ND2	5' ATACAAAATATAGCGGATG 3'
COIR2W	ND2	5' TATAAAAGTGTTTCATCTATC 3'
COIFIW	COI	5' CTTAGGATTTATTGTATGAG 3'
16SRIW	16S	5' AGATTATTTCTTAAACTATG 3'
COIF3W	COI	5' GTAATAAAAGTTAATAACGAC 3'
16SR3W	16S	5' ATTGATTATGCTACCTTAGC 3'
16SFIW	16S	5' ATCCTACATGATCTGAGTTC 3'
ND1RIW	ND1	5' AAATGGTTGTAAAATACC 3'
16SF2W	ND6	5' TAATCTATATCTTTTGATTAG 3'
NDIR2W	ND1	5' ATACAATGTCAATAATTTGAT 3'
16SF3W	ND5	5' TTACCTAGTAATTTTCGGG 3'
ND5RIW	ND5	5' TCTAACTCTTCTCCATTTA 3'
ND2FIW	ND2	5' TTAAAATCCTTAATATTCTCGTC 3'
ND2RIC	ND2	5' CATAACCAACACATATTCA 3'
COX1FIC	COI	5' ACTCTTGTTTTGATAGATGAA 3'
COIR2W	COI	5' AATGAATCGCCAACGCGC 3'
COXIRIC	COI	5' TCAGGAGGTAAAAATAAATC 3'
ND5FIC	ND5	5' AGATTTATATTTGTTACTATTGT 3'
ND5FIW	ND5	5' GAGGATTGGGTAGAGTG 3'
ND5RIC	ND5	5' GTAGCAAATGAAATTAT 3'
ND4RW	ND4	5' AATGAAGCGCAATCGA 3'

#### 4.9 Análise das sequências obtidas no sequenciamento

As sequências nucleotídicas foram identificadas e posicionadas na ordem em que figuram no genoma em estudo. Este processo é denominado anotação gênica. As sequências de *B. straminea* obtidas foram analisadas com os programas Phred-Phrap-Consed (Ewing *et al.*, 1998, Ewing & Green, 1998, Gordon *et al.*, 1998). O programa Phred executou a leitura binária dos cromatogramas gerados pelo sequenciador e os transformou em formato texto (Ewing *et al.*, 1998). Este programa

relaciona uma base nucleotídica a cada pico de fluorescência identificado e utiliza métodos que examinam os sinais das quatro diferentes bases, além disso, atribui valores de qualidade às bases, sendo neste trabalho considerado para o agrupamento das sequências o valor de qualidade de phred  $\geq 20$ . O programa Phrap (Phragment Assembly Program) é responsável pela montagem dos fragmentos de DNA sequenciados em regiões contíguas (Ewing & Green, 1998). De acordo com a sequência de bases e os valores de qualidade calculados pelo Phred, o programa Phrap compara as sequências entre si e busca agrupá-las de modo que se obtenha uma sequência consenso ou *contig*, com base na sobreposição de sequências (Ewing & Green, 1998). As sequências que não se agruparam com nenhuma outra foram reunidas em um arquivo chamado sequências únicas ou *singlets*. No editor de sequências Consed (Gordon *et al.*, 1998) foi possível realizar a visualização, edição e análise das sequências geradas. Regiões de vetores de clonagem foram filtradas pelo programa Cross-match (Ewing *et al.*, 1998), que comparou a sequência analisada com arquivos de sequências de vetores. Neste arquivo de vetores foram depositadas as sequências dos vetores utilizados neste estudo: TOPO TA e pGEM-T EASY.

A confirmação das sequências como sendo da região alvo foi feita através da busca por similaridade utilizando-se o parâmetro padrão do programa BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) disponível no sítio [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), comparando-as com sequências depositadas no GenBank.

O programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), ferramenta gratuita disponível na internet, foi utilizado para fazer o alinhamento múltiplo automático dos nucleotídeos e aminoácidos encontrados no DNAm de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. O alinhamento múltiplo é uma hipótese de semelhança posicional entre bases ou aminoácidos de genes ou proteínas de duas ou mais sequências.

Para a visualização das sequências do DNAm utilizou-se o programa Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). A determinação das proteínas codificadas no genoma mitocondrial de *B. straminea* foi realizada utilizando o código genético mitocondrial de invertebrados (Tabela 5). Os alinhamentos dos nucleotídeos e dos aminoácidos foram visualizados utilizando o programa Jalview (Clamp *et al.*, 2004).

Para comparação do genoma mitocondrial foram utilizadas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos moluscos *B. glabrata* (NC 005439) e *B. tenagophila* (NC 010220) depositadas no GenBank. Na análise de aminoácidos de

todos os genes estudados foi utilizado o programa *Alistat*, que realiza a leitura de múltiplas sequências alinhadas e mostra os dados estatísticos desta leitura, tais como a porcentagem da identidade, número e tamanho de sequências. Este programa pertence a um pacote de programas chamado HMMER (Durbin *et al.*, 1998).

Na análise comparativa das sequências nucleotídicas do COI nas três espécies foi utilizado o *DNAsp* (Polimorfismo na sequência do DNA) que é um programa que demonstra a variabilidade interespecífica e intraespecífica do DNA e fornece informações sobre polimorfismos, regiões com bases faltantes ou gaps, sítios monomórficos e polimórficos, sítios não informativos, sítios codificantes e não codificantes e substituições sinônimas e não sinônimas de proteínas, entre outros recursos (Librado *et al.*, 2009).

Tabela 5 - Código genético mitocondrial de invertebrados

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

\* códon de parada





## 5.1 Sequência parcial dos genes COI, 16S, ND1 e 12S

Após amplificação com os iniciadores descritos na tabela 2, o fragmento obtido para parte do gene COI foi de 745pb, para o 16S foi de 686pb, para o ND1 foi de 779pb e para o 12S foi de 597pb. Os anexos 1, 2, 3 e 4 mostram as sequências obtidas e a região onde foram desenhados os iniciadores longos específicos *forward* e *reverse* em cada gene. A partir das sequências do COIII de *B. glabrata* e *B. tenagophila* descritos no GenBank, foram desenhados os iniciadores COX3FIL *forward* e COX3RIL *reverse* que foram utilizados na PCR para amplificar parte da região do COIII do DNAm de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 794pb (anexo 5). O nome e a sequência dos iniciadores longos estão listados na tabela 3.

## 5.2 Reação em cadeia da polimerase dos 4 fragmentos longos do DNA mitocondrial

Os pares de iniciadores específicos 12SFIL-COX3RIL, COX3FIL-COIRIL, COIFIL-16SRIL e 16SFIL-ND1RIL foram utilizados na PCR e amplificaram quatro fragmentos denominados: 12S-COIII; COIII-COI; COI-16S e 16S-ND1, do DNAm de *B. straminea*, garantindo a cobertura completa dos genes ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, COI e COIII e parcial do ND1. A figura 9 mostra os quatro fragmentos obtidos pela PCR.

---

*Forward* – sentido adiante, à frente

*Reverse* – sentido reverso, contrário

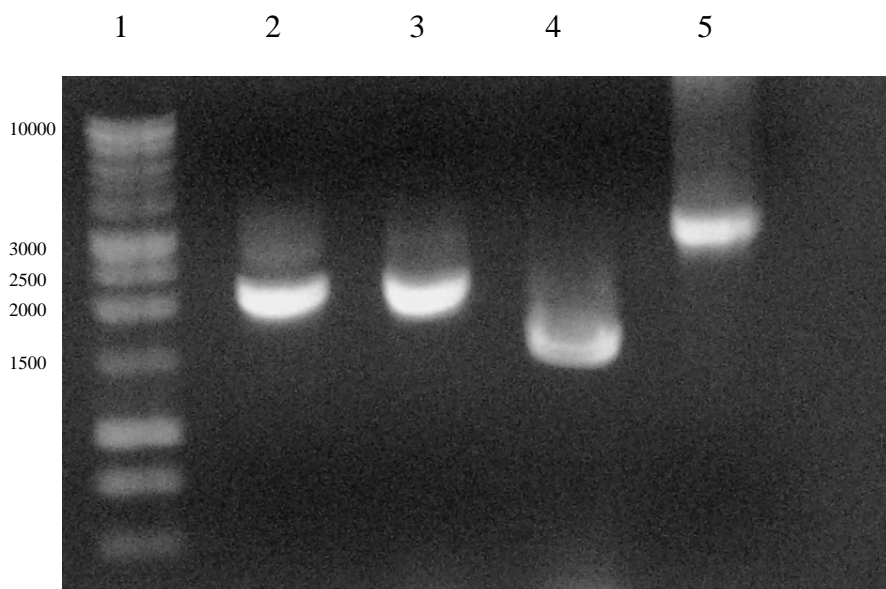


Figura 9 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação pela PCR dos fragmentos longos. Canaleta 1 - padrão de peso molecular 1Kb, canaleta 2 - fragmento amplificado a partir dos iniciadores 12SFIL-COX3RIL, canaleta 3 - fragmento amplificado a partir dos iniciadores COX3FIL-COIRIL, canaleta 4 - fragmento amplificado a partir dos iniciadores COIFIL-16SRIL e canaleta 5 - fragmento amplificado a partir dos iniciadores 16SFIL-ND1RIL. Os valores à esquerda do gel correspondem ao padrão de peso molecular 1Kb.

### 5.3 Minipreps

Os quatro fragmentos obtidos pela PCR foram clonados em diferentes plasmídeos de acordo com o seu tamanho e a partir deste procedimento, cada fragmento foi denominado de miniprep. A figura 10 demonstra as minipreps dos fragmentos 12S-COIII (Figura 10, canaleta 2); COIII-COI (Figura 10, canaleta 3); 16S-ND1 (Figura 10, canaleta 4 ) e COI-16S (Figura 10, canaleta 5).

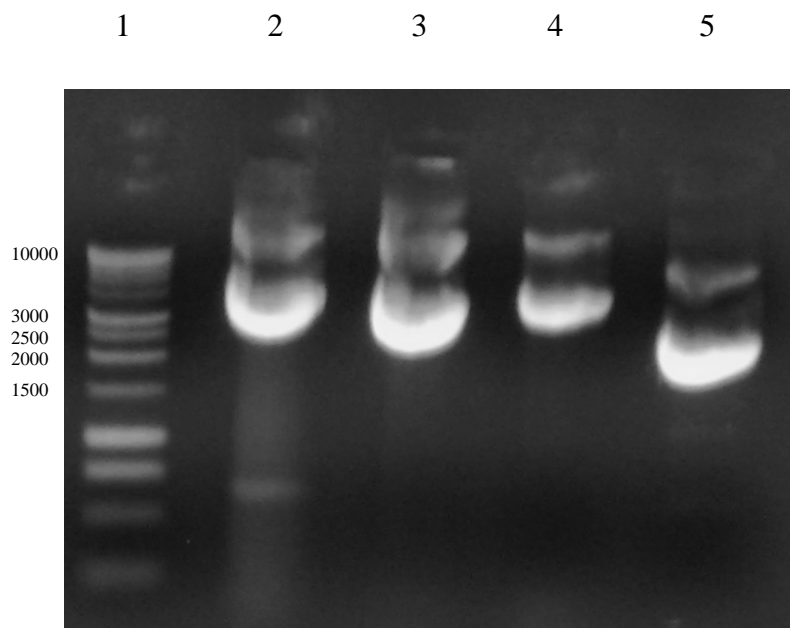


Figura 10: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando as minipreps obtidos com os quatro fragmentos do DNAmT utilizados. Canaleta 1: Padrão de peso molecular de 1Kb; canaleta 2: fragmento 12S-COIII; canaleta 3: fragmento COIII-COI; canaleta 4: fragmento 16S-ND1.; canaleta 5: fragmento COI-16S. Os valores à esquerda do gel correspondem ao padrão de peso molecular 1Kb.

#### 5.4 Anotação e análise comparativa dos genes

Sete genes que codificam proteínas foram totalmente sequenciados (COI, COIII ND2, ND3 ND4, ND5 e ND6) enquanto o ND1 foi parcialmente sequenciado; totalizando 7.764 nucleotídeos e 2.588 aminoácidos. Estes genes foram analisados com base no código genético mitocondrial de invertebrados (Tabela 5). Com base na análise realizada no programa Artemis, os genes COIII, ND4 e ND1 estavam na fita *plus*, e os genes COI, ND2, ND3, ND5 e ND6 foram encontrados na fita *minus*.

Entre os genes analisados, foram encontrados os seguintes códons de iniciação: TTG (COI), ATA (COIII), ATG (ND1), ATT (ND2), ATC (ND3), ATA (ND4, ND5, ND6) sendo o primeiro codificador do aminoácido Leucina, o segundo e terceiro codificadores de Metionina, o quarto e quinto, Isoleucina e

os três últimos codificadores de Metionina, de acordo com o código genético mitocondrial de invertebrados. Entretanto, todos estes códons foram considerados codificantes da metionina como produto final na proteína (Wolstenholme, 1992). Os códons de parada foram TAA (ND2, ND3, ND6) e TAG (COI, ND5) que são os descritos para genes mitocondriais (Wolstenholme, 1992). Foi encontrado códon de parada incompleto no COIII, sendo este completado por adição de adenina durante a transcrição do RNAm.

A análise comparativa entre os códons de iniciação e parada de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*, pode ser visualizada na tabela 6.

Tabela 6 - Códons de iniciação e parada encontrados em proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial de *B. straminea* (Bs), *B. tenagophila* (Bt) e *B. glabrata* (Bg).

Proteína	Códon de iniciação			Códon de parada		
	Bs	Bt	Bg	Bs	Bt	Bg
COI	TTG	TTG	TTG	TAG	TAG	TAA
COIII	ATA	ATA	ATA	*T--	*T--	*T--
ND1**	ATG	ATG	ATG	-	TAA	TAA
ND2	ATT	ATT	ATT	TAA	*T--	*T--
ND3	ATC	ATT	ATA	TAA	TAA	TAA
ND4	ATA	ATA	ATT	*T--	*T--	*T--
ND5	ATA	ATA	ATA	TAG	TAG	TAG
ND6	ATA	ATA	ATA	TAA	TAA	TAA

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

\*\* Proteína que foi parcialmente sequenciada para *B. straminea*

O número de aminoácidos encontrados nas proteínas COI, COIII, ND2, ND3 ND4, ND5 e ND6 de *B. straminea* e seu percentual de identidade com *B. tenagophila* e *B. glabrata* encontra-se representado na tabela 7.

Tabela 7 – Número de aminoácidos (aa) encontrados nas proteínas COI, COIII, ND2, ND3 ND4, ND5 e ND6 de *B. straminea* (Bs) e seu percentual de identidade com *B. tenagophila* (Bt) e *B. glabrata* (Bg).

Proteína	Comprimento (aa)			Identidade Bs com Bg (%)	Identidade Bs com Bt (%)
	Bs	Bt	Bg		
COI	508	508	508	99	98
COIII	262	262	262	87	86
ND2	302	303	302	85	86
ND3	115	115	115	82	85
ND4	434	435	433	81	81
ND5	545	545	545	89	89
ND6	152	152	153	95	79

## 5.5 Alinhamento múltiplo dos genes

Nos alinhamentos abaixo cada aminoácido está representado por uma cor. Para o gene COI, estão representadas as sequências de aminoácidos e de nucleotídeos.

### 5.5.1 Citocromo c oxidase subunidade I (COI)

A figura 11 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína COI de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

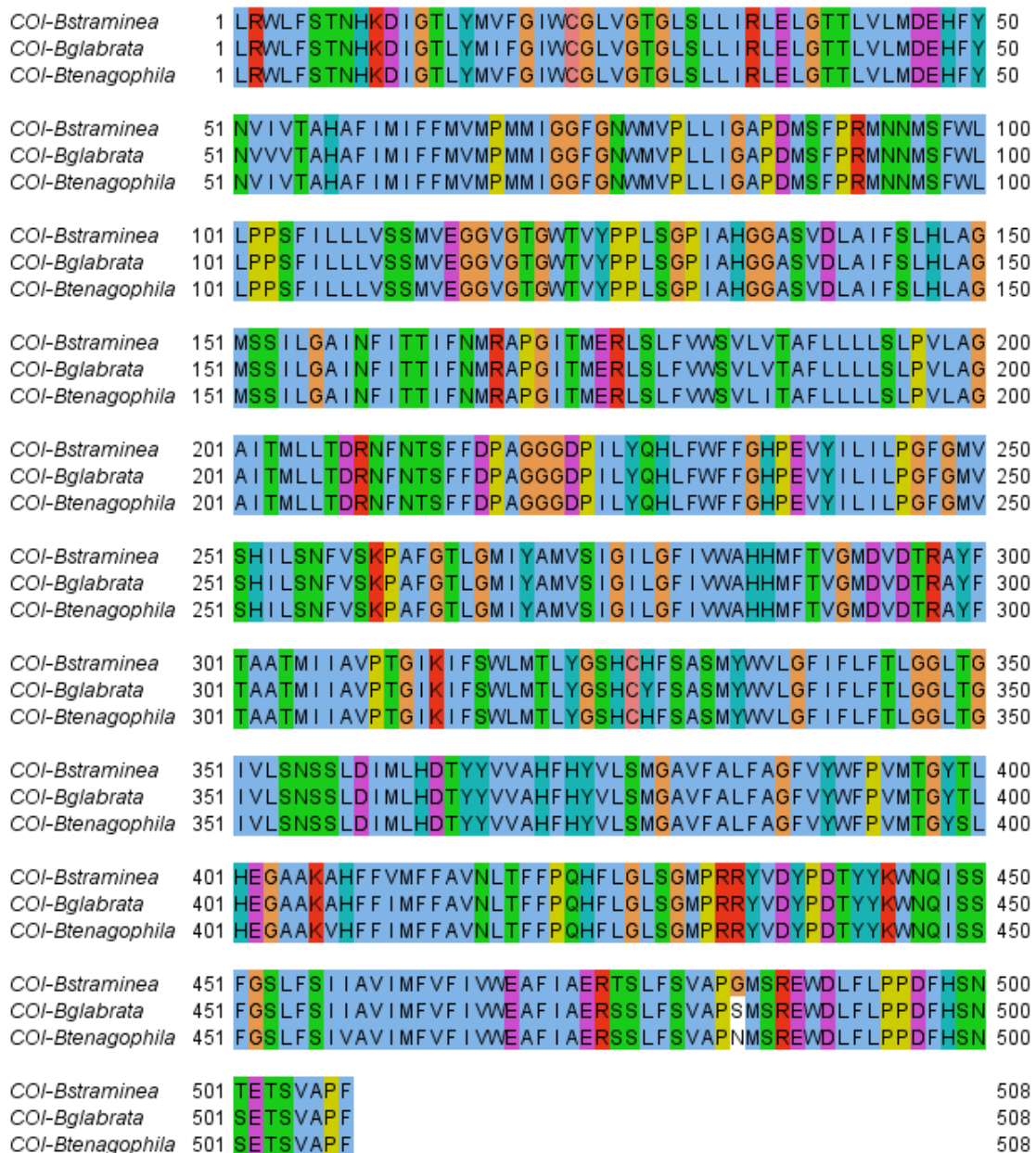


Figura 11 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína COI de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

### 5.5.2 Citocromo c oxidase subunidade III (COIII)

A figura 12 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína COIII de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

<i>COIII-Bglabrata</i>	1	MRQPFHLVEFSPWPLLISFSIFSMPIGLINYIRSSNISLLILGLFTTALI	50
<i>COIII-Btenagophila</i>	1	MRQPFHLVEFSPWPLLISFSIFSMPIGLINYIRSSISLLVLGIFTTALI	50
<i>COIII-Bstraminea</i>	1	MRQPFHLVEFSPWPLLISFSVFSMP IGLINYIRTSISLLILGMMTTALI	50
<i>COIII-Bglabrata</i>	51	SFLWVRDVVREESTYQGFHNKLVMKGLKIGIMLFI LSEVCFFFAFFWAYFH	100
<i>COIII-Btenagophila</i>	51	SFLWVRDVVREESTYQGFHNK MVIKGLKIGVMLFI LSEVCFFFAFFWAYFH	100
<i>COIII-Bstraminea</i>	51	SFLWVRDVVREESTYQGFHNK MVMKGLKIGVMLFI LSEVCFFFAFFWAYFH	100
<i>COIII-Bglabrata</i>	101	SSLAPSVVEIGAIWPPTGIFTLQAFQVPLLNTSVLLLSGVSI TWVHHSIEE	150
<i>COIII-Btenagophila</i>	101	SSLAPSVVEIGAHWPPTGIFTLQAFQVPLLNTSVLLLSGVSI TWVHHSIEE	150
<i>COIII-Bstraminea</i>	101	SSLAPSVVEIGAHWPPTGIFTLQAFQVPLLNTSVLLLSGVSI TWVHHSIEE	150
<i>COIII-Bglabrata</i>	151	GNYKSA MQGLFITILLGLYFLMLQYGEYSETMFSISDGIYGSCLFMATGF	200
<i>COIII-Btenagophila</i>	151	GKYKSAIQGLFITVLLGLYFLFLQYGEYSETMFSIADGIYGSCLFMATGF	200
<i>COIII-Bstraminea</i>	151	GNYNSAMQGLFITILLGLYFLFLQYGEYSETMFSISDGIYGI LFFYSNSV	200
<i>COIII-Bglabrata</i>	201	HGTHVAVGATFLIVCFRRLKNFHFKNHHIGFLAAAWYWHFVDVWVWFLY	250
<i>COIII-Btenagophila</i>	201	HGTHVAVGATFLIVCFRRLKNFHFKNHHVGF LAAAWYWHFVDVWVWFLY	250
<i>COIII-Bstraminea</i>	201	SWYSCSSWSNILLNRMFFPKKFSFNKNHHIGFLAAAWYWHFVDVWVWFLY	250
<i>COIII-Bglabrata</i>	251	VS IYWWGSFQNS	262
<i>COIII-Btenagophila</i>	251	VS IYWWGSFQNS	262
<i>COIII-Bstraminea</i>	251	VS IYWWGSFQNS	262

Figura 12 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína COIII de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

### 5.5.3 NADH 1 desidrogenase unidade 1 (ND1)

A figura 13 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND1 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.



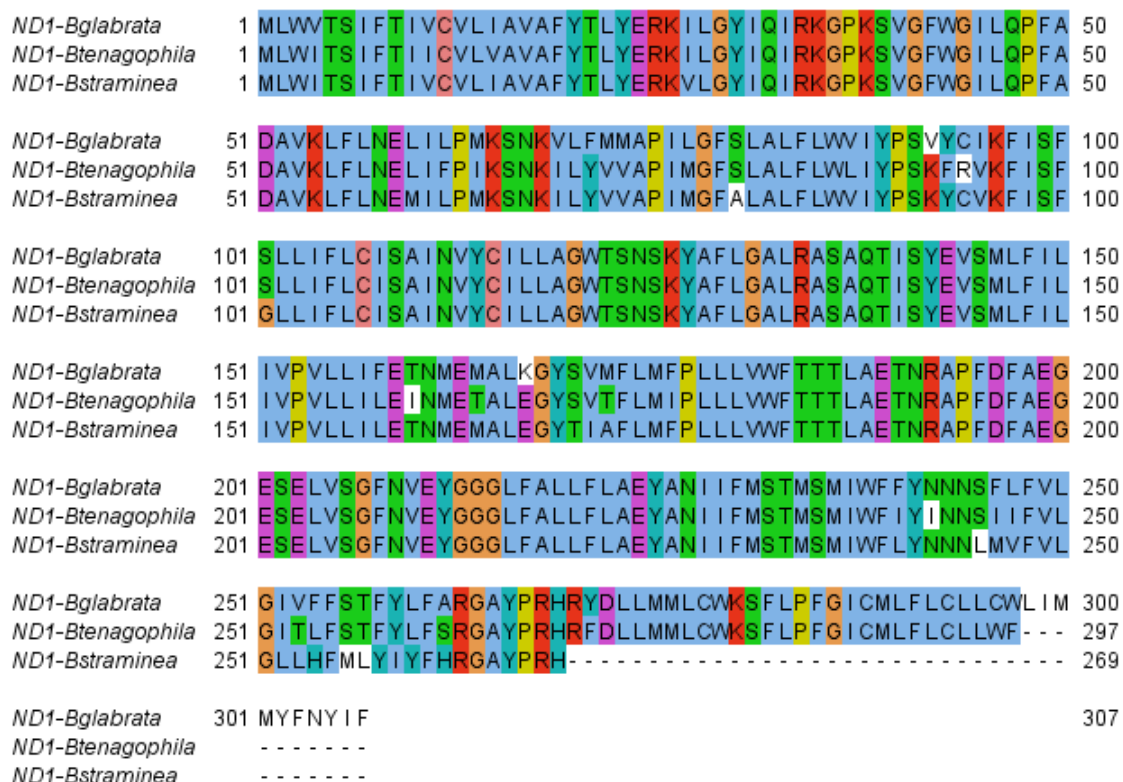


Figura 13 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína ND1 de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

### 5.5.4 NADH 2 desidrogenase subunidade 2 (ND2)

A figura 14 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND2 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

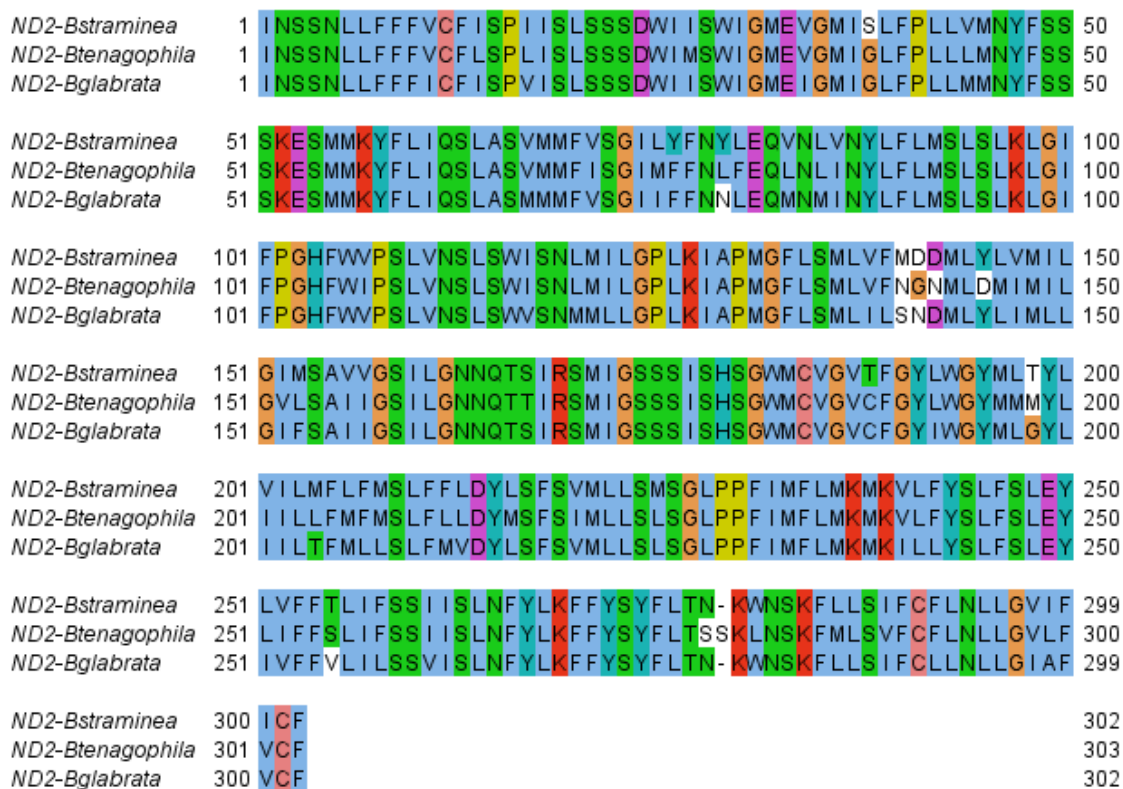


Figura 14 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND2 de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

### 5.5.5 NADH 3 desidrogenase unidade 3 (ND3)

A figura 15 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND3 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.



Figura 15 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND3 de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

### 5.5.6 NADH 4 desidrogenase subunidade 4 (ND4)

A figura 16 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND4 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

ND4-Bglabrata	1	I F S M L F G I L A M V L I N S W S V T F C T I V M L V F I S M L S F N Q Y F S N I V N Y V F L Y N	50
ND4-Btenagophila	1	M F S M L F G I I A I F F I N S W S V S F C S I I V L I L I S M L S F N Q Y F F N T M N Y I F M Y N	50
ND4-Bstraminea	1	M F S M L F G I I A I F F I N S W S V T F C T I V M L V F I S M L S F N Q Y F S N I M N Y V F L Y N	50
ND4-Bglabrata	51	N V S S L L I F L S I L L V G L C F I S T P E N K K S R Y M M C L L S L L F I L V I V F S V N N V L	100
ND4-Btenagophila	51	N I S N L L I F L S I M L I G L C F I S T P E N K K S R Y M S C L L S L L F I L V L V F S V N N V L	100
ND4-Bstraminea	51	N I S S L L I F L S I M L I G L C F I S T P D N I K S R Y I S C L L A L L F I L V V V F L V N Y V L	100
ND4-Bglabrata	101	L F Y I F F E A S L I P T L L L I I S W G Y Q P E R L Q A G S Y M M L Y T V C A S L P L L M V L L Y	150
ND4-Btenagophila	101	L F Y I F F E A S L I P T L L L I V C W G Y Q P E R L Q A G S Y M M L Y T V R A S L P L L M V L L Y	150
ND4-Bstraminea	101	W F Y I F F E A S L I P T L L L I I S W G Y Q P E R L Q A G S Y M M L Y T V C A S L P L L M V L L Y	150
ND4-Bglabrata	151	W S Y N E G S F M M C L S T L T T N - Y E S V S F F V Y L A F L V K L P M Y T C H L W L P K A H V	198
ND4-Btenagophila	151	W S Y N E G S F M I I L S D T C K Y N M Y Q S M Y F I I Y L A F L V K L P L Y S C H L W L P K A H V	200
ND4-Bstraminea	151	W S Y N E G S F M I I L S S M N S S N M Y E S M Y F I V Y L A F L V K L P M Y S C H L W L P K A H V	200
ND4-Bglabrata	199	E A S L A G S M I L A G I L L K L G G Y G L I Q M N C I F N I S G N K S T F L I I I M S L S I W G G	248
ND4-Btenagophila	201	E A S L A G S M I L A G I L L K L G G Y G L I Q M N Y I F N I S G D K S F F L I F I M S L S I W G G	250
ND4-Bstraminea	201	E A S L A G S M I L A G I L L K L G G Y G L I Q M N Y I F S I S G E K S M I L I F I M S L S I W G G	250
ND4-Bglabrata	249	L L A S L M C L R Q V D M K A F I A Y S S I G H M A L V I I G I L N D Q W W G I L S S I I T M Y A H	298
ND4-Btenagophila	251	L L S S L M C L R Q V D L K A F I A Y S S I G H M A L V I V G I L N D Q W W G I L S S I I T M Y A H	300
ND4-Bstraminea	251	L L A S L V C L R Q V D L K A F I A Y S S I G H M A L V I V G I L N D Q W W G M L S S V I T M Y A H	300
ND4-Bglabrata	299	G L C S S A M F C V A Y Y S Y L K V R S R S L M H M K G L L Q V Y P M L S F F W F L L C S I N M A V	348
ND4-Btenagophila	301	G L S S S A L F C I A Y F S Y M K V R S R S L M H M K G L L Q I Y P M I A F F W F L L C S V N M A V	350
ND4-Bstraminea	301	G L C S S A M F C I A Y Y S Y L K V R S R S L M H M K G L L Q I Y P M L S F F W F L L C S V N M A V	350
ND4-Bglabrata	349	P P T L N L L G E M F V I P S L W S L S I L F I F V M G L M I F F S G V Y N M F L Y T N I N H G V H	398
ND4-Btenagophila	351	P P T L N L M G E M F I I P S L W S L S N M F I I V M G L M I F I S G V Y N M F L Y T S I N H S M Y	400
ND4-Bstraminea	351	P P T L N L M G E M F I I P S L W S L S I M F S I V M G M M I F L G G V F M M Y I Y T S I N Q E L I	400
ND4-Bglabrata	399	S K Y I L Y S V P M N S S Q Y M S L I M H M F P M I L F L K L E L F F	433
ND4-Btenagophila	401	S K H M L L G I P L S S S Q Y I S L L M H L F P M V L F L K M D L F F	435
ND4-Bstraminea	401	M E Y I Q N S V P M N S S M Y L W L L M A F N M F R Y L Y M Y F L F	435

Figura 16 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND4 de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

### 5.5.7 NADH 5 desidrogenase subunidade 5 (ND5)

A figura 17 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND5 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

<i>ND5-Bstraminea</i>	1	MSFLLFS	FMLMMM	IIMLMF	IYNNMT	F	ILEVNF	SS	INTCEFS	F	SMVFDK	VS	50				
<i>ND5-Btenagophila</i>	1	MSFLLFS	FMLMMMM	IIMLMF	IYNNMT	Y	ILEVNVLS	INTCEFS	F	SMVFDK	VS	50					
<i>ND5-Bglabrata</i>	1	MSFLLFS	LMIFFMI	IIMLMF	IYKNMT	F	ILEVNLLS	INTCEFS	F	SMIFDK	VS	50					
<i>ND5-Bstraminea</i>	51	FMFVT	IVMMI	SSS	VFLFS	CE	YMK	EDVFF	HRFMWI	LLS	FVVS	SMC	ILVFS	GS	100		
<i>ND5-Btenagophila</i>	51	FMFVT	IVMMI	SSS	VFLFS	CD	YMK	EDVFF	YRFMWI	LLS	FVMS	SMC	FLVFS	GS	100		
<i>ND5-Bglabrata</i>	51	FMFVT	IVMMI	SSS	VFLFS	CD	YMK	EDI	YFYRFMWI	LLS	FVLS	SMC	FLIFS	GS	100		
<i>ND5-Bstraminea</i>	101	LLFMLI	IGWDGL	GVTS	FAL	I	IYYQS	KDS	MIAGFHTML	INR	IGDVF	IVVS	FF	150			
<i>ND5-Btenagophila</i>	101	LLFMLV	IGWDGL	GVTS	FAL	I	IYYQS	KDS	LVAGFHTML	INR	IGDVF	IVIS	FF	150			
<i>ND5-Bglabrata</i>	101	LLFMLV	IGWDGL	GVTS	FAL	I	IYYQS	KDS	LIAGFHTML	INR	IGDVF	IVVS	FF	150			
<i>ND5-Bstraminea</i>	151	LFVFLG	QFQYYP	MCSTAL	MVLV	ILS	IASLT	KSAQYP	FSSWL	PAAMAAP	TP	200					
<i>ND5-Btenagophila</i>	151	LFVFLG	QFHYY	MCSTAM	TLMIL	ILS	IASLT	KSAQYP	FSSWL	PAAMAAP	TP	200					
<i>ND5-Bglabrata</i>	151	LFVFLG	HFYYP	MCSTALT	MLTIL	ILS	VASLT	KSAQYP	FSSWL	PAAMAAP	TP	200					
<i>ND5-Bstraminea</i>	201	VSALVHS	STLV	TAGIF	LI	IRLS	MV	IPMT	KELGN	MLLLL	LGAI	TCLL	GGTAA	250			
<i>ND5-Btenagophila</i>	201	VSALVHS	STLV	TAGIF	LI	IRLS	MV	VTM	SEEL	SNM	LLFL	LGAI	TCLL	GGTAA	250		
<i>ND5-Bglabrata</i>	201	VSALVHS	STLV	TAGIF	LI	IRLS	MV	IPMT	KEL	SNM	LLLL	LGAI	TCLL	GGTAA	250		
<i>ND5-Bstraminea</i>	251	IYFDL	KKI	I	ALST	LSQL	GLMV	FTLGM	GLTNI	TLFHL	FMHALF	KALL	FLA	300			
<i>ND5-Btenagophila</i>	251	IYFDL	KKI	I	ALST	LSQL	GLMV	FTLGM	GLTNI	TLFHL	FMHALF	KALL	FLA	300			
<i>ND5-Bglabrata</i>	251	IYFDL	KKI	I	ALST	LSQL	GLMV	FTLGM	GLTNI	TLFHL	FMHALF	KALL	FLA	300			
<i>ND5-Bstraminea</i>	301	AGAVLL	MSFG	VQDM	RLLGG	ISNS	SPFI	IVIF	NISGF	CLMG	APFL	SAFY	SK	350			
<i>ND5-Btenagophila</i>	301	AGSVLL	MSFG	VQDM	RLLGS	ISNS	APFC	IIF	NISGF	CLMG	APFL	SAFY	SK	350			
<i>ND5-Bglabrata</i>	301	AGSVLM	MSFG	VQDM	RFLGG	ISNS	APFS	IVIF	NISGF	CLMG	APFL	SAFY	SK	350			
<i>ND5-Bstraminea</i>	351	HMILE	KMMF	SSM	NILS	LIMIS	FATIM	TAMY	TTRMM	KSL	WVGK	PNIS	FFMK	400			
<i>ND5-Btenagophila</i>	351	HMILE	KMMF	SSM	NVLS	LLMIS	FATIM	TAMY	TTRMM	KSL	WVGK	PNIS	LILK	400			
<i>ND5-Bglabrata</i>	351	HMILE	KMMF	SSM	NILS	IVMIS	FATIM	TAMY	TTRMM	KSL	WVGK	PNIK	LIMK	400			
<i>ND5-Bstraminea</i>	401	SSFS	IYISM	IMLS	FFA	IISG	KYMWS	LENWF	LECVF	IPNY	LSLI	INFF	MII	450			
<i>ND5-Btenagophila</i>	401	TPSS	IYVSM	VMLS	FFA	IISG	KFMWS	LENWF	LEYVF	IPNY	LSWI	INFF	MF	450			
<i>ND5-Bglabrata</i>	401	NSES	IYFSM	IMLS	FFA	IISG	KYMWS	LENWF	LECVF	IPNY	LGMM	INFF	VLM	450			
<i>ND5-Bstraminea</i>	451	GILMGL	FVSM	NNS	YMWSS	MFFL	APFY	INS	GKLL	NPF	LKNMY	F	LDY	GWLES	500		
<i>ND5-Btenagophila</i>	451	GIFMG	MTMS	MNS	FMVST	MFFL	APFY	IHS	GKQL	NPF	LKNL	K	F	LDY	GWLES	500	
<i>ND5-Bglabrata</i>	451	GILLGL	IMSV	NNS	YMWSS	MFFL	APFY	INS	GKLL	NPF	LKNMY	F	LDY	GWLES	500		
<i>ND5-Bstraminea</i>	501	FSK	VDMYSK	ISSN	FN	VMLF	SWP	VFINS	FFRV	FVMMI	I	FVY	VVNY	545			
<i>ND5-Btenagophila</i>	501	FSK	VDMYSK	ISSN	FS	VLLF	SWP	VFLNS	FFRV	FVLLI	I	FVY	VMNY	545			
<i>ND5-Bglabrata</i>	501	FSK	IDI	ISKV	SSNF	S	ILLF	SWP	IFINS	FFRS	F	I	LMI	I	FVY	MSY	545

Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND5 de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*.

### 5.5.8 NADH 6 desidrogenase unidade 6 (ND6)

A figura 18 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos aminoácidos da proteína ND6 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

<i>ND6-Bstraminea</i>	1	MDLFLFLNIYSLLMLLDYFFLC-FASNSPVS LGISLFFTSVFVVLIMS IFF	50
<i>ND6-Bglabrata</i>	1	MDLFLFLNIYSLLMLISIFLMV SFIS SSPVSLGISLFFTSVFVVLIMS IFF	51
<i>ND6-Btenagophila</i>	1	MDFFLFLNIYSLLMLVSVFLMISFIS SSPVSLGISLFFTSVFVVLVMS IFF	51
<i>ND6-Bstraminea</i>	51	NMWYSYILFLVYIGLLLVLF IYMCMMSTNEKFHF KLIILYFLP IFLFFSEK	101
<i>ND6-Bglabrata</i>	52	NMWYSYILFLVYIGLLLVLF IYMCMMSTNEKFHF KLIILYFLP IFLFFSEK	102
<i>ND6-Btenagophila</i>	52	NMWYSYIMFLVYIGLLLVLF IYMCMMSSNEKFHF KLVVLYLLPLMYFLQS-	101
<i>ND6-Bstraminea</i>	102	SNEVETKFLGYSCESSYYMSMSMFLGLVMVLFITLLSILRILSVKKILYV	152
<i>ND6-Bglabrata</i>	103	SNEVETKFLGYSCESSYYMSMSMFLGLVMVLFITLLSILRILSVKKILYV	153
<i>ND6-Btenagophila</i>	102	SSEININFLGYSAYESSYYLSMSMFLGLVVVLLLTLLSILRILSVKKVLYV	152

Figura 18 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína ND6 de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

### 5.6 Sequência de nucleotídeos do COI

O número de nucleotídeos encontrados neste gene para *B. straminea* foi de 1527. Foi utilizada uma sequência nucleotídica para cada espécie, sendo a sequência de *B. straminea* obtida neste trabalho e as sequências de *B. glabrata* e *B. tenagophila* obtidas do GenBank. Foram observados 1338 sítios invariáveis ou monomórficos e 189 sítios variáveis ou polimórficos. Através do programa DNAsp, foram encontrados 180 sítios com variação em uma das espécies e 9 sítios com variações nas três espécies, nas posições 42, 99, 165, 351, 390, 417, 1167, 1197 e 1212. Quando analisamos as espécies duas a duas, observamos que entre *B. straminea* e *B. glabrata* foram encontrados 130 sítios polimórficos, já entre *B. straminea* e *B. tenagophila* foram 124. Uma região de aproximadamente 650pb do COI, compreendida entre os nucleotídeos 70 e 700, tem sido utilizada para identificação de espécies como *DNA barcode* (Hebert *et al.*, 2003b). Nesta faixa de nucleotídeos foram encontrados 5 diferenças entre as três espécies analisadas. A figura 19 representa o alinhamento múltiplo obtido pelo programa Jalview dos nucleotídeos do gene COI de *B.*

*straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* e as diferenças nucleotídicas entre estas espécies.

<i>COI-Bstraminea</i>	1	TTGCGTTGACTTTTTTCAACAAACCATAAAGATATTGGTACCTTGTATAT	50
<i>COI-Btenagophila</i>	1	TTGCGTTGACTTTTTTCAACAAATCATAAAGATATTGGTACATTGTACAT	50
<i>COI-Bglabrata</i>	1	TTGCGTTGACTCTTTTTCAACAAACCATAAAGATATTGGTACTTTGTACAT	50
<i>COI-Bstraminea</i>	51	AGTTTTTGGAAATTTGATGTGGTCTAGTTGGAACGGATTATCATTATTAA	100
<i>COI-Btenagophila</i>	51	AGTTTTTGGAAATTTGATGTGGCCTGGTTGGAACGGGTTATCTTTACTTA	100
<i>COI-Bglabrata</i>	51	AATTTTTGGAAATTTGGTGTGGTCTAGTTGGTACTGGATTATCATTATTGA	100
<i>COI-Bstraminea</i>	101	TTTCGTTTAGAAGCTTGGTACAACCTTGTTTTGATAGATGAACACTTTTAT	150
<i>COI-Btenagophila</i>	101	TTTCGTTTAGAGCTTGGTACAACCTTGTTTTGATAGATGAACATTTTTAT	150
<i>COI-Bglabrata</i>	101	TTTCGTTTGGAGCTTGGAACTACTCTTGTTTTGATAGATGAACATTTTTAT	150
<i>COI-Bstraminea</i>	151	AATGTTATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTTAT	200
<i>COI-Btenagophila</i>	151	AATGTCATTGTTACGGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATGGTTAT	200
<i>COI-Bglabrata</i>	151	AATGTTGTTGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTTTATAGTTAT	200
<i>COI-Bstraminea</i>	201	ACCTATAATAAATTTGGTGGATTTGGAAACTGAATAGTTCCTTTATTAATTG	250
<i>COI-Btenagophila</i>	201	ACCTATAATAAATTTGGTGGATTTGGAAAATGAATAGTTCCTTTATTAATTG	250
<i>COI-Bglabrata</i>	201	ACCTATAATAAATTTGGTGGTTTTGGTAAATGAATGGTTCCTTTATTAATTG	250
<i>COI-Bstraminea</i>	251	GTGCTCCAGACATAAGATTTTCTCGAATAAATAATATATCTTTTTGACTT	300
<i>COI-Btenagophila</i>	251	GTGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGAATAAATAATATATCATTTTGATTA	300
<i>COI-Bglabrata</i>	251	GTGCTCCAGATATAAGTTTTCTCGGATAAATAATATGTCTTTTTGATTA	300
<i>COI-Bstraminea</i>	301	CTTCCTCCCTTCATTTATTTTACTATTAGTATCTAGAATAGTTGAAGGTGG	350
<i>COI-Btenagophila</i>	301	CTTCCTCCCTTCATTTATTTTATTTATTAGTATCTAGAATAGTTGAAGGTGG	350
<i>COI-Bglabrata</i>	301	CTTCGCGCTTCATTTATTTTATTGTTAGTATCTAGTATAGTTGAGGGTGG	350
<i>COI-Bstraminea</i>	351	GGTAGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCTCCTCTGAGTGGACCTATTGCTC	400
<i>COI-Btenagophila</i>	351	TGTAGGAACAGGTTGAACAGTTTATCCTCCTTTAAGTGGGCCTATTGCTC	400
<i>COI-Bglabrata</i>	351	AGTAGGTACAGGTTGAACGTGATATCCTCCCTTAAAGTGGTCCATTGCTC	400
<i>COI-Bstraminea</i>	401	ATGGTGGTGCATCTGTAGACTTGGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGA	450
<i>COI-Btenagophila</i>	401	ATGGAGGAGCATCTGTGATTTAGCGATTTTTTCTTTACATTTGGCAGGA	450
<i>COI-Bglabrata</i>	401	ATGGTGGTGCCTTCTGTGGATTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGA	450
<i>COI-Bstraminea</i>	451	ATAAGTTCATTTTTAGGTGCTATTTAATTTTATTACTACAATTTTTAATAT	500
<i>COI-Btenagophila</i>	451	ATAAGTTCATTTTTAGGTGCTATTTAATTTTATTACTACAATTTTTAATAT	500
<i>COI-Bglabrata</i>	451	ATAAGTTCATTTTTAGGTGCTATTTAATTTTATTACTACAATTTTTAATAT	500
<i>COI-Bstraminea</i>	501	ACGAGCTCCTGGAATTACGATGGAACGTTTATCGTTATTTGTATGATCTG	550
<i>COI-Btenagophila</i>	501	ACGAGCTCCTGGAATTACAATAGAACGTTTATCATTATTTGTTGATCTG	550
<i>COI-Bglabrata</i>	501	GCGTGCCTCCGGTATTACAATGGAACGTTTATCATTATTTGTATGATCTG	550
<i>COI-Bstraminea</i>	551	TATTAGTTACAGCATTTTTTATTATTGCTATCTTTACCTGTTTTAGCTGGT	600
<i>COI-Btenagophila</i>	551	TATTAATTACAGCATTTTTTACTTTTATTATCTTTACCTGTTTTAGCTGGT	600
<i>COI-Bglabrata</i>	551	TATTAGTTACAGCATTTTTTACTTTTATTATCTTTACCTGTTTTAGCAGGG	600
<i>COI-Bstraminea</i>	601	GCCATTACTATATTATTGACTGATCGAAATTTTAATACTAGATTTTTTTGA	650
<i>COI-Btenagophila</i>	601	GCTATTACAATACTTTTAACTGATCGAAATTTTAATACTAGATTTTTTTGA	650
<i>COI-Bglabrata</i>	601	GCTATTACAATGTTATTAACAGATCGAAATTTTAATACTAGTTTTTTTTGA	650
<i>COI-Bstraminea</i>	651	TCCTGCAGGTGGTGGTGTGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTT	700
<i>COI-Btenagophila</i>	651	CCCTGCAGGAGGAGGTGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTTTGATTTT	700
<i>COI-Bglabrata</i>	651	TCCTGCAGGAGGAGGTGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGGTTTT	700



COI-Bstraminea	701	TTGGTCATCCAGAAGTATAATTTTAAATTTACCTGGATTTGGTATAGTT	750
COI-Btenagophila	701	TTGGACATCCAGAAGTTTATAATTTTAAATTTACCAAGGATTTGGAATGGTT	750
COI-Bglabrata	701	TTGGTCATCCAGAAGTATAATTTTAAATTTACCTGGATTTGGAATAGTT	750
COI-Bstraminea	751	TCTCATATTTTTAAGAAAATTTGTAAAGAAAACCTGCTTTTGAACTTTAGG	800
COI-Btenagophila	751	TCTCATATTTTTGAGAAAATTTGTTAGAAAACCTGCTTTTGAACCTTAGG	800
COI-Bglabrata	751	TCTCATATTTTTAAGTAAATTTGTTAGAAAACCTGCAATTTGGAACTTTAGG	800
COI-Bstraminea	801	AATGATTTATGCTATAGTATCTATTGGTATCTTAGGATTTATTGTATGAG	850
COI-Btenagophila	801	AATAATTTATGCTATAGTATCTATTGGTATCTTAGGATTTATTGTGTGGG	850
COI-Bglabrata	801	TATGATTTATGCTATAGTATCAATTTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAG	850
COI-Bstraminea	851	CTCATCATATATTTACAGTTGGAATAGATGTTGATACTCGTGCTTATTTT	900
COI-Btenagophila	851	CACATCATATATTTACAGTTGGAATAGATGTTGATACACGTGCTTATTTT	900
COI-Bglabrata	851	CTCATCATATATTTACAGTTGGAATAGATGTTGATACTCGTGCATATTTT	900
COI-Bstraminea	901	ACTGCTGCTACAATAATTATTGCGGTTCTACAGGTATTAATAATTTT	950
COI-Btenagophila	901	ACTGCTGCTACTATAAATTATTGCAAGTTCTACAGGAATTAATAATTTT	950
COI-Bglabrata	901	ACTGCTGCTACTATAAATTATTGCGGTCCCAACAGGAATTAATAATTTT	950
COI-Bstraminea	951	ATGACTTATAAATTTTATATGGAAGTCATTGTCAATTTAGTGCTTCAATGT	1000
COI-Btenagophila	951	ATGACTTATAAATTTTATATGGTAGTCATTGTCAATTTAGTGCTTCTATAT	1000
COI-Bglabrata	951	ATGACTTATAAATTTTATATGGAAGTCATTGTTATTTTAGTGCTTCAATAT	1000
COI-Bstraminea	1001	ATTGAGTTCAGGATTTATTTTTTTATTTACACTTGGTGGATTAACAGGA	1050
COI-Btenagophila	1001	ATTGAGTTTTAGGATTTATTTTTTTATTTACACTTGGTGGTTTAACAGGA	1050
COI-Bglabrata	1001	ATTGAGTTTTAGGTTTTATTTTTTTATTTACACTCGGTGGATTAACAGGA	1050
COI-Bstraminea	1051	ATTGTTTTGTCTAATTCATCTTTGGATATTATACATTCATGATACATACTA	1100
COI-Btenagophila	1051	ATTGTATTATCTAATTCATCTTTAGATAATTATATTACATGATACATAATTA	1100
COI-Bglabrata	1051	ATTGTTTTATCTAATTCATCTTTAGATAATTATATTACATGATACATACTA	1100
COI-Bstraminea	1101	TGTAGTTGCTCATTTTTCAATTATGTTTTATCTATAGGTGCAGTGTTTGCAT	1150
COI-Btenagophila	1101	TGTAGTTGCTCATTTTTCAATTATGTTTTATCTATAGGGGCAGTGTTTGCAT	1150
COI-Bglabrata	1101	TGTAGTTGCTCATTTTTCAATTATGTTTTATCTATAGGTGCAGTATTTGCAT	1150
COI-Bstraminea	1151	TATTTGCTGGTTTTGTATATTGATTCCTGTAAATAACTGGTTATACCTT	1200
COI-Btenagophila	1151	TATTTGCTGGATTTGTTTATTGATTTCCAGTAATAACTGGTTATTCACCT	1200
COI-Bglabrata	1151	TATTTGCTGGTTTTGTACTGATTTCTGTAAATAACAGGTTATACCTT	1200
COI-Bstraminea	1201	CATGAAGGAGCAGCTAAAGCTCAATTTTTCGTTATATTTTTGCAGTAAA	1250
COI-Btenagophila	1201	CATGAGGGAGCTGCTAAAGTTCAATTTTTATTATATTTTTGCAGTAAA	1250
COI-Bglabrata	1201	CACGAAGGAGCCGCTAAGGCTCACATTTTTATTATGTTTTGCAGTTAA	1250
COI-Bstraminea	1251	TTTAAACATTTTTCCCTCAACATTTTTAGGTTTATCAGGAATACCTCGTC	1300
COI-Btenagophila	1251	TTTAAACATTTTTCCACAACATTTTTAGGTTTATCAGGAATACCTCGCC	1300
COI-Bglabrata	1251	TTTAAACATTTTTCTCAACATTTCTTAGGGTTATCAGGTATACCCCGTC	1300
COI-Bstraminea	1301	GATATGTAGATTATCCTGATACATATTATAAATGAAATCAAATTTTCATCT	1350
COI-Btenagophila	1301	GATATGTTGATTATCCTGATACATATTATAAATGAAATCAAATTTTCATCA	1350
COI-Bglabrata	1301	GTTATGTTGACTATCCTGATACCTATTATAAATGAAATCAGATTTTCATCA	1350
COI-Bstraminea	1351	TTTGGTTCATTATTTTCAATTAATTGCTGTAATTATATTTGTTTTATTGT	1400
COI-Btenagophila	1351	TTTGGTTCCTTTTTCTATTGTTGCTGTAATTATATTTGTTTTATTGT	1400
COI-Bglabrata	1351	TTTGGTTCACTTTTTCTATTATTGCTGTAATTATATTTGTTTTATTGT	1400

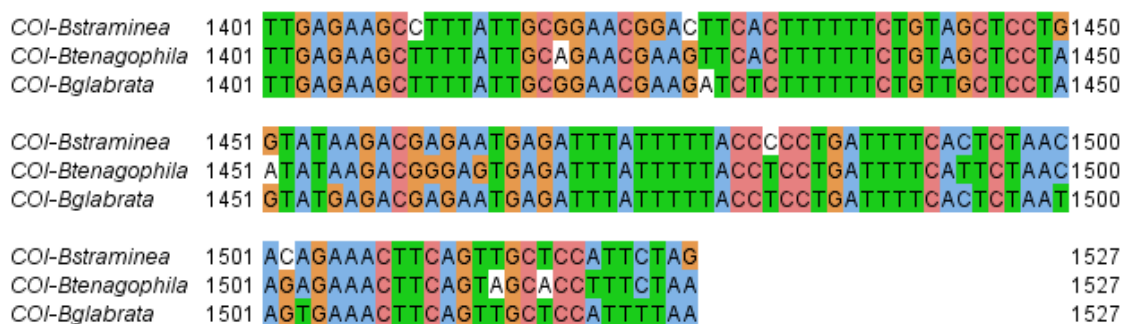


Figura 19 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene COI de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*. As setas em vermelho indicam as posições onde ocorreram variações nucleotídicas nas três espécies e a seta lateral determina a região utilizada com *DNA barcode*.

### 5.7 Ordem gênica

Os genes sequenciados de *B. straminea* apresentaram as mesmas posições que os descritos para *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Na figura 20 temos uma representação esquemática da ordem dos genes de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

1	12S	ND3	ND4	COIII	ND2	COI	16S	ND6	ND5	ND1	ND4L	CYTB	COII	ATP8	ATP6
2	12S	ND3	ND4	COIII	ND2	COI	16S	ND6	ND5	ND1	ND4L	CYTB	COII	ATP8	ATP6
3		ND3	ND4	COIII	ND2	COI		ND6	ND5	ND1					

Figura 20 – Desenho esquemático da ordem gênica de *B. glabrata* (seqüência 1), *B. tenagophila* (seqüência 2) e *B. straminea* (seqüência 3). Nesta figura foram omitidos os demais componentes do DNAm.





No Brasil ocorrem onze espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria*, sendo três de importância na transmissão da esquistossomose: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de ampliar o conhecimento genético acerca destas espécies e no presente trabalho foi realizado um estudo comparativo de alguns genes do DNAmT das espécies hospedeiras. A escolha do DNAmT deve-se às particularidades encontradas neste genoma, que o diferencia do DNA nuclear, tornando-o útil na análise evolutiva e na identificação de espécies (Boore, 1999, Rawlings *et al.*, 2001, Yamazaki *et al.*, 1997).

Os genes COI, COIII, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 do DNAmT de *B. straminea* foram totalmente sequenciados e caracterizados, e o ND1 parcialmente sequenciado totalizando 7764 nucleotídeos e 2588 aminoácidos analisados. As sequências dos aminoácidos de *B. straminea* foram analisadas comparativamente com as sequências de *B. glabrata* e *B. tenagophila* disponíveis no GenBank. Alguns estudos do DNAmT utilizam como fonte de dados sequências de nucleotídeos, entretanto, as sequências de aminoácidos são consideradas mais úteis para comparação entre organismos por serem isentas de substituições sinônimas, e portanto, menos influenciadas por altas taxas de mutação (Foster *et al.*, 1997).

Apesar do DNAmT de animais possuir a característica de evoluir rapidamente, seu arranjo frequentemente mantém-se inalterado por períodos longos de tempo, e sua ordem gênica tende a ser estável em níveis taxonômicos maiores, como filo (Rawlings *et al.*, 2001). Como exemplos temos a semelhança observada entre o DNAmT de animais com plantas, fungos e protistas; e os arranjos gênicos de humanos e trutas, que são idênticos (Boore, 1999). Os moluscos parecem ser uma exceção entre os metazoários, por apresentarem grande variação na organização dos genes (Lecanidou *et al.*, 1994, Hatzoglou *et al.*, 1995). Grande *et al* (2002) determinaram a sequência do DNAmT do molusco Opisthobranchia *Roboastra europaea* e compararam a ordem gênica obtida com a de outros moluscos, e observaram que a organização gênica foi a mesma quando comparado com outros Opisthobranchia e Pulmonata, no entanto, apresentou variações quando comparado a Prosobranchia. Knudsen *et al* (2006) analisaram a ordem gênica

de moluscos das classes Gastropoda, Polyplacophora, Cephalopoda, Scaphopoda e Bivalvia e mostraram que na classe Gastropoda, os Opisthobranchia e Pulmonata apresentaram a mesma ordem gênica, tendo como única exceção, o gênero *Cepaea*. Jannotti-Passos (2007) analisou comparativamente o DNAm de *B. glabrata* e *B. tenagophila* e observou que eles apresentaram a mesma ordem gênica. Neste trabalho, ao compararmos as regiões analisadas para *B. straminea*, com as de *B. glabrata* e *B. tenagophila* anteriormente descritas, observamos que não houve variação entre a ordem gênica nestas espécies. Wolstenholme (1992) afirma que existe uma perda extrema da conservação do arranjo gênico em alguns invertebrados, inclusive moluscos, entretanto esta característica não foi observada para moluscos do gênero *Biomphalaria*. Estes resultados enfatizam o conceito de que arranjos gênicos similares são um indicativo de ancestrais comuns e demonstram que os Planorbideos estudados até o presente momento, apresentam a mesma ordem gênica e possivelmente o mesmo ancestral comum. De fato, a monofilia dos Pulmonatas, entre eles os Planorbideos, tem sido aceita devido a estudos envolvendo caracteres morfológicos e moleculares (Winnepeninckx *et al.*, 1998). Entretanto, muito se discute sobre as relações filogenéticas deste grupo, que são tidas como confusas e que geram controvérsias (Albrecht *et al.*, 2007).

Houve variação entre os genes encontrados nas fitas *plus* e *minus* que codificaram as proteínas de *B. straminea*, dos anteriormente descritos para *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Esta característica já foi observada em alguns moluscos gastrópodes e metazoários (Bandyopadhyaya *et al.*, 2006).

Com relação ao tamanho dos genes totalmente sequenciados e das proteínas inferidas, COI, COIII, ND3 e ND5 apresentaram o mesmo número de aminoácidos nas três espécies analisadas, respectivamente 508, 262, 115 e 545 aminoácidos. Por outro lado, ND2, ND4 e ND6 variaram de tamanho, sendo que ND2 apresentou um tamanho de 302 aminoácidos para *B. straminea* e *B. glabrata*, e 303 para *B. tenagophila*; ND4 apresentou um tamanho de 433 para *B. glabrata* e 435 para *B. tenagophila* e *B. straminea* e ND6 apresentou um tamanho de 152 aminoácidos para *B. straminea* e *B. tenagophila* e 153 para *B. glabrata*. Moléculas do DNAm podem acumular substituições, pequenas deleções, inserções e rearranjos gênicos que

acarretam em variações, porém, a maioria das variações de tamanho são atribuídas a diferenças no comprimento de regiões controle, que geralmente contêm sequências repetitivas (Wolstenholme, 1992).

Alta porcentagem de variação no tamanho de proteínas do DNAm, foram observadas em estudo realizado por Wolstenholme (1992), sendo que a proteína com porcentagem de variação máxima foi o ND6, apresentando 39,3% de variação entre os metazoários analisados. No presente estudo, esperava-se obter baixa variação na análise comparativa entre as espécies devido a estas serem do mesmo gênero e também devido à baixa variabilidade obtida por Jannotti-Passos (2007) em análises comparativas com *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Entretanto, quando comparou-se o tamanho dessa proteína entre as três espécies, foi observado que em *B. straminea* e *B. tenagophila*, houve apenas 79% de identidade entre os aminoácidos, sendo esta, a região menos conservada entre os genes analisados.

Para a maioria dos metazoários o códon de iniciação possui variação apenas na terceira posição, podendo ser: ATA, ATT, ATG, ATC. Neste trabalho foi observado, além dos quatro códons de iniciação, o códon TTG. Com relação a códons de parada incompletos, já foram relatados para *B. glabrata*, *B. tenagophila* e outros moluscos (DeJong *et al.*, 2004; Jannotti-passos, 2007; Hatzoglou *et al.*, 1995). No presente trabalho, foi observado códon de parada incompleto no COIII e ND4, sendo este completado pela adição de adenina (A) durante a transcrição do RNAm. Códon de parada incompletos são consequência de uma extrema economia na organização gênica (Garesse *et al.*, 1988).

Em virtude da identificação de organismos como aspecto fundamental de diversos tipos de estudos biológicos, tais como ecologia, parasitologia, genética, entre outros; diversos métodos têm sido utilizados ou aprimorados para identificação de espécies. Classicamente essas identificações são baseadas nos aspectos morfológicos, comportamentais, fisiológicos e/ou genéticos e estão diretamente relacionados à área de atuação do especialista (Eiziriki *et al.*, 2009). Para haver uma identificação confiável, além da necessidade de profissional especializado, é necessário tempo de dedicação e material de qualidade para análise. Em decorrência desses fatores, estudos empregando técnicas moleculares para identificação têm apresentado alta

efetividade. No âmbito desta tendência, a iniciativa do código de barra de DNA (*DNA barcode*) surgiu em 2003 com o intuito de fomentar a padronização dos métodos moleculares utilizados para identificar espécies de organismos vivos, e aumentar a escala com que identificações confiáveis possam ser realizadas. Pelo fato do COI apresentar níveis de divergência apropriados para estudos de diferenciação entre espécies (Stothard & Rollinson, 1997; Clark *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2000; Footitt *et al.*, 2008; Rougerie *et al.*, 2009; Steinke *et al.*, 2009) e ser considerado um dos mais indicados para caracterização específica de organismos (Hebert *et al.*, 2003a), a sequência nucleotídica desse gene foi analisada. Hebert *et al.* (2003a, b) propõem que todos os organismos tenham seu próprio código de barra de DNA para que possam ser identificados a partir dele. Além disso, dados gerados pelo *DNA barcode* contribuem em pesquisas de taxonomia, de genética populacional e de análises filogenéticas. Dos resultados observados neste trabalho, ao compararmos a sequência nucleotídica do COI de *B. straminea*, com as sequências de *B. glabrata* e *B. tenagophila* retiradas do GenBank, observamos que em apenas 9 posições houve variação nucleotídica nas três espécies. Entretanto, destes pontos variáveis, 5 deles (99pb, 165pb, 351pb, 390pb, 417pb) encontram-se inseridos no fragmento do COI utilizado como *DNA barcode*. Deste modo, pode-se concluir que a variabilidade encontrada, apesar de pequena, permite a identificação e distinção das três espécies, no entanto, faz-se necessário ampliar o estudo intraespecífico e interespecífico para confirmar se esta região pode ser utilizada, com segurança, na separação dessas espécies.

O percentual de identidade representa quantos aminoácidos foram idênticos nas espécies comparadas. Neste trabalho, o COI foi o gene mais conservado entre as três espécies estudadas, apresentando 99% de identidade entre *B. straminea* e *B. glabrata* e 98% de identidade quando comparamos *B. straminea* e *B. tenagophila*. Este resultado era esperado uma vez que as variações nucleotídicas totais (189 pontos) quando ocorreram, geralmente não acarretaram em mudanças ao nível de aminoácidos, sendo portanto, alterações sinônimas. Mudanças de aminoácidos em pelo menos uma das espécies foi observado em 10 posições: 18, 53, 328, 399, 407, 411, 458, 476, 484 e 501.

O presente trabalho amplia o conhecimento genético acerca do molusco *B. straminea* e possibilita futuras aplicações destas informações em análises

filogenéticas e de geração de marcadores espécie específicos do tipo *DNA Barcode*.



- Os genes COI, COIII, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 foram totalmente sequenciados para *B. straminea*, enquanto o gene ND1 foi parcialmente sequenciado.
- Os genes COI, COIII, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 de *B. straminea* apresentaram posições (ordem gênica) idênticas a *B. glabrata* e *B. tenagophila*.
- O tamanho dos genes estudados foi similar aos de *B. glabrata* e *B. tenagophila*.
- Entre as regiões estudadas, foi possível observar cinco códons de iniciação (TTG, ATA, ATG, ATT e ATC) e dois códons de parada (TAA e TAG).
- Existem diferenças nucleotídicas no gene COI que diferenciam *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*.





## 8.1 Anexo 1 – Sequência parcial do gene COI

Os iniciadores universais LCO *forward* e HCO *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar uma região do COI do DNAm de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 745pb. Este anexo demonstra a sequência encontrada e a região onde foram desenhados os iniciadores específicos COIFIL *forward* e COIRIL *reverse*.

```
TTGGCCACCTCATAAGAAGGATGGAACTGGTATCATAGTTGCTCCTTGAG
ATACCAGATGTGAATCTAGTTAGAAGCTGGATGTAGCACATATTGATAGTATA
CCGTGGGGTATTAGAAGCTTGAGTACAACACTTGTTATAGATAAGATGAACA
CTTTTATAATGTTATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTATAATGTTTTTTTATAT
GTTATACCTATAATAATGTGGTGGATTTGGAACTGAATAGTTCCTTTATTA
ATTGGTGCTCCAGACATAAGATTTCTCGAATAAATAATATATCTTTTTGAC
TTCTTCTCCTTCATTTATTTTACTATTAGTATCTAGAATAGTTGAAGGTGG
GGTAGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTCTGAGTGGACCTATTGCTCA
TGGTGGTGCATCTGTAGACTTGGCTATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATA
AGTTCATTTTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACAAITTTTAATATACGAGC
TCCTGGAATTACGATGGAACGTTTATCGTAATTTGTATGATCTGTATTAGTT
ACAGCATTTTAATTATTGCTATCTTTACCTGTTTATAGCTGGTGCCATTACTA
TATTATTGACTCGATCTGACAATTATGAAAAGTATTTTTGGATCCACGCA
CCGAAGCTGGCTGATGANCTCTAATCAATCTANAACNTACTTAACAGTCTC
GATTGCTGCTGCNTGCC
```

## 8.2 Anexo 2 – Sequência parcial do gene 16S

Os iniciadores universais 16Sar *forward* e 16Sbr *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar parte da região do 16S do DNAm de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 686pb. Este anexo demonstra a sequência nucleotídica encontrada e a região onde foram desenhados os iniciadores específicos 16SFIL *forward* e 16SRIL *reverse*.

```
GGAAATAATCTTAAATGAATTCTGCCAGTGATTTTTTTTTTAAATGGCCGCA
GTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTTCTAATTAAGTCT
GGAATGAAAGGAAATATGAAGTAATTCTATCTTAAAGGATTTTTTTTGAATTT
ATTTAAATGATGAAAATATCATTTTATAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAG
AGTTTTGATATTTATATATTTTTGTTGGGGCGACAGGTAAACATATAACTTTA
CGAATTATCATATTGATCGATTTTTTATAAGAATAATAAAAAGTACCTTAGGG
ATAACAGCATTATTTTTTTATGATTGTGACCTCGATGTTGGACTAGGAAC
TTTATGGCTAGCCGTCAAAAAGATTTGTTCTGTTTCAACAATTTTATCCTA
CATGATCTGAGTTCAGACCGGCGTGAGCCAGGTCAGTTTCTATCTTTTTATT
TTAATATTTTTAGTACGAAAGGATCGGAATATTTTTTTAACTTGGCAGAAAA
AATGCAATTAATTTAGGATTAATCTATATCTTTTGATTAGTTGGTAATATAAT
TTATTTTAGAATACTTAGTTTGCATCTAAGAAGAAGTTTATCTTTTTACCAAT
CAAAAATAGTTTATAAAAACATTAACCTTTGGGAGTTAATAAATAGATTAATTT
CTAT
```

### 8.3 Anexo 3 – Sequência parcial do gene ND1

O iniciador universal ND1RIC *forward* e ND1FIC *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar parte do ND1 do DNAmT de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 779pb. Este anexo demonstra a sequência encontrada e o local onde foi desenhado o iniciador específico ND1RIL *reverse*.

```
GATGTTTGGCTAATAGAAGTAGGTAAGTACTGAGAGTATAAGGACAAAATGGTGA
CTGTGTGGTTAAATTTTACAACCATTTGCAGATGCGGTAATATTTTTAAATG
AAATAATTTTACCTATAAAAAGTAATAAAAATTTTATATGTAGTTGCTCCTATT
ATAGGATTTGCATTGGCATTATTTCTTTGGGTTATTTATCCTAGAAAGTACT
GTGTTAAATTTATTAGTTTTGGGTTATTAATTTTTCTTTGTATTTTACAGCAATTA
ATGTATATTGTATTCTTCTTGCAGGTTGAACATCAAATTCTAAGTATGCATTT
TTAGGAGCTTTACGTGCTAGAGCACAAACAATTTCTTATGAAGTTAGAATAT
TATTTATTTAATTGTTCCCGTACTTTTTAATTCTAGAACTAATATGGAAATA
GCCTTAGAAGGTTACACTATTGCTTTTTTAATATTTCCATTATTACTAGTTTG
ATTTACAACAACATTAGCAGAACTAATCGGGCACCTTTTGATTTTGCTGAG
GGTGAATCTGAACTAGTTTCTGGGTTTAATGTAGAATATGGAGGTGGTTTA
TTTGCATTATTATTTTATAGCAGAATATGCAAATATTATTTTTATATCTACAATG
TCAATAATTTGATTTTATATAATAATAATCTGATAGTTTTTGTATTAGGAATT
GTTGTATTTTCTACTTTATATTACTTTCCACGTGGGGCTATCCTCGTCATTT
ACAGCGCCTGCTAATAATATTGTGTGAATGCTAGCCTCACACC
```

### 8.4 Anexo 4 – Sequência parcial do gene 12S

Os iniciadores universais 12SFIC *forward* e 12SRIC *reverse* foram utilizados na PCR para amplificar parte da região 12S do DNAmT de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 597pb. Este anexo demonstra a sequência nucleotídica encontrada e o local onde foi desenhado o iniciador específico 12SFIL.

```
CTTTTATAAAAATAAGGAGAATGACGGGCGATTTGTGCACAAATCAAAAA
AAATTCATTATTTATATATTTTATTATTACTTTTAAGTCCATCTTTAAAGAAA
TATTAATTTCTTATTTGAAAAGAATATATATTGTAACCTCACCTTATGACTTAA
ACATTAGCTACACTATGACCTGTTATATAAAAAGTTTTTATTGATTTCTCCT
TAAGGGAAATCACACGGAATATATAAGCTCTTAGATTAAGCAGGACCAC
TTGAGGGTATCAATTATCTGGTAAGTTCCCTAAAATTTGATTTACCGCC
ATAATTTTAAAGTTTTAATATTAATATTTTAGTGCTTAGATAGTAAGATGTGT
TCTAAAATAATAGGGTATCTAATCCTAGTTTTTAAAATAGAATTTTATTTAGT
ACTTTTTAAAAGTAATAGATTTTTTATATTTTACTAAAAAAAATCATTTTT
TTAAAAAATTATCTAAAAAATCAAACAATTAGGTATGACCGCGACTGC
TGGCACCTAATTCGTCTTGTTCAAAAAGAAAAGTGAATTTTTCTTTGAAAA
TTGTTCAATATCACTACTG
```

## 8.5 Anexo 5 – Sequência parcial do gene COIII

A partir das sequências do COIII de *B. glabrata* e *B. tenagophila* descritos no GenBank, foram desenhados os iniciadores COX3FIL *forward* e COX3RIL *reverse* que foram utilizados na PCR para amplificar parte da região do COIII do DNAmT de *B. straminea*. Estes iniciadores amplificaram um fragmento de 794pb. Este anexo demonstra a sequência nucleotídica consenso obtida a partir do COIII de *B. glabrata* e *B. tenagophila* descritos no GenBank e a região onde foram desenhados os iniciadores específicos COX3FIL *forward* e COX3RIL *reverse*.

```

AGCTATTCTGAA→ATGAACCTCATCAATAGATTCTTACATATAAAAATA←ATCAT
ACTACATCAACAAAATGTCAATATCAAGCAGCAGCTAAAAACCAACATGAT
GATTTTTATTAAAGTGAAAATTTTTTAAACGAAAAACAAACAATTAATAAAA
GTTGCTCCAACCTGCAACATGAGTACCATGAAATCCTGTTGCCATGAAAAAG
ACATGAACCATAAATTCCATCAGCAGATAGAAAATATAGTTTCAGAATATTC
CCCATATTGCAAAAATAAAAAATATAAGCCCTAATAAACAGTAATAAATAA
GTCCTTGAATTGCTGATTTATAATTTCTTCTTCAATAGAATGATGAACTCAT
GTAATGGAACTCCAGATAAGTAAGTAAACCGAAGTATTTAATAACGGAA
CTTGAAATGCTTGCAACGTAAAAATTCCGGTTGGAGGTCAAATGTGCTCCA
ATTTCTACAGAAGGGGCTAATCTTGAATGAAAATAAGCTCAAAAAAAGGCA
AAAAAGAAACAACTTCAGATAAAATAAATAATAACTCCAATTTTTAATCC
TTTGATTACTAATTTATTATGAAATCCTTGATAAGTAGACTCTCGAACACAT
CACGTCATCATAAAAAAGAAATTAATGCAGTAGTAAAGAAACCTAAACTAA
TAATGAAATACTCGATGAACGAATATAATTAATTAACCCAATAGGTATTGAA
AAAATGCTAAAAGAAATAAGAAGAGGTCATGGACTAAATTCTACTAAATGAA
AAGGTTGTCGTAT

```

*9 Referências Bibliográficas*

Alberts B, et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p. il., tab., graf. Inclui CD-ROM. ISBN 86-363-0272-0. Disponível em: < <http://www.pdf-search-engine.com/the-cell-alberts-et-al-pdf.html> >. Acesso em: 15 fev. 2010.

Albrecht C, Kuhn K, Streit B. A molecular phylogeny of Planorbioidea (Gastropoda, Pulmonata): insights from enhanced taxon sampling. *Zool. Scr.* 2007; 36(1): 27-39.

Alcaíde M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Fiquerola J. Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals. *Plos One*. 2009; 4(9): e7092.

Anderson S, Bankier, AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Che E, Coulson AR, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 457-465.

Anderson S, de Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol*. 1982; 156: 683-717.

Avise JC. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1986; 312: 325-342.

Bandyopadhyaya PK, Stevenson BJ, Cady MT, Olivera BM, Wolstenholme DR. Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, *Lophiotoma (Xenuroturris) cerithiformis*: Gene order and gastropod phylogeny. *Toxicon*. 2006; 48: 29-43.

Barbosa FS, Coelho MV. Alguns aspectos epidemiológicos relacionados com a transmissão da esquistossomose em Pernambuco, Brasil. *Publ Avulsas do Cento de Pesquisas Aggeu Magalhães*. 1956; 5: 31-47.

Beard CB, Hamm DM, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae* DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insec. Mol. Biol.* 1993; 2: 102-124.

Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 1981; 26: 167-180.

Boore JL, Brown WM. Mitochondrial genomes and phylogeny of mollusks. *Nautilus.* 1994: Suppl.2: 61-78.

Boore, JL. Survey and summary animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 1767-1780.

Brown WM, George MJr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 1967-1971.

Campbell G, Jones CS, Lockyer AE, Hughes S, Brown D, Noble LR, Rollinson D. Molecular evidence supports an african affinity of the neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proc Biol Sci.* 2000; 267: 2351-2358.

Carvalho OS, Jannotti-Passos LK, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância médica no Brasil. Belo Horizonte: FIOCRUZ/CPqRR; 2005. (Série Esquistossomose, 7).

Carvalho OS, Scholte RGC, Amaral RS. Distribuição dos moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas. 2. ed. Brasília: Ed. MS, 2008. Cap. 8. P.111-126. (Série A: Normas e Manuais Técnicos). ISBN: 978-52-334-1438-9. Disponível em: <

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_controle\\_moluscos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_controle_moluscos.pdf)

> Acesso: 15 fev. 2010.

Cheng S, Chang SY, Gravitt P, Respass R. Long PCR. *Nature*. 1994; 369: 684-685.

Clamp M, Cuff J, Searleand SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. *Bioinform appl note*. 2004; 20: 426–427.

Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol*. 1985; 22: 252-271.

Clark TL, Meinke LJ, Foster JE. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bull Entomol Res*. 2001; 91: 419-427.

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974; 71:2777-2781.

Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int*. 2007; 173: 1-6.

DeJong RJ, Emery AM, Adema CM. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 2004; 90(5): 991-997.

Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison G. The theory behind profile HMMs. *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University. In press. 1998.



Eiziriki E, Miyaki C, Santos F. Código de Barras do DNA. 2009. Disponível em: [http://www.capes.gov.br/images/stories/download/diversos/artigo\\_DNA\\_barcode.pdf](http://www.capes.gov.br/images/stories/download/diversos/artigo_DNA_barcode.pdf) . Acesso em: 15 fev. 2010.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998; 8(3):186-194.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998; 8(3): 175-185.

Folmer O, Blacj 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 Biot.* 1994; 3: 294-299.

Footitt RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Mol Ecol Resour.* 2008; 8(6): 1189-1201.

Foster PG, Jermim LS, Hickey DA. Nucleotide composition bias affects amino acids content in proteins coded by animal mitochondria. *J Mol Evol.* 1997; 44: 282-288.

Garesse R. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics.* 1988; 118(4): 649-663.

Gennis RB. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochim Biophys Acta.* 1992. 1101: 184-187.

Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity.* 2008; 101: 301-320.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 1998; 8: 195-202.

Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R. The complete mitochondrial genome of the Nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of Opisthobranchs. *Mol Biol Evol.* 2002; 19(10): 1672-1685.

Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol.* 1989; 46: 06-11.

Hatzoglou E, Rodakis GC, Lecanidou R. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics.* 1995; 140: 1353-1366.

Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond.* 2003a; 270: S96-S99.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 2003b; 270: 313-321.

Hoffmann RJ, Boore JL, Brown WM. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel *Mytilus edulis*. *Genetics.* 1992; 131: 397-412.

Jannotti-Passos, LK. Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca; Gastropoda). Orientação: Coelho, Paulo Marcos Zech e Carvalho, Omar dos Santos. Belo Horizonte: S.N, 2007. 109 p. il. Tese(Doutorado)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phi82/index.html>

Kerr KCR, Birks SM, Kalyakin MV, Kin YAR, Koblik EA, Hebert PDN. Filling the gap – COI barcode resolution in eastern Palearctic birds. *Front. Zool.* 2009; 6:29.

Knudsen B, Kohn AB, Nahir B, McFadden CS, Moroz LL. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea-slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura. *Mol Phylogenet. Evol.* 2006; 38(2): 459-469.

Kurabayashi A, Ueshima R. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization. *Mol Biol Evol.* 2000; 17 (2): 266-277.

Lecanidou R, Douris V, Rodakis GC. Novel features of metazoan mtDNA revealed from sequence analysis of three mitochondrial DNA segments of the land snail *Albinaria turrita* (Gastropoda: Clausiliidae). *J Mol Evol.* 1994; 38(4): 369-82.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1451-1452.

Maynard BT, Kerr LJ, McKiernan JM, Jansen ES, Hanna PJ. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backup abalone *Haliotis rubra* (leach). *Mar Biotechnol.* 2005; 7(6): 645-658.

Pagés N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Núñez JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology.* 2009; 165(3-4): 298-310.

Palumbi SR. Nucleic acids II: The Polymerase Chain Reaction . In: DM Hillis, C Moritz, BK Mable (eds). *Molecular Systematics* .Sinauer Associates, Sunderland.1996; 233 p.

Paraense WL. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1955; 53: 285-291.

Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1963; 5: 15-22.

Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil . In Introdução à geografia médica do Brasil (Lacaz, C. S., Baruzzi, G. R. & Siqueira J. R., W., eds.), Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo 1972; cap. 10: 213-239.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq Mus Nac Rio de Janeiro. 1975; 55:105-128.

Paraense WL. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. Rev Brasil Biol. 1976; 36: 535-539.

Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: Reis, F.A., Faria, I. & Katz, N., eds. Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. s.l: s.n., 1986; Cap. 14. P. 117-128. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina.

Paraense WL, Corrêa LR. A potential vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84: 281-288.

Ratnasingham S, Hebert PDN. Barcoding. Bold: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). Mol. Ecol. Notes. 2007; 7: 355-364.

Rawlings TA, Collins TM, Bieler R. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. Mol Biol Evol. 2001; 18(8):1604-1609.

- Rougerie R, Decaens T, Deharveng L, Porco D, James SW, Chang C, et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesq. Agropec. Bras. Brasília*. 2009; 44(8): 789-801.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000; 16(10): 944-945.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniats T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- Saraste, M. Structural features of cytochrome oxidase. *Q. Rev. Biophys* 1990; 23: 331-336.
- Souza CP, Jannotti-Passos LK, Freitas JR. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1995; 90(1): 5-10.
- Steinke D, Zemlak TS, Boutillier JA, Hebert PDN. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol*. 2009; 156: 2641-2647.
- Stothard JR, Rollinson D. Partial sequence from cytochrome oxidase subunit (COI) an differentiate *Bulinus globosus* and *B. nasatus*. *J Nat Hist*. 1997; 31:727-737.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(22): 4673-4680.
- Vidigal T, Caldeira RL, Simpson AJG, Carvalho OS. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(1):57-66.

Warrior R, Gall J. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* e *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. Arch Sci Geneva. 1985; 38: 439-445.

Winnepeninckx B, Steiner G, Backeljau T, Wachter RD. Details of Gastropod phylogeny inferred from 18S rRNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 1998; 9(1): 55-63.

Wolstenholme DR, Dawid IG. A size difference between mitochondrial DNA molecules of urodele and anuran amphibians. J Cell Biol. 1968; 39: 222-228.  
Wostenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 1992; 141: 173-216.

Yamazaki N, Ueshima R, Terrett JA, Yokobori S, Kaifu M, Segawa R, et al. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. Genetics. 1997; 145(3): 749-758.