



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Conceitos Básicos da Genética

Atena
Editora
Ano 2019

Benedito Rodrigues da Silva Neto

(Organizador)

Conceitos Básicos da Genética

Atena Editora

2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Geraldo Alves
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)
<p>C744 Conceitos básicos da genética [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos do sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de Acesso: World Wide Web Inclui bibliografia. ISBN 978-85-7247-421-4 DOI 10.22533/at.ed.214192106</p> <p>1. Genética – Estudo e ensino. 2. Genética e melhoramento. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.</p> <p style="text-align: right;">CDD 576</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior CRB6/2422

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Há exatos dezenove anos, mais precisamente na data de 21 de junho de 2000, um dos anúncios mais esperados nos últimos tempos pela comunidade científica era feito: simultaneamente nos Estados Unidos e em Londres o presidente Bill Clinton e o primeiro ministro Tony Blair divulgaram, o que segundo eles seria uma nova era para a humanidade, o sequenciamento do genoma humano. O “rascunho da vida” como denominaram traria novas expectativas quanto à doenças incuráveis, desafios éticos, novas propostas tecnológicas para a pesquisa, mas principalmente uma acessibilidade muito maior ao conceito de genética para a população.

Desde então uma revolução molecular pôde ser observada, novos conceitos adentraram às salas de aula, novos equipamentos evoluíram os laboratórios de pesquisa, novos e milhares de artigos passaram a publicar quase que “em tempo real” as descobertas no campo ambiental, microbiológico, industrial e da saúde. Podemos dizer também que a genética chegou como nunca às mesas das famílias, deixando de ser um assunto apenas dos cientistas.

Portanto a literatura aqui apresentada e intitulada “Conceitos básicos da genética” torna-se relevante não apenas por abordar assuntos relativos à comunidade acadêmica, mas principalmente por demonstrar a diversidade de áreas que hoje utilizam das ferramentas genéticas e moleculares em seus estudos que estão diretamente relacionados ao dia-a-dia da população.

Cada vez mais, o acelerado mundo das descobertas científicas caminha a passos largos e rápidos no sentido de transformar a pesquisa básica em aplicada, portanto é relevante destacar que investimentos e esforços nessa área contribuem grandemente com o desenvolvimento de uma nação. A genética como sabemos possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e tecnológicos.

Esperamos que seja apenas o primeiro de muitos outros livros na área, já que a cada dia novas tecnologias genéticas tornam-se acessíveis e novas descobertas são possíveis. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
FERRAMENTAS GENÔMICAS E GEOGRÁFICAS PARA AVALIAR A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES SUÍNAS	
<i>Elizabete Cristina da Silva</i>	
<i>Samuel Rezende Paiva</i>	
<i>Concepta Margaret McManus Pimentel</i>	
<i>Victor Huço de Vasconcelos Calado</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921061	
CAPÍTULO 2	12
A ABORDAGEM DE GENÉTICA SOB O OLHAR DOS DISCENTES DE ENFERMAGEM DE UMA INSTITUIÇÃO DE ENSINO SEMIPRESENCIAL NO MUNICÍPIO DE ANANINDEUA, ESTADO DO PARÁ	
<i>Letícia Gomes de Oliveira</i>	
<i>Maria Josilene Castro de Freitas</i>	
<i>Brena Yasmim Barata Nascimento</i>	
<i>Shirlene de Nazaré Costa da Silva</i>	
<i>Leandro Neves da Silva Costa</i>	
<i>Dolanno Ferreira Alves</i>	
<i>Adan Rodrigues de Oliveira</i>	
<i>Joycianne Rodrigues Parente</i>	
<i>Karina Guedes Lima</i>	
<i>Abigail das Mercês do Vale Batista</i>	
<i>Dayara de Nazaré Rosa de Carvalho</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921062	
CAPÍTULO 3	17
A GENÉTICA TOXICOLÓGICA E O BIOENSAIO <i>Allium cepa</i>	
<i>Schirley Costalonga</i>	
<i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921063	
CAPÍTULO 4	25
ANÁLISES GENÉTICAS NÃO INVASIVAS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE FELINOS BRASILEIROS	
<i>Andiara Silos Moraes de Castro Souza</i>	
<i>Bruno Henrique Saranholi</i>	
<i>Pedro Manoel Galetti Jr</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921064	
CAPÍTULO 5	40
AVALIAÇÃO DA DISCIPLINA DE GENÉTICA HUMANA FRENTE ÀS DIRETRIZES CURRICULARES NACIONAIS PARA O CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA	
<i>Sulyanne Saraiva de Almeida</i>	
<i>Alcivan Batista de Moraes Filho</i>	
<i>João Paulo da Silva Liberalino</i>	
<i>Sandy Albuquerque Silveira</i>	
<i>Bruna Prado de Oliveira</i>	
<i>Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921065	

CAPÍTULO 6 54

CITOGENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO SULFATO DE COBRE EM DIFERENTES VARIEDADES DE *allium cepa* LINN

Júlio Brando Messias
Rosanne Lopes de Brito
Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão
Inalda Maria de Oliveira Messias
Mônica Simões Florêncio
Betty Rose de Araújo Luz
Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha
Mércia Cristina de Magalhães Caraciolo
João Ferreira da Silva Filho

DOI 10.22533/at.ed.2141921066

CAPÍTULO 7 65

COMO SURGEM NOVAS ENZIMAS? EVOLUÇÃO MOLECULAR DE NOVAS CÓPIAS GÊNICAS NA SUPERFAMÍLIA DAS RODANASES EM DIPTERA

Luana Sousa Soares
Iderval da Silva Júnior Sobrinho

DOI 10.22533/at.ed.2141921067

CAPÍTULO 8 83

DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) REVELA DIFERENTES LINHAGENS EM BACIAS MARANHENSES

Walna Micaelle de Moraes Pires
Maria Claudene Barros
Elmary da Costa Fraga

DOI 10.22533/at.ed.2141921068

CAPÍTULO 9 98

DNA BARCODING CONFIRMA A OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS NA ICTIOFAUNA DO RIO TURIQUÊ, MARANHÃO/BRASIL

Bruno Rafael da Silva Teixeira
Maria Claudene Barros
Elmary da Costa Fraga

DOI 10.22533/at.ed.2141921069

CAPÍTULO 10 111

EVALUATION OF HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MGSO₄ AND IPTG IN ESCHERICHIA COLI W110

Yago Queiroz dos Santos
Gabriella Silva Campos Carelli
Bruno Oliveira de Veras
Joelton Igor Oliveira da Cruz
Geovanna Maria Medeiros Moura
Antônio Moreira Marques Neto
Anderson Felipe Jácome de França

DOI 10.22533/at.ed.21419210610

CAPÍTULO 11 119

ANÁLISE DA IMPORTANCIA DE ESTUDOS DO GENE MDR1 E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE MULTIRESISTENCIA A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE

Lucas Lopes Lima

Benedito R. Da Silva Neto

DOI 10.22533/at.ed.21419210611

CAPÍTULO 12 128

EVALUATION OF PLASMA MIRNAS FOR EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

Alexis Germán Murillo Carrasco

Stefano Giannoni Luza

Oscar Acosta Conchucos

José Manuel Cotrina Concha

Alfredo Aguilar Cartagena

Lia Pamela Rebaza Vásquez

Ricardo Miguel Fujita Alarcón

José Luis Buleje Sono

DOI 10.22533/at.ed.21419210612

CAPÍTULO 13 139

POLIMORFISMO DO GENE GOLA-DRB.2 EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS

Luciana Florêncio Vilaça Lopes

Elizabete Cristina da Silva

Elizabete Rodrigues da Silva

Severino Benone Paes Barbosa

Ângela Maria Vieira Batista

Kleber Régis Santoro

DOI 10.22533/at.ed.21419210613

CAPÍTULO 14 151

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PEIXES DA APA DO INHAMUM, LESTE MARANHENSE, BRASIL

Renato Corrêa Lima;

Marcelo Silva de Almeida;

Maria Claudene Barros;

Elmary da Costa Fraga;

DOI 10.22533/at.ed.21419210614

CAPÍTULO 15 169

MIRNAS: UMA CLASSE DE PEQUENOS RNAs REGULATÓRIOS

Juliana Santana de Curcio

Kleber Santiago Freitas e Silva

Lívia do Carmo Silva

Amanda Alves de Oliveira

Thaynara Gonzaga Santos

Lucas Weba Soares

DOI 10.22533/at.ed.21419210615

CAPÍTULO 16	179
O CICLO CELULAR E SEUS MECANISMOS DE CONTROLE: UMA REVISÃO	
<i>Schirley Costalonga</i>	
<i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210616	
CAPÍTULO 17	191
OSTEOSSARCOMA PEDIÁTRICO	
<i>Natália Paiva do Nascimento</i>	
<i>Thauanna Alves Meira</i>	
<i>Mariana Camargo Maschietto</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210617	
CAPÍTULO 18	202
PHYLOGENETIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF A CELLULASE PRODUCING BACILLUS SP. STRAIN BY 16S RRNA SEQUENCING	
<i>Yago Queiroz dos Santos</i>	
<i>Anderson Felipe Jácome de França</i>	
<i>Bruno Oliveira de Veras</i>	
<i>Gabriella Silva Campos Carelli</i>	
<i>Geovanna Maria Medeiros Moura</i>	
<i>Joelton Igor Oliveira da Cruz</i>	
<i>Fernanda Granja da Silva Oliveira</i>	
<i>João Ricardhis Saturnino de Oliveira</i>	
<i>Luciclaudio Cassimiro de Amorim</i>	
<i>Elizeu Antunes dos Santos</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210618	
CAPÍTULO 19	210
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DOENÇAS HUMANAS NA ERA DA BIOINFORMÁTICA	
<i>Kleber Santiago Freitas e Silva</i>	
<i>Juliana Santana de Curcio</i>	
<i>Lucas Weba Soares</i>	
<i>Lívia do Carmo Silva</i>	
<i>Amanda Alves de Oliveira</i>	
<i>Thaynara Gonzaga Santos</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210619	
CAPÍTULO 20	226
QUIMIOPROTEÔMICA: DESCOBRINDO MOLÉCULAS BIOATIVAS E SEUS ALVOS	
<i>Lívia do Carmo Silva</i>	
<i>Kleber Santiago Freitas e Silva</i>	
<i>Juliana Santana De Curcio</i>	
<i>Lucas Weba Soares</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210620	
SOBRE O ORGANIZADOR	240

FERRAMENTAS GENÔMICAS E GEOGRÁFICAS PARA AVALIAR A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES SUÍNAS

Elizabete Cristina da Silva

Universidade de Brasília (UnB), Ciências Animais
Brasília-DF

Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE), Zootecnia
Recife-PE

Samuel Rezende Paiva

Universidade de Brasília (UnB), Ciências Animais
Brasília-DF

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-
EMBRAPA
Brasília-DF

Concepta Margaret McManus Pimentel

Universidade de Brasília (UnB), Ciências Animais
Brasília-DF

Victor Hugo de Vasconcelos Calado

Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE), Medicina Veterinária
Recife-PE

RESUMO: A grande disponibilidade de técnicas moleculares proporcionou a realização de vários estudos em raças ameaçadas de extinção utilizando as informações dos marcadores baseados em polimorfismos do DNA. Há muitos marcadores no DNA (RFLP, AFLP, RAPD, microssatélites, mtDNA, Y, SNPs) que estão sendo utilizados para estudar a diversidade genética de animais domésticos. Neste texto serão apresentadas descrições dos

marcadores microssatélites, mtDNA e SNPs como ferramentas genômicas para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações suínas assim como serão apresentados alguns aspectos importantes das áreas de Filogeografia e Genética de Paisagem, que combinam as informações obtidas com os marcadores moleculares e a distância física entre as populações para estudar o comportamento da distribuição da variação genética numa escala espacial.

PALAVRAS-CHAVE: Filogeografia; Genética da Conservação; Marcadores Moleculares; Suínos Nativos.

ABSTRACT: The great availability of molecular techniques has provided the realization of several studies in endangered breeds using the information of markers based on DNA polymorphisms. There are many markers in DNA (RFLP, AFLP, RAPD, microsatellites, mtDNA, Y, SNPs) that are being used to study the genetic diversity of domestic animals. In this text will be presented descriptions of microsatellite markers, mtDNA and SNPs as genomic tools to evaluate the diversity and genetic structure of swine populations as well as some important aspects of the areas of Phylogeography and Landscape Genetics, which combine the information obtained with the molecular markers and the physical distance between the populations to

study the behavior of the distribution of genetic variation on a spatial scale.

KEYWORDS: Phylogeography; Conservation Genetics; Molecular Markers, Native Pigs.

1 | INTRODUÇÃO

As raças suínas mais utilizadas na suinocultura intensiva são Duroc, Landrace, Large White, Pietrain, Hampshire, além de uma grande variedade de linhagens modernas de suínos que foram desenvolvidas para atender a demanda atual de animais com maior potencial genético para deposição de proteína na carcaça e fêmeas hiperprolíficas (IRGANG et al., 1992; FÁVERO & FIGUEIREDO, 2009). Contudo, ainda existem as raças localmente adaptadas ou nativas que representam uma pequena parcela do material genético dentro da suinocultura. Essas raças ou grupos genéticos têm sido encontrados nas propriedades de base familiar e se tornaram um meio de vida para o homem do campo (CASTRO et al., 2002; SILVA et al., 2011).

A grande disponibilidade de técnicas moleculares proporcionou a realização de vários estudos em raças ameaçadas de extinção utilizando as informações dos marcadores baseados em polimorfismos do DNA (MAUDET et al., 2002; TADANO et al., 2007). Os microssatélites e mtDNA, por exemplo, foram os marcadores mais utilizados para estudar a diversidade e estrutura genética e a origem de raças suínas brasileiras (SOLLERO et al., 2009; SOUZA et al., 2009; CAVALCANTE NETO, 2010, SILVA et al., 2011) e em outros países (RAMIREZ et al., 2009; LUETKEMEIER et al., 2010; YU et al., 2013).

Os avanços no campo da genética da conservação têm permitido a realização de estudos que englobam a área de filogeografia que geram informações sobre a distribuição da variação genética numa escala espacial de várias espécies de animais e plantas utilizando marcadores moleculares combinados com dados demográficos e geográficos (FOLL & GAGGIOTTI, 2006; TABERLET & BOUVET, 1994). A filogeografia contribui para a compreensão dos processos microevolucionários, como fluxo de genes, seleção natural, a existência de isolamento por distância e gargalo de garrafa (*bottleneck*), que podem conduzir a perda de variabilidade genética ou mesmo a extinção de uma espécie e/ou população (MANTEL, 1967; MANEL et al., 2003).

Atualmente são esperados maiores avanços nos estudos de genética da conservação e no melhoramento genético dos suínos, uma vez que as novas tecnologias de sequenciamento de alto desempenho estão cada vez mais acessíveis e várias espécies de animais domésticos têm o genoma sequenciado, incluindo a espécie suína (ARCHIBALD et al., 2010). Dentro do contexto apresentado, neste texto serão apresentadas descrições dos marcadores microssatélites, mtDNA e SNPs como

ferramentas genômicas para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações suínas assim como serão apresentados alguns aspectos importantes das áreas de Filogeografia e Genética de Paisagem, que combinam as informações obtidas com os marcadores moleculares e a distância física entre as populações para estudar o comportamento da distribuição da variação genética numa escala espacial.

2 | FERRAMENTAS GENÔMICAS PARA ACESSAR A DIVERSIDADE GENÉTICA DE SUÍNOS LOCAIS

Um grande passo nos estudos de caracterização dos recursos genéticos tem sido dado nas últimas décadas. Os avanços na área da genética contribuíram para melhoria nos estudos que envolvem o campo da genética da conservação. Há muitos marcadores no DNA (RFLP, AFLP, RAPD, microssatélites, mtDNA, Y, SNPs) que foram aplicados para estudar a diversidade genética de animais e plantas (SPRITZE et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2006). Neste texto serão apresentadas descrições dos marcadores: microssatélites, mtDNA e SNPs.

2.1 Microssatélites

Os Microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats* ou STR) são sequências curtas que consistem em elementos repetidos in tandem cujo comprimento pode variar de 1 a 6 pb e apresentam características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações e identificação individual (POWEL et al., 1996; WERNER et al., 2004). Esses marcadores podem ser classificados de acordo com o comprimento da unidade de base repetida (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexa-nucleotídeos) e estrutura ("perfeito" e "imperfeito") e representam as regiões instáveis do genoma devido às alterações mutacionais causadas pela perda ou adição de unidades repetitivas. Essas mutações são causadas por mecanismo intramolecular denominado de *slippage* ("escorregão") da DNA polimerase ou crossing over desigual (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992).

Os microssatélites espécie-específicas estão descritos na literatura para várias espécies de animais e plantas (TAUTZ, 1989), e a utilização dos mesmos está muito difundida nos estudos de diversidade genética de animais ameaçados de extinção, pois além de serem facilmente amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), várias literaturas disponibilizam informações úteis que têm contribuído para as diversas pesquisas (FERREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Diversos estudos sobre a diversidade e estrutura genética de populações suínas foram realizados utilizando marcadores microssatélites tanto no Brasil (GONELA, 2003; SOLLERO et al., 2009; SILVA et al., 2011) como em outros países (CALVO et

al., 2000; LEMUS-FLORES et al., 2001, CHAIWATANASIN et al., 2002; CANUL et al., 2005; VICENTE et al., 2008). Gonela (2003) utilizou seis locos de microssatélites na caracterização genética de uma pequena população de Porco Monteiro (N=99) e Tayassu pecari (N=15) e verificou alta variabilidade (4 a 15 alelos, heterozigosidade de 0,13 a 1,00 e conteúdo de informação polimórfica variando de 0,18 a 0,84). Sollero et al. (2008) avaliaram, com 28 microssatélites, a diversidade e estrutura genética de cinco populações suínas, sendo três localmente adaptadas no Brasil (Piau, Moura e Monteiro) e duas comerciais (Landrace e MS60).

A diversidade e estrutura genética de nove grupos genéticos de suínos localmente adaptados no estado de Pernambuco, Brasil (Baé, Caruncho, Canastra, Canastrão, Mamelado, Moura, Nilo, Piau e Sem Raça Definida-SRD) e três raças exóticas (Duroc, Landrace e Large White) foram analisadas com 22 marcadores microssatélites (SILVA et al., 2011).

2.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

O mtDNA é uma molécula circular de fita dupla com aproximadamente 16 kb que contém 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de RNAs de transferência e 2 genes de RNA ribossomais (GRAY, 1989) e apresenta uma taxa média de substituições sinônimas aproximadamente 20 vezes maior do que no DNA nuclear (PESOLE et al., 1999). A sua aplicação como marcador molecular para estudar a evolução molecular, classificação biológica e estrutura genética é devido às características, como peso molecular pequeno, taxa de evolução rápida e quase exclusivamente de herança materna (haplóide), e ausência de recombinação genética.

As duas regiões do mtDNA mais recomendadas nos estudos de estrutura populacional e interpretação filogenética das espécies são a região controle (D-loop) e o gene que codifica para a citocromo b (AVISE, 1994). A região controle desempenha um papel de regular a replicação e a transcrição do mtDNA e compõe cerca de 6% do genoma mitocondrial. Esta região está localizada entre tRNA para prolina e tRNA fenilalanina e contém de 5 a 29 sequências repetidas in tandem (SRTs) (CLAYTON, 1991) com uma taxa de substituição de base de cinco a dez vezes maior que a de outras regiões do mtDNA (MACKAY et al., 1986).

Diversos estudos filogenéticos com populações suínas usaram as sequências da região controle (D-loop) e do gene citocromo b. Randi et al. (1996) usaram os polimorfismos do citocromo b nos estudos evolutivos de Suiformes. Alves et al. (2003) empregaram citocromo b (1140 pb) e a região controle (707pb) para determinar as relações filogenéticas entre suínos ibéricos antigos e atuais. Alex et al. (2004) encontraram uma mistura de haplótipos asiáticos e europeus no porco preto de Canárias por meio de polimorfismos identificados no gene citocromo b.

No Brasil, Souza et al. (2009) utilizaram o citocromo b para investigar a origem das raças suínas brasileiras e verificaram que as raças suínas brasileiras são descendentes de duas linhagens maternas (europeia e asiática), as raças Nilo, Monteiro, Piau e Tatu compartilharam haplótipos de uma linhagem Ibérica, enquanto, a raça Moura apresentou haplótipos de diferentes linhagens de origem europeia e asiática e, por isso, essa raça apresenta maior divergência em relação às demais raças suínas brasileiras.

2.3 Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

Os SNPs são as variações (A, C, T e G) mais comuns de DNA dentro do genoma (SACHIDANANDAN et al., 2001). Os SNPs apresentam vantagens em relação a outros marcadores genéticos pela possibilidade de serem identificados por meio de técnicas de alto desempenho e a um custo, relativamente, baixo (WASSON et al., 2002; LINDROOS et al., 2003; WIEDMANN et al., 2008; SHEN et al., 2009).

Os SNPs são um dos temas centrais em genômica e, com o surgimento das plataformas de sequenciamento de nova geração, milhões de SNPs estão sendo descobertos em várias espécies de interesse agropecuário (ECK et al., 2009; WIEDMANN et al., 2008; LIU, 2009; ALLEN et al., 2010), pois por serem variações facilmente detectáveis estão sendo preferidas nos estudos que envolvem associação entre genótipo e fenótipo (HAYES & GODDARD, 2010). Os SNPs no cromossomo X de suínos de diversos países, incluindo raças brasileiras, permitiram a separação de dois grupos distintos asiáticos e europeus (BURGOS-PAZ et al., 2012).

Durante muitos anos o método de sequenciamento de Sanger (1987) foi fundamental na era genômica. Porém, os novos avanços biotecnológicos na área da genética exigem métodos de sequenciamento rápidos e de baixo custo. Na última década, mais precisamente a partir de 2005, a forma de aquisição de dados genômicos tem mudado completamente (MARDIS, 2008), graças às tecnologias de sequenciamento de nova geração (SNG) que são capazes de sequenciar milhões de pares de bases em uma única corrida (DALCA & BRUDNO, 2010).

No mercado estão disponíveis as plataformas desenvolvidas por diversas companhias: 454 (Roche), HiSeq2000, HiSeq2500 e MiSeq (Illumina), SoLiD (Life Technologies), HeliScope (Helicos BioSciences), Single Molecule Real Time-SMRT (Pacific Bioscience), Ion Torrent-PGM e Proton (Life Technologies). As novas tecnologias de sequenciamento também contribuíram para diminuir os custos de genotipagem de SNP e isso é de extrema importância para o descobrimento de polimorfismos associados às características de interesse econômico (SBORNER et al., 2011). Além disso, os polimorfismos acessados podem ser incorporados aos métodos de Seleção Genômica (MEUWISSEN et al., 2001) para obter maior progresso genético dos animais nos programas de avaliação e melhoramento animal (CAETANO, 2009).

3 | FILOGEOGRAFIA E GENÉTICA DE PAISAGEM

A filogeografia contribuiu para o entendimento da distribuição da diversidade genética de muitas espécies de animais e plantas (EIZIRIK et al., 2001; MILLER et al., 2011). Avise (2000) define filogeografia como um campo de estudo preocupado com os princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies proximamente relacionadas.

A filogeografia surgiu como uma disciplina e seu foco principal é estudar a variação genética em populações de uma espécie ou entre espécies próximas e podem ser realizados com enzimas, RAPDs, RFLPs, cromossomo Y, DNA mitocondrial (mtDNA), SNPs e os microssatélites (AVISE et al., 1987; AVISE, 1998). O recomendado é a utilização de pelo menos dois tipos de marcadores para obtenção de resultados satisfatórios (SCANDURA et al., 2011).

Um dos principais pontos discutidos nos trabalhos de filogeografia é a estrutura geográfica e genética populacional das espécies que é definida como o resultado dos processos microevolutivos e demográficos que atuam entre e dentro das populações, assim como da biogeografia histórica das linhagens genéticas (WENINK et al., 1996). As variações geográficas também podem revelar quais os mecanismos históricos, ecológicos, os padrões fenotípicos, assim como a distribuição de muitas espécies de animais domésticos. Entender estes padrões de variação geográfica é o primeiro passo para inferir os processos evolutivos de suas populações naturais (ZINK & REMSEN, 1986).

Para alcançar as metas propostas nos estudos filogeográficos é necessário estabelecer as relações filogenéticas de um grupo de indivíduos da mesma espécie que ocorre em uma área geográfica (ex.: no território nacional). Isso pode ser feito mediante o uso de sequências de DNA, avaliação dos agrupamentos formados para verificar se os mesmos pertencem à mesma área geográfica e se os grupos mais relacionados são mais próximos geograficamente e, por último, relacionar os indivíduos a outros organismos para verificar se há ou não congruências na distribuição geográfica (MIYAKI, 2009).

Outro campo interdisciplinar que combina conceitos e métodos de genética de populações, ecologia da paisagem e estatística espacial é a análise genética em escala de paisagem (*Landscape genetics*). A genética de paisagem quantifica os efeitos da composição da paisagem, configuração e matriz da qualidade nos padrões espaciais de variação genética subjacente neutra e adaptativa e os processos microevolutivos. O mais importante deste estudo é que se pode identificar a distribuição da diversidade genética de uma espécie de acordo com as variáveis de interesse (MANEL, 2003).

Com a espécie suína estes estudos ainda são raros, mas pode-se dar exemplo

de um utilizando loci microssatélites de DNA para estudar a estrutura populacional em populações de suínos selvagens no sul do Texas (DELGADO-ACEVEDO; DEYOUNG; CAMPBELL, 2007). No qual, os autores conseguiram verificar que em larga escala geográfica, que as populações de suínos exibem um grau moderado de estrutura genética, sugerindo que as populações separadas são diferenciadas o suficiente para ser funcionalmente independentes e que as distâncias genéticas e geográficas entre as populações não seguem uma relação linear simples. Algumas populações geograficamente próximas estão geneticamente dissimilares, enquanto outras populações geograficamente distantes são semelhantes. Estes avanços foram obtidos tanto pelos avanços nas técnicas moleculares quanto também pelo aumento na disponibilidade de bancos de dados georreferenciados.

Existem softwares que permitem georrefenciar pontos e estão programados para calcular índices de diversidade com base na latitude, longitude e dados de caracterização das populações (HIJMANS et al., 2001). Outra forma de analisar a relação entre os dados geográficos e genéticos é utilizando o teste de Mantel (MANTEL, 1967) pelo qual se calcula a significância entre duas ou três matrizes mediante um processo de permutação. A partir da combinação das informações genéticas com as geográficas permite o acesso das características de paisagem sobre a estrutura genética de populações e fluxo gênico (MANEL et al., 2003).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; PAIVA, S.R. et al. Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma Revisão da Literatura. Embrapa Rec. Gen. e Biotec., Brasília, DF, 2006.

ALEX, F.; MARCEL, C.; JOSE-LUIS, A. et al. Estimating the frequency of Asian cytochrome B haplotypes in standard European and local Spanish pig breeds. **Genet. Sel. Evol.** n. 36, 97– 104, 2004.

ALLEN, A. R.; TAYLOR, M. MCKEOWN, B. Compilation of a panel of informative single nucleotide polymorphisms for bovine identification in the Northern Irish cattle population. **BMC Genetics.** v.11, n.5. 2010.

ALVES, E., OVILO, C. RODRIGUEZ, M.C. et al. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. **Anim. Genet.** 34: 319–24. 2003.

ARCHIBALD, A. L.; BOLUND, L. et al. Pig genome sequence analysis and publication strategy. **BMC Genomics** 11: 438, 2010.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the History and Formation of Species.** Harvard University Press, Cambridge, MA. 446pp. 2000.

_____ **Molecular markers, natural history and evolution.** New York: Chapman & Hall,

AVISE, J. C. ARNOLD, J.; BALL, R. M. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.

BURGOS-PAZ, W., SOUZA, C. A.; CASTELLO, A. Worldwide genetic relationships of pigs as inferred from X chromosome SNPs. **Animal Genetics**, doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02374.x. 2012.

CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectiva para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CALVO, J.H.; LOBERA, J.; OSTA, R. et al. Caracterización genética de la raza porcina chato murciano. **Archivos de Zootecnia**, v. 49, p. 53-58, 2000.

CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. N.; GERMANO, J. L. Census of Brazilian naturalized swine breeds. **Archivos de Zootecnia**, n. 51, p. 1-5, 2002.

CAVALCANTE NETO, A. Origem do suíno casco-de-burro e sua relação genética com populações ibéricas e americanas. Jaboticabal, 2010. **Tese** (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

CLAYTON D.A. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*, v7, pp. 453–478. 1991.

DALCA, A. V.; BRUDNO, M. Genome variation discovery with high-throughput sequencing data. **Briefings in Bioinformatics Advance**. 2010.

DELGADO-ACEVEDO, J.; DEYOUNG, R.W.; CAMPBELL, T.A. Landscape genetics of feral swine and implications for management. (2007). *Managing Vertebrate Invasive Species*. 9. <http://digitalcommons.unl.edu/nwrcinvasive>.

ECK, S. H.; ANNA, B-P., FLISIKOWSKI, K. Whole genome sequencing of a single *Bos Taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery. **Genome Biology**. v.10, 2009.

EIZIRIK, E.; KIM, J.; MENNOTI-RAYMOND, M. et al. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**. v. 10, p. 65-79. 2001.

FÁVERO, J. A. E. P. F.; FEDALTO, L. M.; WOLOSZYN, N. A raça de suínos moura como alternativa para a produção agroecológica de carne. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, 2007.

FERREIRA, J.S.B.; PAIVA, S.R.; SILVA, E.C. et al. Genetic diversity and population structure of different varieties of Morada Nova hair sheep from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.2480 - 2490, 2014.

FOLL, M.; GAGGIOTTI, O.E. Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. **Genetics**. n.174. pp.875–891. 2006.doi:10.1534/genetics.106.059451.

GONELA, A. Aplicação de Marcadores Microsatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização

genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada). Ribeirão Preto, 2003, 88 f. (**Tese de Doutorado**). Universidade de São Paulo- SP, 2003.

GRAY M.W. Origin and evolution of mitochondrial DNA. **Annual Review of Cell Biology**. v.5, p. 25–50. 1989.

HAYES, B.; GODDARD, M. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. **Genome**, v.53, n.11, p. 876-883, 2010.

HIJMANS, R.J.; GUARINO, L.; CRUZ, M.; ROJAS, E. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources Newsletter*, n. 127, p.15-19, 2001.

IRGANG, R.; FAVERO, J.A.; SCHEID, I. Heterose e complementariedade entre raças na produção de suínos para o abate. **Suinocultura Dinâmica**, Ano I, n.3, 6p, 1992.

LEMUS-FLORES, C.; ULLOA-ARVIZU, R.; RAMOS-KURI, M. et al. Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 3021- 3026, 2001.

LINDROOS, K.; SIGURDSSON, S.; JOHANSSON, K. et al. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.70, 2002.

LIU, G. E. Applications and Case Studies of the Next-Generation Sequencing Technologies in Food, Nutrition and Agriculture. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v.1, p. 75-79, 2009.

LUETKEMEIER, E.S.; SODHI, M.; SCHOOK, L. B.; MALHI, R.S. Multiple Asian pig origins revealed through genomic analyses. **Molecular phylogenetics and evolution**. v. 54,680-6, 2010.

MACKAY, S., OLIVER, L. D.; LAIPIS, P. J. Template - directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis. **Mol. Cell**. n.6, p.1261-126. 1986.

MANEL, S.,; SCHWARTZ, M.K, LUIKART, G. TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends Ecol. Evol.** n18. pp.189 -197. 2003.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, n.2, p. 209-220, 1967.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics HumGenet**. n.9, pp.387–402. 2008.

MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P.. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **Journal Animal Science**, v.80, p.942-950, 2002.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES B. J., GODDARD, M. E., Prediction of total genetic value using genome – wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, p.1819 – 1829, 2001.

MIYAKI, C. Y. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. **Megadiversidade**, v. 5, n.1-2 , p. 96-100, 2009.

- MILLER, J. M.; HALLAGER, S.; MONFORT, S. L. et al. Phylogeographic analysis of nuclear and mtDNA supports subspecies designations in the ostrich (*Struthio camelus*). **Conserv Genet**, v.12, p.423–431, 2011.
- PESOLE, G.; GISSI, C., CHIRICO, A.D.E. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. **J. Mol. Evol.**, v. 48, p.427–434, 1999.
- POWEEL, W.; MORGANTE, M.; CHAZ, A. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.
- RANDI, E.; LUCCHINI, V.; Evolutionary genetics of the suiforms as reconstructed using mtDNA sequencing. **Journal of Mammalian Evolution**. n.3. pp. 163-194. 1996.
- RAMIREZ, O.; OJEDA, A., TOMAS, A. et al. Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. **Mol Biol Evol.**, 26:2061–2072, 2009.
- SACHIDANANDAN, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S.C. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**. n. 409. pp. 928-933, 2001.
- SBONER, A.; MU, X. J; GREENBAUM, D. et al. The real cost of sequencing: higher than you think! **Genome Biology**, 2011, 12:125 doi:10.1186/gb-2011-12-8-125.
- SCANDURA, M., IACOLINA, L., APOLLONIO . Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. **Mammal Rev**. 2011, v. 41, n. 2, pp.125–137.
- SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**. n. 20. pp.211-215. 1992.
- SHEN, Y.; WAN, Z.; COARFA, C. et al. A SNP discovery method to assess variant allele probability from next-generation resequencing data. **Genome Res** v. 20, p. 273-280, 2009.
- SILVA, E. C.; DUTRA JUNIOR, W.M.; IANELLA, P. Patterns of genetic diversity of local pig populations in the State of Pernambuco, Brazil. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.8, p.1691-1699, 2011.
- SILVA, E. C.; MCMANUS, C. M.; GUIMARÃES, M. P. S. L. M. P. et al. Validation of a microsatellite panel for parentage testing of locally adapted and commercial goats in Brazil. **Genetics and Molecular Biology** (Impresso), v.37, p.54 - 60, 2014.
- SOLLERO, B. P.; PAIVA, S. R.; FARIA, D.A. et al. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v. 13, p.1-8, 2009.
- SOUZA, C.A. Padrões de diversidade mitocondrial e nuclear em raças de suínos naturalizadas do Brasil. Universidade Católica de Brasília (**Tese de Doutorado**, 141f).2011.
- SOUZA, C. A.; PAIVA, S. R.; PEREIRA, R. W. et al. Iberian origin of Brazilian local pig breeds based on Cytochrome b (MT-CYB) sequence. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 759-762, 2009.
- SPRITZE, A.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A.S. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1157-1164,

2003.

TABERLET, P.; BOUVET, J. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the bear *Ursus arctos* in Europe. **Proc. R. Soc. Lond. B.** n.255. pp. 195-200, 1994.

TADANO, R.; SEKINO, M.; NISHIBORI, M. et al. Microsatellite Marker Analysis for the Genetic Relationships Among Japanese Long-Tailed Chicken Breeds. In: **Poultry Science.** v. 1, 2007.

TAUTZ, D.. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v.17, p.6463-6471, 1989.

WASSON, J.; SKOLNICK, G.; LOVE-GREGORY, L. et al. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology. **Biotechniques.** n.32, p.1144–1146. 2002.

WENINK, P.W.; BAKER, A.J.; TILANUS, M.G.J. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). **Evolution**, v.50, p318-330, 1996.

WERNER, F.A.O.; DURSTEWITZ, G.; HABERMANN, F.A. et al. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. **Animal Genetics**, n. 35. p. 44-49, 2004.

WIEDMANN, R. T.; SMITH, T.P.L.; NONNEMAN, D. J. SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing. **BMC Genetics.** v.81, n.9, 2008.

YU, G.; XIANG, H. et al. The phylogenetic status of typical Chinese native pigs: analyzed by Asian and European pig mitochondrial genome sequences. **J Anim Sci Biotechnol**, v.4, n.1, p. 9, 2013.

ZINK. R.M.; REMSEN, J.V. Jr. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. **Current Ornithology** 4: 1–69, 1986.

A ABORDAGEM DE GENÉTICA SOB O OLHAR DOS DISCENTES DE ENFERMAGEM DE UMA INSTITUIÇÃO DE ENSINO SEMIPRESENCIAL NO MUNICÍPIO DE ANANINDEUA, ESTADO DO PARÁ

Letícia Gomes de Oliveira

Discente em Enfermagem, Faculdade Paraense de Ensino, Bolsista pelo Programa Universidade Para Todos

Maria Josilene Castro de Freitas

Discente em Enfermagem, Faculdade Paraense de Ensino Faculdade Paraense de Ensino

Brena Yasmim Barata Nascimento

Discente em Enfermagem, Faculdade Integrada Brasil Amazônia

Shirlene de Nazaré Costa da Silva

Discente em Enfermagem, Faculdade Pan-Amazônica

Leandro Neves da Silva Costa

Discente em Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Pará

Dolanno Ferreira Alves

Discente em Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Pará

Adan Rodrigues de Oliveira

Discente em Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Pará

Joycianne Rodrigues Parente

Discente em Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto Federal do Pará

Karina Guedes Lima

Enfermeira, Faculdade Estácio de Castanhal

Abigail das Mercês do Vale Batista

Enfermeira, Faculdade Pan Amazônica

Dayara de Nazaré Rosa de Carvalho

Especialista em Enfermagem em Terapia Intensiva, Escola Superior da Amazônia

RESUMO: A genética é uma especialidade nas ciências da saúde e se faz necessária nos currículos dos cursos com abordagens direcionadas para as áreas de atuação. Um dos principais desafios do estudo em genética é relacionado à prática e extensão do ensino, e tratando-se de EaD essa dificuldade torna-se constante. Este trabalho objetivou analisar a percepção dos discentes do curso de enfermagem de uma instituição de ensino semipresencial, localizada no município de Ananindeua, Pará, Brasil, a respeito do ensino de genética e suas vivências. Estudo descritivo, exploratório, de probabilidade por conveniência, do tipo relato de experiência. Foi realizado conforme agendamento em uma instituição de ensino semipresencial, localizado no bairro da Cidade Nova, município de Ananindeua, Pará. Inicialmente, foi explicado o objetivo e significado da pesquisa e foram aplicados questionários semi-estruturados aos discentes de enfermagem que já cursaram a disciplina de genética por meio do ambiente virtual de aprendizagem. Todos os participantes classificaram a disciplina de genética como muito importante para sua formação; 60,8% (14/23) afirmam que é regular; 69,5% (16/23) afirmaram que o conteúdo abordado condizia com as necessidades do curso; 17,3% (4/23) dos alunos afirmaram ter tido contato com pacientes com indício de doença genética

e 100% disseram não ter orientação acadêmica de como proceder nesses casos e não tem pretensão de realizar uma pós-graduação na área. É necessário que a EaD viabilize o encontro entre sujeitos, a interatividade entre profissionais de saúde, a troca de experiências e a construção coletiva, necessitando de intervenções que tornem a disciplina mais proveitosa.

PALAVRAS-CHAVE: Genética; Ensino a distância; Enfermagem

ABSTRACT: Genetics is a specialty in health sciences and is necessary in the curricula of courses targeted approaches to areas of expertise. One of the main challenges of the genetic study is related to the practice and extension of education, and in the case of EaD this difficulty becomes constant. This worked aimed to analyze the perceptions of students of nursing degree courses education institution, located in the municipality of Ananindeua, Pará, Brazil, regarding the teaching of genetics and their experiences. Descriptive, exploratory study of probability for convenience of type case studies. Was held as schedule in an educational institution courses, located in the new town, municipality of Ananindeua, Pará. Initially, it was explained the purpose and meaning of research and semi-structured questionnaires were applied to nursing students who have already attended the discipline of genetics through the virtual learning environment. All participants rated the discipline of genetics as very important to your training; 60.8% (14/23) state that is regular; 69.5% (16/23) reported that the contents discussed match the needs of the course; 17.3% (4/23) of the students reported having had contact with patients with evidence of genetic disease and 100% said not having academic guidance of how to proceed in these cases and has no claim to perform a graduate in the area. It is necessary that the EaD enable encounter between subject, the interactivity between health professionals, exchange of experience and collective construction, requiring interventions become more productive discipline.

KEYWORDS: Genetics; Distance education; Nursing

1 | INTRODUÇÃO

A genética está vinculada a praticamente todos os conteúdos da biologia, sendo fundamental uma aprendizagem sólida dos conceitos desta área. Além disso, é uma especialidade nas ciências da saúde e se faz necessária nos currículos dos cursos com abordagens direcionadas para as áreas de atuação (MOURA, 2013).

O Ensino a Distância (EaD), conhecido também por ambiente virtual de aprendizagem (AVA) já alcançou uma densidade teórica que a coloca como uma alternativa que vai além da objetividade profissionalizante, sendo reflexiva e efetivamente formativa (RIBEIRO, 2007).

Um dos principais desafios do estudo em genética é relacionado à prática e extensão do ensino, e tratando-se de EaD essa dificuldade torna-se constante. Para enfrentar esse desafio, é preciso desenvolver um conjunto de ações no campo

educacional que proporcione uma ampliação quantitativa e qualitativa dos processos educativos (DOS SANTOS, 2012).

A enfermagem em genética e genômica é definida como a proteção, promoção e otimização da saúde; prevenção da doença e lesão; alívio do sofrimento por meio do diagnóstico das respostas humanas; e defesa, de forma pró-ativa, dos direitos de indivíduos, famílias e comunidades sob o cuidado genômico (ISNG, 2007).

O papel da enfermagem é determinado de acordo com os dois níveis de atuação com a formação acadêmica generalista ou especialista e ambos incluem a aplicação da genética e da genômica na avaliação, no diagnóstico e nas intervenções de enfermagem (FLÓRIA-SANTOS, 2013).

2 | OBJETIVO

Analisar a percepção dos discentes do curso de enfermagem de uma instituição de ensino semipresencial, localizada no município de Ananindeua, Pará, Brasil, a respeito do ensino de genética e suas vivências.

3 | METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, exploratório, de probabilidade por conveniência, do tipo relato de experiência. Foi realizado em abril de 2018, por integrantes de uma liga acadêmica de uma instituição privada, conforme agendado brevemente com a turma, e a direção da instituição de ensino semipresencial, localizado no bairro da Cidade Nova, município de Ananindeua, Pará.

Foram incluídos no trabalho alunos que estavam presente no momento da pesquisa, que já haviam cursado a disciplina de genética ou afins e que estavam regularmente matriculados na instituição. E foram excluídos os que não estavam presentes ou matriculados.

Inicialmente, foi explicado o objetivo e significado da pesquisa e foram aplicados questionários semi-estruturados aos discentes de enfermagem que já cursaram a disciplina de genética por meio do ambiente virtual de aprendizagem (AVA). O questionário abordava nível de conhecimento em genética, relação com o conteúdo e o curso, patologias genéticas e interesse pela área.

Os resultados foram armazenados em uma base de dados no Programa EPIINFO 2007, versão 7.1.0.6. Os participantes foram informados que a qualquer momento poderão abandonar o estudo, pois sua participação foi voluntária.

4 | RESULTADOS

Do total de 38 discentes, participaram da pesquisa 23 acadêmicos regularmente matriculada na instituição.

Todos os participantes classificaram a disciplina de genética como muito importante para sua formação; 39,2% (9/23) afirmaram que seu conhecimento em genética é ruim, 60,8% (14/23) afirmam que é regular e não houve afirmações no item bom.

Dos entrevistados, 69,5% (16/23) afirmaram que o conteúdo abordado condizia com as necessidades do curso, porém todos consideram necessário que haja abordagem prática da disciplina.

Quando perguntado sobre as patologias genéticas conhecidas, as mais citadas foram Síndrome de Down, seguido de Daltonismo e Anemia Falciforme. Somente 17,3% (4/23) dos alunos afirmaram ter tido contato com pacientes com indício de doença genética e 100% disseram não ter orientação acadêmica de como proceder nesses casos.

Todos acadêmicos afirmaram que a área de genética não é a primeira opção para uma possível pós-graduação.

5 | DISCUSSÃO

Embora a enfermagem, já reconheça a importância da genética e da genômica na prática clínica, levantamentos realizados em diversos países mostram que esses conteúdos ainda são limitados nos cursos de graduação em enfermagem, igualmente a experiência relatada onde 60,8% avaliaram o conhecimento nessa área como regular (Jenkins, 2005).

Este trabalho evidenciou que 100% dos participantes, não possui intenção de fazer uma pós graduação na área de genética, possivelmente por que os profissionais da saúde ainda consideram a genética uma especialidade médica como afirma CALZONE, 2010.

Nota-se que a maioria dos entrevistados queixam-se da falta de prática e/ou contato com pacientes ou as patologias relacionadas a genética, devido a modalidade EaD, o que de acordo com Rojo, 2011 é importante os profissionais de Enfermagem refletirem sobre suas práticas e para a necessidade de se apropriarem dos recursos da EAD para constante atualização

6 | CONCLUSÃO

O profissional de enfermagem possui potencial para aplicar seus conhecimentos na assistência ao cuidado, no ensino e na pesquisa em oncológica ou diversos setores,

sob a ótica da genética e da genômica.

Para tanto, é notável que há um déficit no processo de ensino-aprendizagem de genética, principalmente em EaD, que constitui-se um desafio na área da saúde e conseqüentemente em saúde pública. É necessário que a EaD passe a não ser mais considerada uma mercadoria de alta tecnologia, mas um processo que viabilize o encontro entre sujeitos, a interatividade entre profissionais de saúde, a troca de experiências e a construção coletiva de novos saberes, necessitando de intervenções que tornem a disciplina mais proveitosa, dentre as quais boas opções seriam as atividades práticas e de extensão hospitalar.

REFERÊNCIA

CALZONE K.A; CASHION A; FEETHAM S; JENKINS J; PROWS C.A; WILLIAMS J.K et al. **Nurses transforming health care using genetics and genomics**. Nurs Outlook. 2010 Jan; 58(1):26-35.

DOS SANTOS H.T. **O desenvolvimento da educação a distância no Brasil e sua contribuição na formação continuada de professores**. 2012.

FLÓRIA-SANTOS M et al. Atuação do enfermeiro em oncologia na perspectiva da genética e genômica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 22, n. 2, 2013.

INTERNATIONAL SOCIETY OF NURSES IN GENETICS. **American Nurses Association. Genetics/genomics nursing: scope and standards of practice**. Silver Spring, Md: Nursesbooks.org; 2007.

JENKINS J.F; LEA D.H. **Nursing Care in the Genomic Era: a case-based approach**. Sudbury (CA): Jones & Bartlett Publishers; 2005.

MCKUSICK V.A; RUDDLE F.H. **Toward a complete map of the human genome**. Genomics 1987 oct; 1(2): 103-6.

MOURA J; et al. **Biologia/Genética: O ensino de biologia, com enfoque a genética, das escolas públicas no Brasil – breve relato e reflexão**. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p.167-174, 19 dez. 2013. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n2p167>. Disponível em: <www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/download/13398/13912>. Acesso em: 15 fev. 2019.

RIBEIRO, EN; MENDONÇA, GA de A.; MENDONÇA, AF. **A importância dos ambientes virtuais de aprendizagem na busca de novos domínios da EAD**. In: Anais do 13º Congresso Internacional de Educação a Distância. Curitiba, Brasil. 2007.

ROJO, PT et al. **Panorama da educação à distância em enfermagem no Brasil**. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 45, n. 6, p. 1476-1480, 2011.

A GENÉTICA TOXICOLÓGICA E O BIOENSAIO *Allium cepa*

Schirley Costalonga

Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos
Hídricos
Cariacica – Espírito Santo

Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Universidade Federal do Espírito Santo –
Departamento de Ciências Biológicas
Vitória – Espírito Santo

RESUMO: A genética toxicológica é uma ferramenta indispensável na busca por substâncias potencialmente danosas aos seres vivos e ao meio ambiente como um todo. Atualmente é amplamente empregada em estudos de impacto ambiental e na produção de medicamentos; no entanto, sua utilização na análise dos metabólitos secundários vegetais vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas e um dos testes mais utilizados é o ensaio *in vivo* com raízes de cebola (*Allium cepa* L.). O presente trabalho traz uma revisão sobre as origens da genética toxicológica, bem como seu uso no estudo dos produtos produzidos pelo metabolismo vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoquímicos. Mutagenicidade. Teste do *A. cepa*.

ABSTRACT: Toxicological genetics is an indispensable tool in the search for potentially damaging substances to living beings and the

environment as a whole. Currently it is widely employed in environmental impact studies and in the production of medicines; however, its use to analyze secondary metabolites plants is increasing considerably in recent decades and one of the most widely used tests is the *in vivo* with roots of onion (*Allium cepa* L.). The present work brings a review on toxicological genetics origins, as well as your use to study the products produced by plant.

KEYWORDS: Phytochemicals. Mutagenicity. *A. cepa* System.

1 | INTRODUÇÃO

Desde tempos imemoriais as espécies que habitam o planeta são irremediavelmente expostas às substâncias que podem causar danos e afetar sua sobrevivência e desde as mais antigas civilizações há relatos de estudos sobre seus efeitos na saúde humana e animal.

Com o passar das eras e o desenvolvimento da humanidade, novas substâncias foram desenvolvidas, contaminando o ambiente e colocando em risco a existência dos seres vivos, principalmente do homem.

Neste contexto a genética vegetal surge como ferramenta na investigação dos potenciais tóxicos desses compostos, sejam de

que origem forem, bem como no entendimento dos seus mecanismos de ação sobre o material genético.

Assim, o presente trabalho objetivou fazer uma revisão acerca das origens deste ramo da genética e sua aplicação no estudo dos aleloquímicos produzidos pelas plantas, especialmente aquelas utilizadas pelos seres humanos como fonte de alimento e remédio.

2 | O HISTÓRICO DA GENÉTICA TOXICOLÓGICA

A exposição a agentes potencialmente danosos ao organismo é uma condição inerente aos seres vivos desde o advento da vida no planeta Terra; contudo, o desenvolvimento tecnológico, especialmente a partir da Revolução Industrial, contribuiu exacerbadamente para elevar tanto a quantidade dessas substâncias quanto a possibilidade de exposição (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Segundo Bagatini, Silva e Tedesco, (2007), tais agentes, cuja origem pode ser química, física ou biológica, induzem modificações tanto ao nível celular quanto molecular, afetando processos vitais como a duplicação e transcrição gênica, bem como causando alterações cromossômicas; essas alterações podem aumentar e/ou acelerar o aparecimento de mutações, além de levar à morte celular (CARVALHO, 2004; ALMEIDA NETO et al., 2005; SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013; SILVA et al., 2014).

Desde o antigo Egito já havia registros sobre substâncias que poderiam causar malefícios à saúde humana; na Grécia, Hipócrates, considerado por muitos como o criador da medicina moderna, descreveu instruções detalhadas sobre a ação de vários compostos tóxicos aos seres humanos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A detecção e compreensão dos mecanismos de ação de tais substâncias potencialmente citotóxicas e genotóxicas, bem como a investigação de seus efeitos sobre os organismos, é campo de atuação da Genética Toxicológica (FONSECA; PEREIRA, 2004), cujos primórdios remontam à Europa do início de 1900. Conforme Wasson e outros (2010), a redescoberta do trabalho de Mendel levou ao rápido desenvolvimento da Genética e com ela o interesse pela forma como fatores externos são capazes de afetar os processos gênicos, selecionados evolutivamente para serem precisos e corrigir suas próprias falhas. Todavia, são os trabalhos de Herman Joseph Muller (1927) e de Auerbach et al. (1947) que são considerados o marco oficial do início da Genética Toxicológica, uma vez que ambos – ao trabalharem com a indução de mutações em células de *Drosophila* sp. - “[...] destacaram o conceito de mutação e empreenderam esforços na análise de como e por que agentes (físicos, químicos ou biológicos) induzem mudanças genéticas [...]” (WASSON et al, 2010, tradução nossa).

Ainda no início do século XX, o botânico De Vries, em sua obra “*A teoria da mutação*”, já advertia para a possibilidade de que, ao se aclarar os princípios que levavam à falha nos mecanismos de reparo, poder-se-ia “planejar” mutações a fim de obter características desejáveis. Para ele,

[...] novas espécies ou variedades poderiam se formar em um único passo (com saltos) a partir da espécie parental que continuaria existindo sem modificar-se durante o processo. A essas novas espécies ou variedades ele chamou de “mutantes” (MARTINS; BRITO, 2006).

No decorrer dos trinta primeiros anos do século XX, diversas descobertas na área da Genética e o trabalho de Muller comprovando os efeitos da radiação na mutagênese levantaram questões acerca da indução artificial de mutações, bem como sobre a possibilidade de químicos como álcool, morfina, amônia e diversos metais alterarem o material genético; para Auerbach e colaboradores (apud WASSON et al., 2010)

Se, como desconfiamos, a mutação é um processo químico, então o conhecimento dos reagentes capazes de iniciar esses processos poderá trazer luz a não somente a reação em si, mas também sobre a natureza do gene, outro parceiro na reação (tradução nossa).

Na década de 1950, Barthelme publicou um artigo sobre as substâncias químicas utilizadas na medicina com efeitos comprovadamente citogenéticos; diversas pesquisas foram ao encontro desse artigo durante os anos 1960 e começou-se a prática de realizar ensaios mutagênicos antes da liberação para venda de qualquer droga.

Muller [foi um dos que] expressou preocupação de que humanos estivessem sendo expostos a um grande número de substâncias (como aditivos alimentares, drogas, narcóticos, antibióticos, pesticidas, cosméticos, contraceptivos, poluentes do ar e da água) não encontradas nas gerações anteriores e para as quais os indivíduos expostos não tinham sido especificamente adaptados pela seleção natural (WASSON et al., 2010, tradução nossa).

A obra de Rachel Carlson intitulada Primavera Silenciosa, em 1962, a qual documentava o efeito de agrotóxicos sobre aves deu força ao estudo da Toxicologia Ambiental (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013) e com o lançamento do periódico Mutation Research, em 1964, a Mutagênese Ambiental alcançou, de fato, relevância na comunidade acadêmica, resultando na criação das Sociedades Americana e Europeia de Mutagênese em 1969 e 1970, respectivamente (RIBEIRO et al., 2003).

Em 1970, as pesquisas de Ames e McCann apontaram para fortes semelhanças entre o processo de mutagenicidade em *Salmonella* sp. com a carcinogênese em humanos (MACGREGOR; CASCIANO; MULLER, 2000); segundo Wasson e outros (2010), o teste com *Salmonella* gerou, à época, imenso entusiasmo pela possibilidade de utilizar testes de baixo custo na identificação e controle de exposição de químicos carcinogênicos e até hoje é um dos testes mais empregados na área da Mutagênese Ambiental.

Em 1980, diversos países incluíram a mutagenicidade entre a bateria de testes

a serem realizados antes da liberação de novas substâncias no mercado (RIBEIRO et al., 2003). Os avanços ocorridos no final daquele século, como o sequenciamento genômico de seres vivos e novas tecnologias empregadas na ciência, ampliou as possibilidades de pesquisa no campo da mutagênese, tornando-a uma das áreas mais promissoras da genética na atualidade.

3.1 A APLICAÇÃO DA GENÉTICA TOXICOLÓGICA NO ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS

Embora a maior aplicação da genética toxicológica seja na área ambiental e nos estudos de impactos ecológicos de substâncias tóxicas, é cada vez mais crescente sua utilização como ferramenta para a investigação de fitoquímicos, especialmente aqueles produzidos por plantas com uso consagrado na medicina popular.

Para a liberação de novos fármacos no mercado, diversos países, incluindo o Brasil, exigem que sejam efetuados testes de toxicidade; embora esta regra não inclua obrigatoriamente os fitofármacos, cada vez mais pesquisadores estão investigando os possíveis efeitos adversos desses aleloquímicos sobre organismos-teste.

É fundamental saber se estas substâncias originárias das plantas irão causar algum efeito direto ou indireto no material genético, levando à mutações, pois, caso estas sejam transmitidas aos descendentes, poderão afetar as gerações seguintes (FONSECA; PEREIRA, 2004).

Os testes mais empregados para o estudo da mutagenicidade são aqueles feitos com microorganismos (Teste de Ames), utilizando células de medula óssea de mamíferos *in vitro* ou *in vivo* e organismos-teste vegetais (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Destes, o bioensaio realizado com raízes de *Allium cepa* L. é o mais utilizado.

3.1 O Bioensaio *Allium cepa* como Ferramenta para Avaliação Mutagênica

Para a real efetividade dos biotestes, é fundamental que o organismo escolhido como bioindicador seja fenotipicamente mais sensível a lesões no material genético, expressando em um curto espaço de tempo, portanto, respostas a qualquer alteração externa a que são submetidos (VIEIRA; DANTAS, 2015); além disso, deve ser capaz de detectar os agentes tóxicos em mais de um ambiente, bem como permitir a verificação de diversas classes de danos em suas células. Desta forma, os bioindicadores são ferramentas importantes nos estudos ambientais uma vez que, segundo Arraes e Longhin (2012), fornecem respostas mais precisas e rápidas sobre o cenário ao qual se encontra o ecossistema estudado.

Além das características supracitadas, para um organismo ser um indicador biológico ideal, ele precisa

[...] ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível pela sociedade

comum; possuir distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; ter baixa variabilidade genética e ecológica; [...]; ter curto ciclo de vida; dispor de características ecológicas bem conhecidas e poder ser usado em estudos laboratoriais (JOHSON et al. apud ARRAES; LONGHIN, 2012).

Para Leme e Marin-Morales (2009), de acordo com o sistema empregado e a característica genética observada, podem-se dividir os sistemas-teste em dois grupos: bioensaios com procariotos, no qual se identificam injúrias primárias ao DNA, e bioensaios com eucariotos, que permitem a análise de grandes danos, que variam de mutações gênicas a lesões cromossômicas e aneuploidias.

Dentre os sistemas que utilizam organismos eucariotos, os vegetais superiores constituem um importante modelo para identificação de substâncias tóxicas, uma vez que os resultados obtidos são suficientes para alertar quanto aos riscos a outros sistemas biológicos, haja vista a universalidade do código genético, alvo dessas substâncias (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; FIRBAS; AMON, 2013). De fato, a correlação de biotestes vegetais com outros sistemas, incluindo mamíferos, é superior a 80% (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; ARRAES; LONGHIN, 2012; TEDESCO et al., 2015), fazendo com que seu uso se fortaleça em meio à comunidade científica como forma eficaz de avaliação da genotoxicidade e - especialmente - das aberrações mitóticas em eucariontes (POHREN; COSTA; VARGAS, 2013).

Para Leme e Marin-Morales (2009), Mohammed (2010) e Felicidade e colaboradores (2014), as plantas se destacam não somente quanto à sensibilidade a substâncias genotóxicas, mas também ao potencial para manifestar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em células de diferentes tecidos. Ademais,

As razões para usar sistemas vegetais são muitas: Plantas são fáceis de armazenar, geralmente os cromossomos estão em boas condições, baixo custo e, o mais importante, possuem uma boa correlação para outros sistemas-teste (FISKESJÖ, 1985, tradução nossa).

Conforme Fiskesjo (apud TEDESCO et al., 2015), apesar dos organismos de plantas e animais apresentarem particularidades, os princípios metabólicos são similares, justificando a extrapolação dos resultados para animais e humanos. Além disso, a presença de enzimas oxidase no metabolismo vegetal permite que eles ativem os pró-mutágenos em mutágenos sem necessitar da adição dessas enzimas ao meio, como ocorre nos testes com bactérias (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Dentre os vegetais superiores, o bioteste *Allium cepa* (cebola), introduzido em 1949 por Levan, é um dos testes *in vivo* mais empregados na avaliação do potencial citotóxico e genotóxico/mutagênico de metabólitos secundários vegetais em suas diversas concentrações e em diferentes tempos de exposição (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012); devido ao baixo número cromossômico

($2n = 16$), rápido ciclo celular, fácil manipulação, alta sensibilidade à grande variedade de substâncias e excelente correlação com outros bioensaios, este sistema-teste permite a detecção de danos tanto em parâmetros macroscópicos, por alterações na cor, tamanho e morfologia das raízes, quanto microscópicos, por meio de alterações durante o processo mitótico (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MOHAMMED, 2010; ARRAES; LONGHIN, 2012). Além disso, anomalias cromossômicas espontâneas são extremamente raras nesta espécie, tornando-o confiável para associar os danos ocorridos ao efeito da substância testada (FIRBAS; AMON, 2013).

Também conhecido como teste de avaliação de alterações cromossômicas, o bioensaio *Allium cepa* é mundialmente reconhecido pela comunidade científica como eficaz para análise de genotoxicidade, tendo seu emprego validado pelo Programa Internacional de Segurança Química da Organização Mundial da Saúde (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas - UNEP (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; FIRBAS; AMON, 2013; TEDESCO et al., 2015). Constitui, segundo Charoenying, Teerarak e Laosinwattana (2010), um dos melhores modelos biológicos para avaliação de danos em cromossomos e distúrbios ocorridos no ciclo celular por químicos que penetraram na célula durante o processo, além de permitir a determinação do mecanismo pelo qual essa interferência ocorre.

Em comparação a outros vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* tem demonstrado maior sensibilidade a substâncias tóxicas (ARRAES; LONGHIN, 2012) e, diferentemente de outros testes, seu emprego permite a avaliação simultânea e comparada de diversos parâmetros, como germinação, tamanho e morfologia radicular, células mortas e aberrantes e índice mitótico (PATNAIK; ACHARY; PANDA, 2013; AHMED, 2014).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista o crescente número de substâncias a qual estamos expostos, sejam de origem orgânica ou sintética, é primordial que hajam estudos concernentes aos seus riscos à espécie humana e ao ambiente. Somos diretamente dependentes das plantas para nossa sobrevivência, seja como fonte alimentar ou medicamentosa, reforçando a necessidade de pesquisas com foco nos efeitos benéficos e maléficos dos fitoquímicos; neste sentido, o bioteste do *A. cepa* é uma ferramenta importantíssima em um país com poucos recursos financeiros dedicados às pesquisas científicas, pois, além de ser barato e de fácil execução, produz resultados confiáveis.

REFERÊNCIAS

AHMED, F.A.W. Cytotoxic and genotoxic potency screening of WIDE-SPEC pesticide on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 4, n. 24, 2014.

- ALMEIDA NETO, J. X. de et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) in vivo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.5, n.2, 2005.
- ARRAES, A.I.O.M; LONGHIN, S.R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14; p. 1958-1972, 2012.
- BAGATINI, M.D; SILVA, A.C.F; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- CARITÁ, R; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.
- CARVALHO, J. E. de. **Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde**. 2004. Disponível em: <www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.
- CHAROENYING, P; TEERARAK, M; LAOSINWATTANA, C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 411-416, 2010. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/scihorti>. Acesso em: 02 mar. 2016.
- FELICIDADE, I. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genet. Mol. Res.**, v. 13, n. 4, p. 9986-9996, 2014.
- FIRBAS, P; AMON, T. *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with constructed wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **J Bioremed Biodeg**, v. 4, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000189>>. Acesso em: 08 mai. 2016.
- FISKEJO, G. The *Allium cepa* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas (Lund)**, v.102, p. 99-112, 1985.
- FONSECA, C.A; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, nº 7-8, p. 51-54, 2004.
- LEME, D.M; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat. Res.**, v. 682, p. 71–81, 2009.
- MACGREGOR, J.T; CASCIANO, D; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 3-20, 2000.
- MARTINS, L.A.P.; BRITO, A.P.O.P.M. A história da ciência e o ensino da genética e evolução no nível médio: um estudo de caso. **Estudos de história e filosofia das ciências: subsídios para aplicação no ensino**. São Paulo: Editora Livraria da Física , 2006.
- MOHAMMED, A.A.S. Cytotoxicity and genotoxicity potential of Thiocyclam in root-tip cells of *Allium cepa*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 601-608, 2010.
- PATNAIK, A.R; ACHARY, V.M.M; PANDA, B.B. Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. **Plant Growth Regul**, v. 71, p. 157-170, 2013.
- POHREN, R.S; COSTA, T.C; VARGAS, V.M.F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, 2013.

RIBEIRO, L.R., et al. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

SILVA, C.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothain B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. **Mutat. Res.**, v. 767, p. 8–12, 2014.

SISINNO, C.L.S; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

TEDESCO, S.B. et al. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on the *Allium cepa* L. test system. **Biosci. J.**, v. 31, n. 4, p. 1213-1221, 2015.

TEDESCO, S.B; LAUGHINGHOUSE, H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J. (Ed.). **Environmental Contamination**. InTech, 2012. p. 137-156. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicitythe-allium-cepa-test>>. Acesso em. 19 set: 2015.

VIEIRA, F.S; DANTAS, M.A.T. O protista foraminífero, bioindicador ambiental: uma abordagem para o ensino de ciências e biologia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 8, n. 2, p. 267-282, 2015.

WASSOM, J.S. et al. Reflections on the origins and evolution of genetic toxicology and the environmental Mutagen Society. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 51, p. 746-760, 2010.

ANÁLISES GENÉTICAS NÃO INVASIVAS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE FELINOS BRASILEIROS

Andiara Silos Moraes de Castro Souza

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar,
Departamento de Genética e Evolução, São
Carlos, SP.

Bruno Henrique Saranholi

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar,
Departamento de Genética e Evolução, São
Carlos, SP.

Pedro Manoel Galetti Jr

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar,
Departamento de Genética e Evolução, São
Carlos, SP.

RESUMO: O estudo genético de animais de difícil acesso, com hábitos elusivos e noturnos tem sido facilitado por meio das análises genéticas não invasivas, por exemplo, utilizando fezes obtidas no campo. Este tipo de amostra se torna ainda mais importante quando se trabalha com animais ameaçados, permitindo obter dados populacionais de demografia, razão sexual, parentesco, diversidade genética, diferenciação populacional e fluxo gênico. Muitos felinos se encontram atualmente ameaçados ou vulneráveis, principalmente devido à fragmentação e redução de habitats. Populações isoladas diminuem o fluxo gênico com outras populações e podem aumentar a taxa de deriva genética e endogamia, podendo a longo prazo serem extintas no ambiente natural.

Por isso, técnicas de amostragem não invasiva de felinos estão sendo cada vez mais utilizadas, com o intuito de detectar dados populacionais que possam ajudar na conservação destas espécies. Este capítulo apresenta aspectos básicos da Genética da Conservação e um levantamento de estudos de casos em felinos brasileiros, que usaram amostragem não invasiva para obter informações fundamentais sobre a ecologia, biologia e genética, como subsídio para a conservação e preservação em longo prazo desses animais.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores moleculares, Felidae, gatos, fezes.

ABSTRACT: Genetic studies of animals with elusive and nocturnal habits has been facilitated through noninvasive genetic analyses using, for instance, feces obtained in the field. This type of sample becomes even more important when working with endangered animals, allowing us to obtain population data from demographics, sex ratio, kinship, genetic diversity, population differentiation and gene flow. Many cats are currently threatened or vulnerable, mainly due to the fragmentation and reduction of habitats. Isolated populations decrease gene flow with other populations, increase the rate of genetic drift and inbreeding, and may in a longer term be extinct in the natural environment. Therefore, noninvasive cat sampling techniques are being

increasingly used, in order to record population data that may help in the conservation of these animals. This chapter presents basic aspects of Conservation Genetics and a survey of case studies in Brazilian felids, which used noninvasive sampling to obtain fundamental information on ecology, biology and genetics, as a subsidy for the long-term conservation and preservation of these animals.

KEYWORDS: Molecular markers, Felidae, cats, feces.

1 | INTRODUÇÃO

Neste capítulo iremos apresentar as bases de uma nova disciplina da área da genética, denominada Genética da Conservação, bem como iremos destacar o papel dos estudos genéticos realizados por meio de amostragem não invasiva, para o conhecimento da ecologia, biologia e genética e, conseqüente, conservação dos felinos brasileiros.

Com principal objetivo de conservação da biodiversidade no nível dos genes (MCNEELY, 1990; FRANKHAM, 2009), a Genética da Conservação alia a teoria e os métodos genéticos para entender as conseqüências sobre a diversidade genética em relação às ameaças que sofrem as espécies em risco de extinção, ajudando na elaboração de medidas para a sua conservação (FRANKHAM, 2009). Dessa maneira, essa disciplina tem como foco as espécies ameaçadas e busca identificar os sinais genéticos promovidos pelas pressões, particularmente as antrópicas, que elevam o risco de extinção, e auxiliar nas medidas de conservação.

Neste contexto, abordaremos o uso da análise genética não invasiva em estudos dos animais de difícil acesso aos pesquisadores, destacando os estudos realizados em felinos no Brasil, tendo como material fonte de DNA, amostras não invasivas como fezes, pelos e regurgito, evitando assim a captura do animal.

2 | A ABORDAGEM NÃO INVASIVA EM ESTUDOS DE GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A metodologia de amostragem não invasiva é empregada sobretudo em animais de difícil captura, como os que apresentam grandes áreas de vida, baixa densidade, atividade noturna e hábitos elusivos. Animais com as características mencionadas e ainda em risco de extinção são ainda mais favorecidos com este tipo de amostragem, evitando o estresse para o animal e o risco de sua perda durante o manejo (STANTON, 2016; VELLI, 2015; WALKER, 2016; WHEAT, 2016).

Entre os principais grupos estudados através dessa abordagem, destacam-se as espécies de mamíferos carnívoros terrestres, como os canídeos e os felinos. Dentre as amostras não invasivas mais utilizadas para esses grupos, destacam-se as fezes (RODGERS, 2013), por serem recobertas pelo muco do intestino do animal, permitindo

a obtenção de moléculas de DNA para os estudos genéticos (ALBAUGH, 1992), além da relativa facilidade de coleta. Isso se deve ao fato de as espécies de carnívoros possuírem, geralmente, hábitos territorialistas e frequentemente depositarem suas fezes em locais proeminentes, como trilhas e rochas, para marcarem seu território (CHAME, 2003; DAVISON, 2002).

O uso das amostras não invasivas em conjunto com técnicas moleculares tem permitido a obtenção de informações muito ricas, como a identificação molecular da espécie depositora das fezes (CHAVES, 2012; FARREL, 2000; RODRÍGUEZ-CASTRO, 2018; SOUZA, 2017). Também é possível realizar a individualização e a sexagem das amostras, permitindo avaliar questões como a distribuição dos indivíduos, área de vida, tamanho mínimo populacional e densidade (DEAGLE, 2007; HEDMARK, 2004; LIVIA, 2007; MIOTTO, 2014; SOUZA, 2012, 2013). Estudos prévios de demografia, por exemplo, confirmaram a similaridade entre os resultados obtidos por meio de amostras não invasivas e aqueles encontrados a partir de câmeras fotográficas (BELLEMAIN, 2005), bem como de radiotelemetria para estimar padrões de movimentação (ROQUES, 2014). Além das análises citadas, também podem ser respondidas questões de genética populacional, como avaliar a diversidade genética, estruturação populacional, fluxo gênico e parentesco (MIOTTO, 2012; SARANHOLI, 2017; HAAG, 2010b).

Apesar das vantagens indicadas, o uso das amostras não invasivas é, geralmente, limitado pela baixa qualidade e quantidade de DNA obtido (TABERLET, 1999). Exposto à altas temperaturas e umidade do ambiente, o DNA obtido das fezes apresenta elevada degradação (FARREL, 2000), principalmente nos ambientes tropicais (MICHALSKI, 2011; ROQUES, 2014). Além disso, este tipo de amostra pode apresentar inibidores de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), que é a metodologia empregada para amplificar cópias do fragmento específico de DNA para posterior análise. Esses inibidores podem dificultar as amplificações e aumentar a chance de se obter resultados errôneos. Por isso, devem ser incluídos uma série de cuidados e etapas (Figura 1), com o intuito de minimizar os erros e aumentar as chances de amplificação do DNA fecal (BUCHAN, 2005; HOFFMAN, 2005; PIGGOT, 2004).

O primeiro cuidado consiste na detecção e coleta de amostras mais frescas possíveis, para minimizar a exposição do DNA ao ambiente, que poderia degradá-lo. O uso de kits comerciais para a extração do ácido nucleico tem facilitado a obtenção de DNA em qualidade satisfatória para estudo. No processo de amplificação, é importante realizar réplicas de PCRs, possibilitando que alguma falha de amplificação devido à baixa qualidade do DNA possa ser corrigida e, assim, evitando interpretações errôneas dos resultados (TABERLET, 1999).

Outro passo decisivo é a seleção dos marcadores moleculares que serão utilizados nos estudos; estes precisam ser informativos, mesmo em pequenos fragmentos de DNA amplificados, já que o DNA fecal se apresenta degradado.

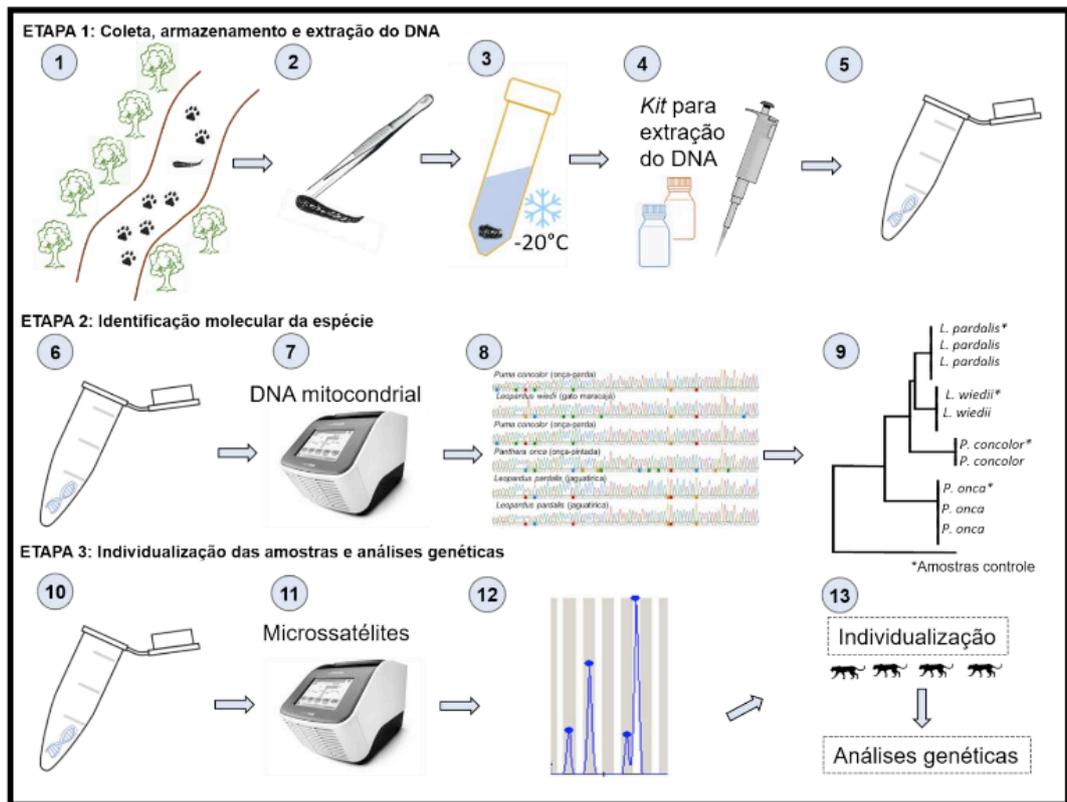


Figura 1. Etapas do processo de coleta e análises genéticas a partir de amostras não invasivas, como no caso das fezes.

ETAPA 1: **1** - Busca ativa de amostras fecais, geralmente em trilhas e estradas de terra. A presença de alguns sinais deixados pelos animais, como pegadas, pode facilitar a procura das amostras; **2** – Coleta de um porção da amostra utilizando material estéril; **3** – Armazenamento em tubos estéreis contendo solução para a conservação, como por exemplo o etanol, e acondicionamento em freezer até a extração do DNA; **4** – Extração do DNA usando kits comerciais específicos para amostras fecais, que extraem os inibidores de PCR; **5** – Obtenção do DNA que será utilizado nas etapas seguintes.

ETAPA 2: **6** – DNA obtido na primeira etapa; **7** - Amplificação em PCR de mini sequências do DNA mitocondrial para a identificação molecular das amostras; **8** – Sequenciamento dos produtos de PCR de regiões mitocondriais. Na figura é possível ver as regiões variáveis (sítios polimórficos) entre as espécies; **9** – Construção de árvores filogenéticas com as sequências obtidas e sequências controles, ou seja, sequências obtidas a partir de amostras das quais se tinha a espécie confirmada (marcadas com asterisco). Essa etapa auxilia e facilita o processo de identificação das espécies, principalmente quando se trabalha com muitas amostras.

ETAPA 3: **10** – DNA obtido na primeira etapa; **11** - Amplificação em PCR dos microsatélites; **12** – Resultado da genotipagem dos microsatélites, fornecendo os alelos e os genótipos para cada amostra; **13** – Após a obtenção dos genótipos, é possível individualizar as amostras coletadas e, em seguida, proceder com as análises genéticas (diversidade genética, parentesco, fluxo gênico etc.).

3 | MARCADORES MOLECULARES E ESTUDOS COM AMOSTRAS NÃO INVASIVAS

Um marcador molecular é qualquer caráter molecular que apresenta um certo grau de polimorfismo, ou seja, de variação entre organismos estudados (TURCHETTO-ZOLET, 2017). Entre os marcadores moleculares mais amplamente utilizados em estudos genéticos a partir de amostras não invasivas, destacam-se os microssatélites no genoma nuclear e porções dos genes do DNA mitocondrial (BEJA-PEREIRA, 2009; BROQUET, 2007), pois geram informações mesmo a partir de pequenas sequências de DNA.

O DNA mitocondrial consiste em uma molécula haploide circular (15-17kb) presente nas mitocôndrias, que é predominantemente transmitido por herança materna (PALMER, 1987). Devido à sua alta taxa de evolução, comparada aos genes nucleares, e consequente alto polimorfismo, além da ausência de recombinação, este marcador pode ser empregado tanto para estudos filogenéticos, bem como populacionais (AVISE, 2004). Nos estudos genéticos baseados em amostras de fezes, o primeiro passo é a identificação da espécie depositora das fezes e, para isso, o DNA mitocondrial tem se mostrado uma excelente ferramenta. Diversos trabalhos desenvolveram os chamados *mini-barcodes*, ou seja, pequenas sequências de DNA capazes de identificar a espécie a partir deste marcador (ADRADOS, 2018; CHAVES, 2012; FARRELL, 2000; HAAG, 2009; RODRÍGUEZ-CASTRO, 2018). O seu emprego tem permitido a confirmação de ocorrência de espécies elusivas em áreas onde as mesmas não eram mais registradas através de outros métodos de detecção (SOUZA, 2017).

Já os microssatélites permitem a individualização das amostras não invasivas (GOLDSTEIN, 1997). Considerados locos hipervariáveis do genoma nuclear, os microssatélites são muito empregados em estudos populacionais (MANEL, 2003) e permitem estimar diversos parâmetros como a diversidade genética, fluxo gênico, estruturação populacional e parentesco (GOTTELLI, 2007; NESJE, 2000). Essas análises são possíveis devido às suas características de alta taxa de polimorfismo, padrão de herança do tipo codominante, além de frequentemente ser seletivamente neutro (SELKOE, 2006). Microssatélites consistem em pequenas partes de DNA (1-6pb), repetidas em série, com distribuição por todo o genoma (TAUTZ, 1989), sendo encontrados, geralmente, em regiões não codificantes (GOLDSTEIN, 1999). Seus produtos de amplificação pela PCR são pequenos, possibilitando que sejam perfeitamente empregados em amostras com DNA fragmentado, como as não invasivas (BEJA-PEREIRA, 2009). Todas estas características têm feito dos microssatélites uma fantástica ferramenta para estudos de genética populacional em carnívoros, a partir do DNA obtido de fezes (DUTTA, 2013; HAAG, 2010b; MIOTTOa, 2007; PALOMARES, 2002, 2017; SOUZA, 2017; SARANHOLI, 2017; SRBEK-ARAUJO, 2018).

4 | COMBINANDO A AMOSTRAGEM NÃO INVASIVA E TÉCNICAS MOLECULARES PARA ESTUDOS DE GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO EM ESPÉCIES DE FELINOS BRASILEIROS

A família Felidae inclui espécies predominantemente carnívoras com amplas variações em seus tamanhos corpóreos, na distribuição geográfica, nas áreas de vida e densidades populacionais (OLIVEIRA, 2005; SUNQUIST, 2002; ZELLER, 2007). Nas Américas, podem ser encontradas 13 espécies de felinos. No Brasil, foram detectadas nove espécies: gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-do-mato-pequeno do nordeste (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno do sul (*Leopardus guttulus*), onça-pintada (*Panthera onca*), onça-parda (*Puma concolor*) e jaguarundi (*Puma yagouaroundi*).

A fragmentação e a perda de habitat representam uma grande ameaça para essas espécies (RIPPLE, 2014) e podem afetar principalmente o deslocamento, resultando em alterações em suas áreas de vida (WEBER, 1996), o conflito com os seres humanos (CONFORTI, 2003) e modificando seus padrões de reprodução (EIZIRIK, 2008). A fragmentação também contribui significativamente para a redução da diversidade genética das espécies, pois pode promover o isolamento de suas populações (FRANKHAM, 2002). Pequenas populações isoladas tendem a apresentar uma redução na variação genética, promovida por efeitos da deriva genética, definida como flutuação ao acaso das frequências alélicas entre gerações, além do aumento na taxa de endogamia, isto é, o cruzamento entre parentes (FRANKHAM, 2002; SPIELMAN, 2004). Com a intensificação destes processos, alelos deletérios podem se tornar fixados, comprometendo o potencial adaptativo das populações (LEHMAN, 2006), que apresentam uma menor produção e viabilidade dos espermatozoides, diminuição da habilidade de acasalamento e reduzida fecundidade das fêmeas e sobrevivência juvenil (FRANKHAM, 2002). Com o potencial adaptativo dos indivíduos reduzido, a probabilidade de extinção da população ou da espécie é ampliada (DUTTA, 2013; FRANKHAM, 2002; RIPPLE, 2014; SCHIPPER, 2008).

Inúmeras espécies de felinos se encontram ameaçadas de extinção, primordialmente pela redução e fragmentação dos habitats e a retaliação por caça (RIPPLE, 2014; DE AZEVEDO, 2013). A onça-pintada, o maior felino das Américas, é atualmente considerada “quase ameaçada” (*near threatened*) segundo a União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2018). Este felino pode inclusive ser o primeiro grande predador a desaparecer no bioma Mata Atlântica (GALETTI, 2013; PAVIOLO, 2016). Estudos populacionais já demonstraram que algumas de suas populações encontram-se geneticamente isoladas (HAAG, 2010b; SRBEK-ARAUJO, 2018). Considerando que a Mata Atlântica conta atualmente com apenas 16% da

cobertura vegetal original, com a maior parte dos remanescentes fragmentados em áreas menores de 50 ha (RIBEIRO, 2009), o risco de extinção dos animais que habitam esse bioma é alarmante.

No Brasil, diferentes estudos em felinos conduzidos pela combinação da análise genética e a amostragem não invasiva têm focado seus objetivos em diversos aspectos da biologia, ecologia e genética de nossas espécies (Tabela 1).

Para aprimorar a identificação das espécies de carnívoros, a partir de amostras de fezes, recentemente, Rodríguez-Castro e colaboradores (2018) desenvolveram um conjunto de *primers* para amplificar regiões informativas em três diferentes genes do DNA mitocondrial de felinos (Figura 2).

Referência	Espécie focal	Objetivo	Tipo de amostra	Marcador molecular
Alberts, 2017	Felinos brasileiros	Comparação entre métodos de identificação molecular e tricologia	Fezes e pelos	Mitocondrial
Adrados, 2018	<i>Leopardus pardalis</i> e <i>Leopardus wiedii</i>	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial
Chaves, 2012	Felinos brasileiros, além de espécies de carnívoros	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial
De Barba, 2014	<i>Puma concolor</i> e outras espécies de carnívoros	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial
Farrel, 2000	<i>Puma concolor</i> e <i>Leopardus pardalis</i>	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial
Haag, 2009	<i>Panthera onca</i> e <i>Puma concolor</i>	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial

Haag, 2010a	<i>Panthera onca</i>	Desenvolvimento de primers para identificação molecular de indivíduos melânicos de <i>P. onca</i> a partir de amostras não-invasivas	Fezes	Gene MCR1
Haag, 2010b	<i>Panthera onca</i>	Diversidade genética e estruturação genética populacional	Fezes	Mitocondrial e microsatélites
Miotto, 2007a	<i>Puma concolor</i>	Determinação do tamanho populacional mínimo	Fezes	Mitocondrial e microsatélites
Miotto, 2007b	<i>Puma concolor</i> , <i>Puma yagouaroundi</i> e <i>Leopardus pardalis</i>	Comparação entre métodos de identificação molecular e tricologia	Fezes e pelos	Mitocondrial
Miotto, 2011	<i>Puma concolor</i>	Diversidade genética e estruturação genética populacional	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina (sexagem)
Miotto, 2012	<i>Puma concolor</i>	Monitoramento populacional (detecção do número de indivíduos) e parentesco	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina (sexagem)
Miotto, 2014	<i>Puma concolor</i>	Estimativas demográficas (abundância)	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina (sexagem)
Palomares, 2012	<i>Panthera onca</i>	Identificação molecular do sexo das amostras	Fezes	Mitocondrial e amelogenina (sexagem)
Palomares, 2016	<i>Panthera onca</i> e <i>Puma concolor</i>	Identificação molecular de amostras para estudos ecológicos (segregação de habitat)	Fezes	Mitocondrial
Palomares, 2017	<i>Panthera onca</i> e <i>Puma concolor</i>	Ecologia espacial e parentesco	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina (sexagem)
Palomares, 2018	<i>Panthera onca</i> e <i>Puma concolor</i>	Confirmação molecular de amostras para estudos ecológicos (comportamento de <i>scraping</i>)	Fezes	Mitocondrial
Rodríguez-Castro, 2018	Felinos brasileiros, além de espécies de canídeos	Desenvolvimento de primers para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial

Roques, 2011	Felinos brasileiros	Desenvolvimento de <i>primers</i> para amplificação de mini sequências para confirmação molecular de amostras não invasivas	Fezes	Mitocondrial
Roques, 2014	<i>Panthera onca</i>	Diversidade genética	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina
Roques, 2016	<i>Panthera onca</i>	Diversidade genética e estruturação genética populacional	Fezes	Mitocondrial e microsatélites
Saranholi, 2017	<i>Puma concolor</i>	Diversidade genética e estruturação genética populacional	Fezes	Mitocondrial e microsatélites
Sollmann, 2013a	<i>Panthera onca</i>	Identificação molecular de amostras para estudos ecológicos (estimativa de densidade)	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina
Sollmann, 2013b	<i>Panthera onca</i>	identificação molecular de amostras para estudos ecológicos (dieta)	Fezes	Mitocondrial
Souza, 2017	<i>Panthera onca</i>	Confirmação molecular de amostras para registros de ocorrência e identificação do número de indivíduos e sexagem molecular	Fezes	Mitocondrial, microsatélites e amelogenina (sexagem)
Srbek-Araujo, 2018	<i>Panthera onca</i>	Diversidade genética e estruturação genética populacional	Fezes	Mitocondrial e microsatélites

Tabela 1. Estudos de genética não invasiva com espécies de felinos brasileiros.

Utilizando sequências *mini-barcodes* similares às descritas na tabela 2, Souza e colaboradores (2017) conseguiram demonstrar a presença da onça-pintada em uma área onde a mesma não vinha sendo mais registrada por métodos tradicionais de observação. Além da confirmação molecular da espécie a partir de amostras fecais, os autores constataram a ocorrência de, pelo menos, três indivíduos naquela área, sendo duas fêmeas e um macho. Considerando o grau de ameaça dessa espécie, esses resultados podem ser muito úteis para a proposição de medidas de conservação, ressaltando a importância dessa área específica para a conservação da espécie.

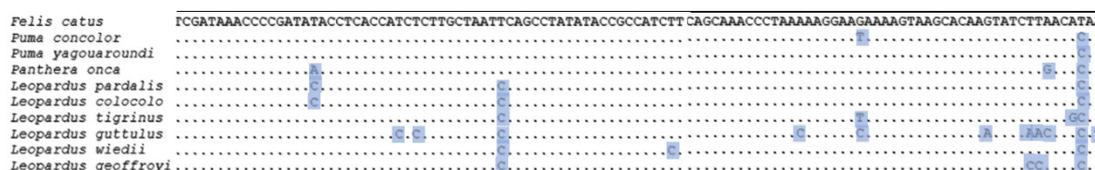


Figura 2. Destaque para os sítios polimórficos permitindo a diferenciação entre as espécies de

Em um dos primeiros trabalhos com amostragem não invasiva realizados com espécies de carnívoros no Brasil, Miotto e colaboradores (2007a) relataram o tamanho populacional mínimo das onças-pardas em unidades de conservação no interior do estado de São Paulo. Nove indivíduos de onças-pardas foram molecularmente identificados, caracterizando uma das primeiras estimativas demográficas para a espécie no Brasil. A partir da adição de novos dados, foi possível estimar a abundância (MIOTTO, 2014), a razão sexual e distribuição da espécie na área de estudo (MIOTTO, 2012), gerando informações complementares que permitiram uma maior compreensão sobre a ecologia da espécie.

Estimativas da diversidade genética das onças-pardas dessas mesmas unidades de conservação encontraram valores altos de diversidade, embora também tenham sido verificados sinais de redução demográfica recente, possivelmente devido à redução de seu habitat (MIOTTO, 2011). Embora os autores prévios não tenham verificado a ocorrência de estruturação populacional entre as áreas estudadas, em um estudo posterior, Saranholi e colaboradores (2017) verificaram sinais de restrição de fluxo gênico entre populações de onças-pardas que habitam unidades de conservação em lados opostos do rio Tietê (SP). Segundo os autores, além da área de estudo ser altamente modificada pela presença de rodovias e centros urbanos, o represamento de extensas áreas do rio, alargando significativamente o corpo de água, criam barreiras que podem estar dificultando a movimentação desses felinos e restringindo o fluxo gênico.

Dados como esses demonstram o impacto das atividades antrópicas sobre as populações animais no ambiente natural, podendo trazer prejuízos irreversíveis para a persistência das espécies a longo prazo. Mesmo espécies com maior capacidade de ocupar diferentes biomas e maior plasticidade para enfrentar as modificações de habitats, como a onça-parda, já apresentam indícios de redução na movimentação e, conseqüente, redução do fluxo gênico. Se esta tendência persiste, populações se tornarão isoladas e pequenas, sujeitas a efeitos extremos de deriva genética e endocruzamento, aumentando significativamente o seu risco de extinção.

5 | CONCLUSÃO

A amostragem não invasiva em conjunto com técnicas moleculares possui um grande potencial para responder questões ecológicas e genéticas para as espécies de difícil acesso aos pesquisadores, favorecendo o nosso conhecimento sobre elas, bem como medidas para sua conservação.

No Brasil, entretanto, esses estudos ainda são limitados a poucas espécies e a determinadas áreas de sua distribuição. Há muito mais ainda por fazer. Até o momento,

a maior parte de nossos estudos com este tipo de abordagem está concentrada na espécie onça-parda, e na onça-pintada, em segundo lugar. Entretanto, ambas as espécies ocupam extensas áreas em nosso território e a condição dessas populações ainda é desconhecida.

O crescimento exacerbado das atividades humanas por meio da agricultura, pecuária, rodovias e centros urbanos, além da poluição, caça e dos atropelamentos dos animais que se movimentam, cria um cenário potencialmente prejudicial para a persistência das espécies, como os felinos.

Dessa forma, é imperioso a intensificação de nossos estudos para compreendermos as respostas que esses animais estão dando frente à essas mudanças de habitats e, assim, nos instrumentalizarmos para tomar medidas de conservação desses animais; e para isso, a análise genética não invasiva pode ser decisiva.

REFERÊNCIAS

- ADRADOS, B., ZANIN, M., SILVEIRA, L. et al. Non-invasive genetic identification of two sympatric sister-species: ocelot (*Leopardus pardalis*) and margay (*L. wiedii*) in different biomes. Conservation Genet Resour (2018). <https://doi.org/10.1007/s12686-018-0992-5>.
- ALBAUGH, G. P.; IYENGAR, V.; LOHANI, A. **Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers.** International Journal of Cancer, 52: 347-350. 1992.
- ALBERTS, C. C.; SARANHOLI, B. H.; FREI F. et al. **Comparing hair-morphology and molecular methods to identify fecal samples from Neotropical felids.** PLoS ONE 12(9): e0184073. 2017.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution.** 2a edição, Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts. 2004.
- BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P. C. et al. **Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics.** Molecular Ecology Resources, 9: 1279–1301. 2009.
- BELLEMAIN, E.; SWENSON, J.E.; TALLMON, D. et al. **Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears.** Conservation Biology, 19(1): 150-161. 2005.
- BROQUET, T., MÉNARD, N., PETIT, E. **Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates.** Conservation Genetics, 8(1), 249-260, 2007.
- BUCHAN, J. C.; ARCHIE, E. A.; HOM, R. C. V. et al. **Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping.** Molecular Ecology Notes, 5: 680-683, 2005.
- CHAME, M. **Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98 (1): 71-94. 2003.
- CHAVES, P.B.; GRAEFF, V.G.; LION, M.B. et al. **DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples.** Molecular Ecology Resources, 12 (1): 18-35. 2012.

- CONFORTI, V. A.; DE AZEVEDO, F. C. C. **Local perceptions of jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) in the Iguaçu National Park area, south Brazil.** *Biological Conservation*, 111(2): 215-221. 2003.
- DAVISON, A.; BIRKS, J. D. S.; BROOKES, R. C. et al. **On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats.** *Journal of Zoology* London, 257: 141-143. 2002.
- DE AZEVEDO, F. C. et al. **Avaliação do risco de extinção da onça-parda *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil.** *Biodiversidade Brasileira*, n. 1, p. 107–121, 2013.
- DEAGLE, B. E.; TOLLIT, D. J. **Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition?** *Conservation Genetics*, 8: 743-747. 2007.
- DE BARBA, M.; ADAMS, R. J.; GOLDBERG, C. S. **Molecular species identification for multiple carnivores.** *Conservation genetics resource*, v. 6, issue 4, 2014.
- DUTTA, T.; SHARMA, S.; MALDONADO, J. E. et al. **Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India.** *Diversity and Distributions*, v. 19, n. 7, p. 760–771, 2013.
- EIZIRIK, E.; HAAG, T.; SANTOS, A.S. et al. **Jaguar Conservation Genetics.** *CAT News Special Issue 4 - The Jaguar in Brazil*. 2008.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics.** Cambridge University Press, Cambridge. 2002.
- FRANKHAM, R. **Where are we in conservation genetics and where do we need to go?** *Conservation Genetics*, v. 11, n. 2, p. 661–663, 2009.
- GALETTI, M.; EIZIRIK, E.; BEISIEGEL, B. **Atlantic rainforest's jaguars in decline.** *Science*. 342(6161):930-930, 2013.
- GOLDSTEIN, D.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications.** Oxford University Press, New York, 368. 1999.
- GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. **Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference.** *Journal of Heredity*, 88: 335-342. 1997.
- GOTTELLI, D.; WANGH, J.; BASHIR, S. et al. **Genetic analysis reveals promiscuity among female cheetahs.** *Proc R Soc B*, Published online. 2007.
- HAAG, T.; SANTOS, A. S.; DE ANGELO, C. et al. **Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies.** *Diversity*, p. 505–512, 2009.
- HAAG, T.; SANTOS, A.S.; SANA, D.A. et al. **The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*).** *Molecular Ecology*, 19 (22): 4906-4921. 2010b.
- HAAG, T., SANTOS, A. S., VALDEZ, F. P. et al. **Molecular tracking of jaguar melanism using faecal DNA.** *Conserv Genet*, 11: 1239, 2010a.
- HEDMARK, E.; FLAGSTAD, Ø.; SEGERSTRÖM, P.; et al. **DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine.** *Conservation Genetics*, 5: 405– 410. 2004.

- HOFFMAN, J. I.; AMOS W. **Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources e consequences for paternal exclusion.** *Molecular Ecology*, 14: 599–612. 2005.
- INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE (IUCN) 2014. **Red list of threatened species.** Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/news/biodiversity-crisis> Acesso em: 14/05/2018.
- LEHMANN, L.; PERRIN, N. **On metapopulation resistance to drift and extinction.** *Ecology*, 87, 1844–1855. 2006.
- LIVIA, L.; FRANCESCA, V.; ANTONELLA, P. et al. **A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*.** *Conservation Genetics*, 8: 757–759. 2007.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M.K.; LUIKART, G. et al. **Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics.** *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197. 2003.
- MCNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.V. et al. **Conserving the world's biological diversity.** IUCN, Gland, Switzerland. 1990.
- MICHALSKI, F.; VALDEZ, F.V.; NORRIS, D. et al. **Successful carnivore identification with faecal DNA across a fragmented Amazonian landscape.** *Molecular Ecology Resources*, 11: 862–871. 2011.
- MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; BEGOTTI, R. A. et al. **Monitoring a Puma (*Puma concolor*) Population in a Fragmented Landscape in Southeast Brazil.** *Biotropica*, v. 44, n. 1, p. 98–104, 2012.
- MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; KAJIN, M. et al. **Estimating puma *Puma concolor* population size in a human-disturbed landscape in Brazil, using DNA mark–recapture data.** *Oryx*, v. 48, n. 2, p. 250–257, 2014.
- MIOTTO, R. A.; CIOCHETI, G.; RODRIGUES, F. P. et al. **Identification of pumas (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods.** *Brazilian journal of biology. Revista brasleira de biologia*, v. 67, n. 4, p. 963–5, 2007b.
- MIOTTO, R. A.; CIOCHETI, G.; RODRIGUES, F. P. et al. **Determination of the Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast.** *Biotropica*, v. 39, issue 5, 2007a.
- MIOTTO, R.A.; CERVINI, M.; FIGUEIREDO, M.G. et al. **Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape.** *Conservation Genetics*, 12(6): 1447-1455. 2011.
- NESJE, M.; ROED, K. H.; LIFJELD, J. T. et al. **Genetic relationship in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers.** *Molecular Ecology*, 9: 53-60. 2000.
- OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação de felinos brasileiros.** Atibaia, São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros; Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sociedade de Zoológicos do Brasil, Pró-Vida Brasil, 80. 2005.
- PALMER, J. D. **Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation.** *American Naturalist*, 130: S6-S29. 1987.
- PALOMARES, F. et al. **A non-invasive faecal survey for the study of spatial ecology and kinship of solitary felids in the Viruá National Park, Amazon Basin.** *Mammal Research*, v. 62, n. 3, p. 241–249, 2017.
- PALOMARES F.; ROQUES S.; CHÁVEZ C. et al. **High Proportion of Male Faeces in Jaguar Populations.** *PLoS ONE* 7(12): e52923, 2012.
- PALOMARES F.; FERNÁNDEZ N.; ROQUES S. et al. **Fine-Scale Habitat Segregation between Two Ecologically Similar Top Predators.** *PLoS ONE* 11(5): e0155626, 2016.

- PALOMARES, F.; GONZÁLEZ-BORRAJO, N.; CHÁVES C. **Scraping marking behavior of the largest Neotropical felids.** PeerJ 6: e4983, 2018.
- PALOMARES, F.; GODOY, J. A.; PÍRIZ, A.; O'BRIEN, S. J. et al. **Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx.** Molecular ecology, v. 11, n. 10, p. 2171–82, 2002.
- PAVIOLO, A., DE ANGELO, C., FERRAZ, K.M. **A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America.** Scientific Reports. n6, 2016.
- PIGGOT, M. P. **Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA.** Wildlife Research, 31: 485-493, 2004.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C. et al. **The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation.** Biological Conservation, 142: 1141-1153. 2009.
- RIPPLE, W. J. et al. **Status and ecological effects of the world's largest carnivores.** Science, v. 343, n. 6167, p. 1241484, 2014.
- RODGERS, T. W.; JANEČKA, J. E. **Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation.** European Journal of Wildlife Research, v. 59, n. 1, p. 1–16, 2013.
- RODRÍGUEZ-CASTRO, K. G.; SARANHOLI, B. H.; BATAGLIA, L. et al. **Molecular species identification of scat samples of South American felids and canids.** Conservation Genetics Resources, p. 1–6, 2018.
- ROQUES, S.; FURTADO, M.; JÁCOMO, A. T. A. et al. **Monitoring jaguar populations *Panthera onca* with non-invasive genetics: a pilot study in Brazilian ecosystems.** Fauna & Flora International, Oryx, 1-9. 2014.
- ROQUES, S.; ADRADOS, B.; CHAVES, C. et al. **Identification of Neotropical felid faeces using RCP-PCR.** Molecular ecology Resources, v. 11, issue 1, 2011.
- ROQUES, S.; SOLLMAN, R.; JÁCOMO, A. et al. **Effects of habitat deterioration on the population genetics and conservation of the jaguar.** Conserv Genet 17: 125. 2016.
- SARANHOLI, B.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. **Evidence of Recent Fine-Scale Population Structuring in South American *Puma concolor*.** Diversity, v. 9, n. 4, p. 44, 2017.
- SCHIPPER, J.; CHANSON, J. S.; CHIOZZA F. et al. **The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge.** Science, 322: 225–230. 2008.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. **Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers.** Ecology letters, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.
- SOLLMANN, R.; BETSCH, J.; FURTADO, L. et al. **Note on the diet of the jaguar in central Brazil.** European journal of wildlife research, 59(3), 445-448. 2013.
- SOLLMANN, R.; TÔRRES, N. M.; FURTADO, M. M. et al. **Combining camera-trapping and noninvasive genetic data in a spatial capture–recapture framework improves density estimates for the jaguar.** Biological conservation, 167, 242-247. 2013.
- SOUZA, A. S. M. C.; DEL LAMA, S. N.; MIÑO C. I. **Conspecific brood parasitism in the white-faced ibis *Plegadis chihi* (Aves: Pelecaniformes) revealed by microsatellites' based kinship-reconstruction.** J. Exp. Zool. 319A:277–284 2013.
- SOUZA A. S. M. C.; MIÑO C. I., DEL LAMA S. N. **Polymorphic heterologous microsatellite loci for population genetics studies of the white- faced ibis *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Pelecaniformes, Threskiornithidae).** Genet Mol Biol 35:74–80. 2012.
- SOUZA, A. S. M. C.; SARANHOLI, B. H.; CRAWSHAW JR, P. G. et al. **Re-discovering jaguar in remaining coastal atlantic forest in southeastern Brazil by non-invasive DNA analysis.** Biota

Neotropica, v. 17, n. 2, 2017.

SPIELMAN, D. et al. **Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance?** Conservation Genetics, 5(4): 439-448. 2004.

SRBEK-ARAUJO, A. C.; HAAG, T.; CHIARELLO, A. G. et al. **Worrisome isolation: noninvasive genetic analyses shed light on the critical status of a remnant jaguar population.** Journal of Mammalogy, v. 99, n. 2, p. 397–407, 2018.

STANTON D. W. G., JOHN H., ASHLEY V. et al. **Non-invasive genetic identification confirms the presence of the Endangered okapi *Okapia johnstoni*** south-west of the Congo River. Oryx. Volume 50, Issue 1, pp. 134-137, 2016

SUNQUIST, M. E.; SUNQUIST, F. **Wild Cats of the World.** University of Chicago Press, Chicago, IL. 2002.

TABERLET, P.; LUIKART, G. **Non-invasive genetic sampling and individual identification.** Biological Journal of the Linnean Society, 68: 41–55. 1999.

TAUTZ, D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers.** Nucleic Acids Research, 17(16): 6463-6471, 1989.

TURCHETTO-ZOLET, C. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações** / Andreia Carina Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p., 2017.

VELLI, E., BOLOGNA, M.A., SILVIA, C. et al. Non-invasive monitoring of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris* Schreber, 1777): comparative analysis of three different monitoring techniques and evaluation of their integration. Eur J Wildl Res, 61: 657, 2015.

WALKER, F. M.; WILLIAMSON, C. H. D.; SANCHEZ DE, et al. **Species from Feces: Order-Wide Identification of Chiroptera From Guano and Other Non-Invasive Genetic Samples.** PLoS ONE 11(9), 2016.

WEBER, W; RABINOWITZ, A. **A global perspective on large carnivore conservation.** Conservation Biology, 10: 1046-1054. 1996.

WHEAT R. E.; ALLEN J. M.; MILLER S. D. L. **Environmental DNA from Residual Saliva for Efficient Noninvasive Genetic Monitoring of Brown Bears (*Ursus arctos*).** PLoS ONE 11(11), 2016.

ZELLER, K.A. **Jaguars in the New Millennium.** Data Set Update: The State of the Jaguar in 2006. Wildlife Conservation Society, Bronx, New York. 2007.

AVALIAÇÃO DA DISCIPLINA DE GENÉTICA HUMANA FRENTE ÀS DIRETRIZES CURRICULARES NACIONAIS PARA O CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Sulyanne Saraiva de Almeida

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

Alcivan Batista de Moraes Filho

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

João Paulo da Silva Liberalino

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

Sandy Albuquerque Silveira

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

Bruna Prado de Oliveira

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte,
Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento
de Ciências Biomédicas
Mossoró – RN

RESUMO: A disciplina de Genética Humana do curso de Medicina da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte é ministrada no segundo semestre do curso e objetiva fornecer uma visão moderna e atualizada da genética humana e suas aplicações no processo saúde-doença. No entanto, faz-se necessário analisar se sua execução está conseguindo atingir aos objetivos das diretrizes curriculares nacionais (DCNs) para a educação médica. Primeiramente, foi feita uma análise do conteúdo programático, bem como das atividades desenvolvidas no semestre letivo anterior. Posteriormente, os alunos foram convidados a preencher um formulário destinado a avaliar a disciplina, bem como identificar quais habilidades e competências preconizadas pelas DCNs tinham sido trabalhadas durante o semestre letivo. A disciplina foi bem avaliada pelos acadêmicos (17 estudantes – 73,9% da turma 2017.2) e, de acordo com as suas opiniões, 84,3% das competências do eixo de Educação em Saúde foram parcial ou totalmente atingidas, assim como 73,5% das de Gestão em Saúde e 68,6% das de Atenção em Saúde. Diante desses achados, considerou-se que a disciplina cumpriu os objetivos propostos e recomendados pelas DCNs, embora adequações e melhorias ainda precisem ser implementadas. Sugere-se que este tipo de análise seja adotado para a avaliação dos demais componentes curriculares

do curso, visando um aprimoramento e adequação às novas exigências e necessidades da formação médica contemporânea.

PALAVRAS-CHAVE: Genética Humana; Educação Médica; Avaliação do Ensino.

ABSTRACT: The discipline of Human Genetics of the medical graduation in the University of Rio Grande do Norte State is placed in the second semester of the course and it aims to provide a modern and updated vision of human genetics and its applications in the health-disease process. However, it's necessary to analyze if it's complying with the objectives of the National Curricular Guidelines (NCGs) for medical education. First, the programmatic contents and the activities that were performed in the previous semester were analyzed. Afterwards, the students were invited to attend a survey about the discipline and to identify which skills and competences conquered through the semester. The discipline was well evaluated by the students (17 out of 22, 73.9%) and, according to their opinions, 84.3% of the competencies of the Health Education axis were partially or completely contemplated, as well as 73.5% of Management in Health and 68.6% of Health Attention. Through these findings, we considered that the discipline complied the objectives proposed and recommended by the NCGs, although adjustments and improvements need to be implemented. We suggest that this kind of analysis should be adopted for evaluation of the other curricular components of the course, aiming optimization and fitting to the new exigencies and needs of the contemporary medical education.

KEYWORDS: Human Genetics; Medical Education; Teaching Evaluation.

1 | INTRODUÇÃO

A discussão sobre a regulamentação dos profissionais de saúde esteve presente de diversas formas no Brasil desde 1930, mas ganhou força na década de 1990, chegando às Diretrizes Curriculares Nacionais (DCNs) dos cursos de graduação. A criação do Sistema Único de Saúde (SUS) indicava mudanças consideráveis no modo de conceber e produzir saúde, apontando-a como “direito de todos e dever do Estado”. Sua institucionalização sinalizava transformações no modo de atuar no campo da saúde (MOREIRA & DIAS, 2015).

Enquanto o sistema de saúde estava sendo reordenado para um novo modelo, a formação profissional para atuar nesse sistema continuava orientada pela lógica do antigo (MOREIRA & DIAS, 2015). Por muitos anos, a formação em saúde reproduziu uma visão centrada nas técnicas biomédicas e a ênfase nos procedimentos superou amplamente o pensar saúde (CECCIM & BILIBIO, 2002). Com isso, tinha-se a cada ano levas de profissionais inadequados aos novos parâmetros de atuação na área e claramente refletia uma necessidade de readequação quanto à estrutura dos currículos de graduação.

É nesse contexto que emergem as DCNs do curso de Medicina, que, desde de

sua primeira publicação em 2001 até a mais recente de 2014, busca em sua essência, uma formação:

“...geral, humanista, crítica, reflexiva e ética, com capacidade para atuar nos diferentes níveis de atenção à saúde, com ações de promoção, prevenção, recuperação e reabilitação da saúde, nos âmbitos individual e coletivo, com responsabilidade social e compromisso com a defesa da cidadania, da dignidade humana, da saúde integral do ser humano e tendo como transversalidade em sua prática, sempre, a determinação social do processo de saúde e doença.” (BRASIL, 2014)

Nesse sentido, a aprovação das Diretrizes Curriculares Nacionais (DCNs) dos cursos da área da saúde em geral, e especificamente dos cursos de graduação em Medicina, pode ser considerada como um resultado de uma importante mobilização dos educadores da área da saúde no país e entendida como um reflexo das tendências internacionais que propõem inovações na formação dos profissionais de saúde (ALMEIDA et al., 2007).

Em meio a isso, a investigação das disciplinas surgiu como um ponto de interesse, uma vez que a formação médica deve estar em constantes ajustes para que a grade curricular esteja sempre adequada com a realidade dos sistemas de saúde (GOMES, 2009). Dessa maneira, as disciplinas necessitam passar por revisões constantes dos conteúdos curriculares, além de terem suas metodologias de ensino repensadas, objetivando a adequação do perfil do formando no profissional que se almeja para os serviços de saúde.

Mediante os novos rumos propostos pelas DCNs, disciplinas que abordam a genética humana e médica ganham suma importância nessa discussão. Com os rápidos avanços científicos, a aplicação dos conhecimentos moleculares e genéticos está se tornando algo transversal a vários aspectos das ciências biomédicas.

No currículo base de genética para escolas médicas proposto pela *American Society of Human Genetics* (ASHG) em conjunto com a Associação de Professores de Genética Médica e Humana (APHGM), o conhecimento aprofundado dos princípios de genética humana e sua aplicação em uma variedade de problemas clínicos transfigura-se como essencial para todo médico atuante no século XXI (WOLYNIK et al., 2015).

Isso porque, durante a prática, o profissional vivenciará inúmeras situações nas quais as patologias terão origem em desordens genéticas sendo, na grande maioria, doenças até então consideradas incuráveis, ou de difícil manejo, que veem nas terapias baseadas em modificações genéticas de células específicas ou na utilização de conhecimentos genéticos um horizonte promissor para os pacientes afetados.

Além disso, é reconhecido que o “*background*” genético do indivíduo tem uma influência bastante significativa no processo saúde-doença e pode, por exemplo, predispor pessoas com determinados genótipos ao desenvolvimento de doenças comuns ou ainda influenciar na sua evolução, prognóstico e determinação da terapêutica mais adequada.

De acordo com Siqueira (2004), o ensino não pode e não deve ser algo estático e unidirecional, pois a sala de aula não é apenas um lugar para transmitir conteúdos, mas também um espaço vital onde conhecimentos, valores e comportamentos são construídos ativamente na interação entre professores e alunos. Esse espaço, se bem organizado, pode possibilitar a esses atores a transformação da sociedade em benefício do bem-estar coletivo e pessoal. Assim, almeja-se uma aprendizagem que possibilite professores e alunos se tornarem realmente sujeitos ativos do processo de ensino-aprendizagem.

Nesse contexto, ouvir o aluno a respeito de suas opiniões quanto à organização da disciplina, dos métodos de ensino e de avaliação, bem como acerca do que ele acredita ser eficiente para seu aprendizado, torna-se de grande valor, pois os alunos são os primeiros agentes da aprendizagem e têm o direito de participar na avaliação do ensino (MORAIS et al., 2006).

A disciplina de Genética Humana do Curso de Medicina da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) é ministrada no segundo semestre da graduação e objetiva fornecer uma visão moderna e atualizada da genética humana e suas aplicações no processo saúde-doença. No entanto, faz-se necessário analisar se sua execução está conseguindo atingir aos objetivos das diretrizes curriculares nacionais (DCNs) para a educação médica.

Dessa maneira, o presente estudo objetivou avaliar o desenvolvimento das habilidades e competências preconizadas pelas DCNs de 2014 para o Curso de Graduação em Medicina, na disciplina de Genética Humana da UERN, utilizando para isso as percepções dos próprios alunos.

2 | METODOLOGIA

Para atingir os objetivos propostos no estudo, a escolha do método do questionário online da plataforma Google se baseou, principalmente, tanto pela praticidade para o acesso dos alunos quanto pela facilidade no manejo dos dados, uma vez que a plataforma permite um processamento automático das respostas, dispondo ainda de recursos de visualização de dados.

Dessa forma, para avaliar a disciplina de Genética Humana da Faculdade de Ciências da Saúde (FACS) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), no que se refere a sua adequação à nova realidade das DCNs do Curso de Graduação em Medicina de 2014, foi aplicado esse questionário no período de 07 a 21 de agosto de 2018, sem que houvesse a identificação dos participantes, obtendo a resposta de 17 discentes do total de 24.

Analisando a disciplina ministrada durante o semestre de 2017.2, a partir do conteúdo programático e metodologias de ensino aplicadas, foram estabelecidas indagações sobre a eficiência do que estava sendo ofertado frente à nova proposta do

tipo de profissional médico exigido desde 2014.

Vale a pena ressaltar que as escolas médicas de todo o Brasil tiveram até 2018 para se adequar a essas novas DCNs, de forma que a Graduação em Medicina seria baseada em três áreas: Atenção à Saúde, Gestão em Saúde e Educação em Saúde.

Ademais, as próprias DCNs de 2014 foram utilizadas como base para a produção do questionário, de maneira que as habilidades e competências das áreas supracitadas foram abordadas por meio de blocos de questões em sua referência.

Na área de Atenção à Saúde, são observadas atitudes relacionadas às diversas dimensões a serem consideradas no atendimento ao paciente, de maneira que a abordagem assistencial deve ser pautada no cunho biológico, estudando os sinais e sintomas clínicos que guiam diagnósticos e terapêuticas eficazes, como também percebendo o contexto em que se insere o paciente, suas relações familiares, seu posicionamento político, dentre outros aspectos de ordem étnica, econômica, religiosa e cultural, adicionando a esse atendimento holístico uma atuação médica que vise respeitar a orientação sexual, o gênero e a subjetividade do paciente (BRASIL, 2014).

Diante disso, os questionamentos relacionados a essa área buscaram evidenciar como a disciplina de Genética Humana estava promovendo as habilidades e competências preconizadas pelas DCNs de 2014 passíveis de serem trabalhadas durante o desenvolvimento das atividades e conteúdos administrados em sala de aula.

Desse modo, foram feitos os seguintes questionamentos, de modo que, o discente marcaria a (s) alternativa (s) de acordo com a sua perspectiva de aproveitamento do que foi proposto pela disciplina (ver tabela 1).

<input type="radio"/> Aplicação do conhecimento de genética em contexto biopsicossocioambiental;
<input type="radio"/> Compreensão dos mecanismos biológicos básicos ligados à genética humana;
<input type="radio"/> Desenvolvimento do conhecimento sobre semiologia genética;
<input type="radio"/> Desenvolvimento das reflexões éticas ligadas ao uso das técnicas em genética humana;
<input type="radio"/> Compartilhamento e esclarecimento de informações aos envolvidos na abordagem terapêutica de doenças genéticas;
<input type="radio"/> Entendimento sobre individualidade e práticas populares de saúde no processo terapêutico de doenças genéticas;
<input type="radio"/> Habilidades de educação popular;
<input type="radio"/> Habilidades comunicativas;
<input type="radio"/> Desenvolvimento de raciocínio clínico-epidemiológico;
<input type="radio"/> Associação do conhecimento científico sobre as doenças genéticas a um atendimento ético que respeite as eventuais diferenças culturais, individuais e coletivas;
<input type="radio"/> Aplicação do conhecimento de genética em relação ao tratamento e ao prognóstico das doenças genéticas de forma compartilhada e multidisciplinar;
<input type="radio"/> Habilidade de desenvolver relação médico-paciente transparente, respeitosa e com comunicação plena e efetiva nas orientações necessárias à pessoa sob os cuidados e aos envolvidos;

○ Desenvolvimento de um olhar humanístico e holístico em situações-problemas no processo de saúde-doença de origem genética;
○ Habilidades de cruzar os mais diversos dados obtidos a partir do contato com o usuário e com a comunidade, visando estabelecer um melhor diagnóstico de saúde e planejamento para intervenção na comunidade;
○ Habilidades de escuta ativa;
○ Respeito e estímulo à participação popular e multiprofissional na elaboração de projetos e de intervenções em saúde na comunidade;
○ Desenvolvimento de intervenções, a partir de problemas encontrados na comunidade, para melhorar os indicadores de saúde;
○ Habilidades de avaliação de ações e de projetos desenvolvidos no SUS.

Tabela 1. Habilidades e competências relacionadas à área de Atenção em Saúde baseadas nas DCNs de 2014.

Outra atuação da profissão do médico é na área de Gestão em Saúde, o que contribui diretamente com o andamento do sistema de saúde, assim como promover as transformações dos serviços diante das diversas problemáticas encontradas dentro da vivência neles.

É dentro dessa perspectiva que as DCNs de 2014 estabeleceram algumas habilidades e competências as quais, no questionário aplicado aos discentes, buscou-se analisar se haviam sido conceitualmente aplicadas nas aulas e nas atividades desenvolvidas da disciplina de Genética Humana (ver tabela 2).

○ Noções sobre relação das políticas de saúde pública em um contexto histórico e político;
○ Expansão do conceito de saúde e da sua relação com a rede de saúde;
○ Reconhecimento das necessidades de melhorias nas intervenções em saúde e desenvolvimento de plano conjunto para saná-las;
○ Habilidades de autoavaliação;
○ Habilidades de avaliação e pensamento crítico a respeito do desempenho dos colegas;
○ Habilidades de recepção de críticas.

Tabela 2. Habilidades e competências relacionadas à Gestão em Saúde baseadas nas DCNs de 2014.

A área de Educação em Saúde também se insere na prática cotidiana do médico, fazendo-se presente em consultas ambulatoriais e ações de Saúde Pública, permeando o espaço entre esses polos, além de referir à capacidade inerente de educação profissional continuada, discorrendo sobre as ferramentas necessárias para interação com as informações científicas expostas nos diversos meios propícios para tal. As habilidades previstas para este eixo pelas DCNs foram representadas nos itens da Tabela 3, presentes no questionário.

○ Habilidades de cooperação, trabalho e aprendizagem em grupo;
○ Habilidades de educação popular;
○ Desenvolvimento de raciocínio científico;
○ Habilidades com linguagem científica;
○ Habilidades com pesquisa de trabalhos científicos;
○ Habilidades de produção científica.

Tabela 3. Habilidades e competências relacionadas à Educação em Saúde baseadas nas DCNs de 2014

3 | RESULTADOS

A primeira questão proposta aos alunos foi sobre a noção que tinham sobre as DCNs, se as conheciam ou não, mostrando que apenas 4 alunos dos 17 afirmaram conhecê-las, como mostra a Figura 1.

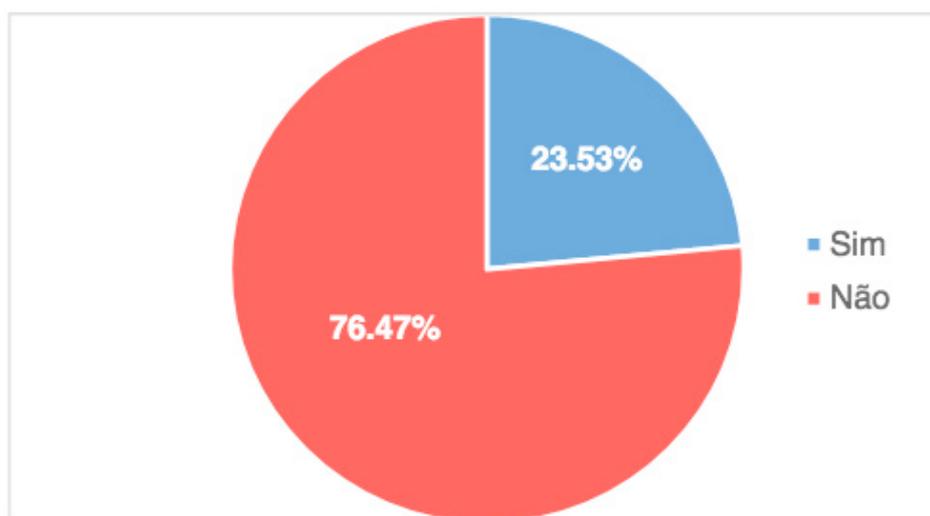


Figura 1. Conhecimento dos discentes sobre a existência das DCNs de 2014 (n=17 – 73,9% da turma de Genética Humana 2017.2).

Outro aspecto trabalhado foi a classificação qualitativa da disciplina em relação às DCNs, entre os que a conheciam (4 alunos), e a forma que elas foram abordadas na disciplina. Observou-se que 50% (2 alunos) a consideravam boa e 50% (2 alunos) como excelente, conforme mostra a Figura 2.

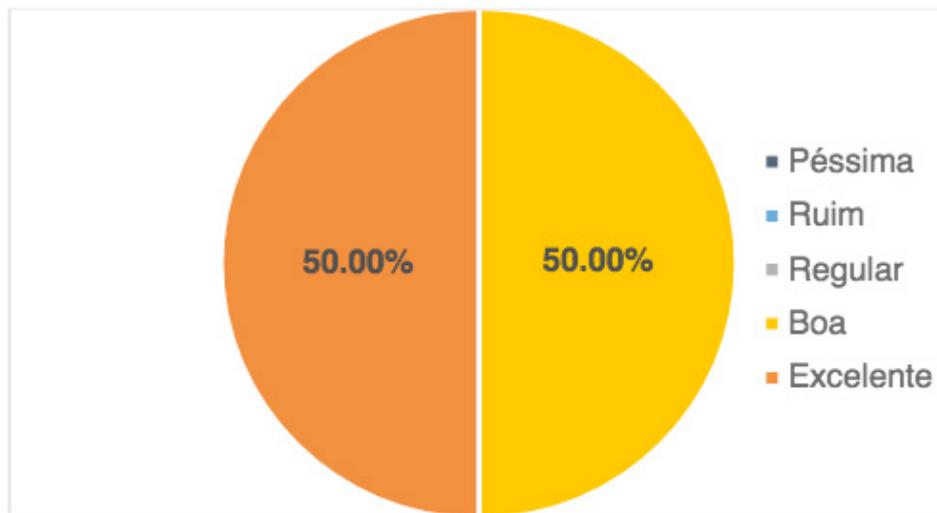


Figura 2. Relação entre as competências exigidas pelas DCNs de 2014 e a suas abordagens na disciplina de Genética Humana, sob a perspectiva dos discentes (n =17 – 73,9% da turma de Genética Humana 2017.2).

A análise das habilidades e competências desenvolvidas em cada uma das áreas revelou resultados peculiares. Para a área de atenção à saúde observou-se que as habilidades de “desenvolver intervenções para melhorar os indicadores de saúde” e a de “educação popular” foram as menos trabalhadas e as habilidades de “desenvolver reflexões éticas sobre as técnicas em genética” e de “compreender os mecanismos ligados à genética” as mais frequentes (Figura 3).

Na área de gestão em saúde a habilidade/competência menos trabalhada foi a de “noções sobre as políticas de saúde pública” e a mais frequentemente relatada como inserida na disciplina foi a de “expansão do conceito de saúde e da sua relação com a rede de saúde” que trouxe como resultado 17 alunos com respostas afirmativas (ver Figura 4).

Já a área de Educação em Saúde teve um melhor desempenho dentro da proposta desenvolvida na disciplina de Genética Humana quando comparado as outras, pois 17 alunos colocaram nas habilidades “com pesquisa de trabalhos científicos”, “com linguagem científica”, “desenvolvimento de raciocínio científico” e “de cooperação, trabalho e aprendizagem em grupo”. A Figura 5 reúne os resultados encontrados.



Figura 3. Habilidades e competências trabalhadas pela disciplina, segundo a ótica dos alunos, sobre a área de Atenção à Saúde (N=17 – 73,9% da turma de Genética Humana 2017.2).

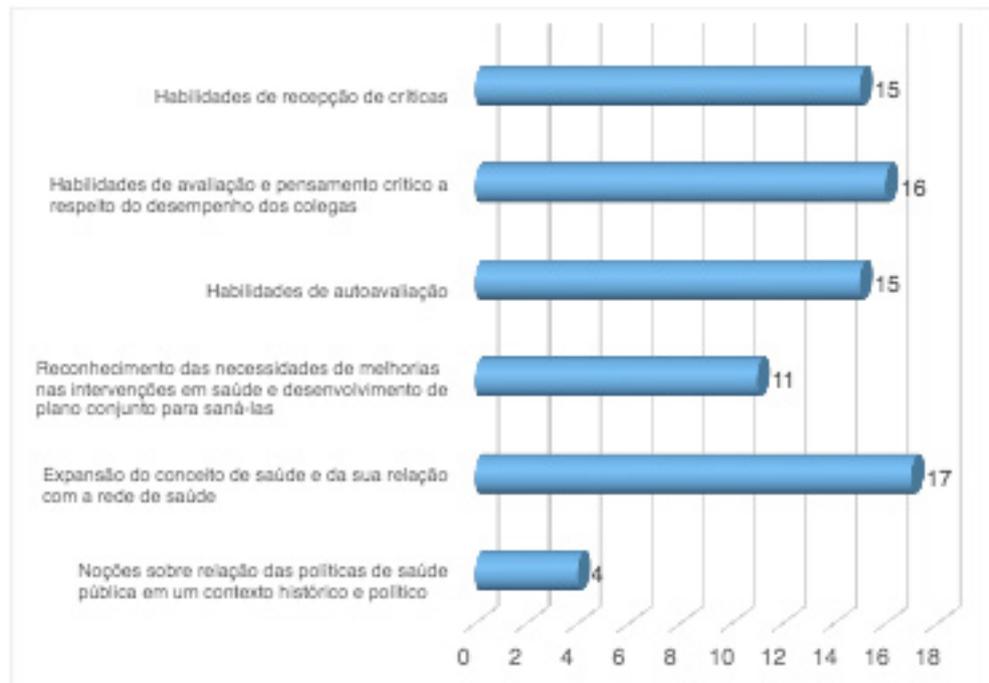


Figura 4. Habilidades e competências trabalhadas pela disciplina, segundo a ótica dos alunos, sobre a área de Gestão em Saúde (N=17 – 73,9% da turma de Genética Humana 2017.2).



Figura 5. Habilidades e competências trabalhadas pela disciplina, segundo a ótica dos alunos, sobre a área de Educação em Saúde (N=17 – 73,9% da turma de Genética Humana 2017.2).

4 | DISCUSSÕES

Embora o SUS tenha sido criado há mais de 30 anos, na Constituição Federal de 1988, trazendo consigo um novo modo de pensar em saúde na sociedade brasileira, a formação técnica e humanista dos profissionais dessa área ainda enfrenta muitos obstáculos para superar a lógica do antigo modelo de sistema, reducionista, biologista e hospitalocêntrico (NOGUEIRA, 2009).

Desde o seu surgimento, as DCNs do Curso de Graduação em Medicina buscam guiar a formação de médicos capacitados para atuar no SUS e aplicar os princípios doutrinários e organizacionais do sistema em sua prática profissional,

independentemente do serviço em saúde prestado (ROSSONI & LAMPERT, 2004).

A última edição dessas DCNs, do ano de 2014, versa sobre conhecimentos, habilidades e atitudes que todos os formandos devem ter em relação às três áreas: Atenção à Saúde, Gestão em Saúde e Educação em Saúde, dando às escolas médicas como limite máximo para se adequar a elas até o dia 31 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2014).

Na busca por melhor atender às novas exigências nacionais, a disciplina de Genética Humana do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, buscou incorporar as opiniões dos discentes no processo de avaliação e reformulação curricular, observando-os como sujeitos ativos dessas transformações socioeducacionais.

Diante do fato de apenas 23,53% dos questionados terem afirmado conhecer as DCNs previamente, pode-se afirmar que os próprios discentes se encontram pouco alertas acerca das propostas de formação médica que lhes estão sendo ofertadas em território brasileiro.

Isso corrobora para a dificuldade de aprimoramento contínuo dos programas das disciplinas curriculares, à medida que a opinião discente se descaracteriza do seu papel como ferramenta transformadora da realidade de ensino capaz de perceber quão divergente são as teorias propostas das realidades vivenciadas no processo de ensino-aprendizagem (LIMA et al., 2011).

No que lhe diz respeito, ao considerar opinião dos 4 discentes que afirmaram ter conhecimento prévio acerca das DCNs, a correspondência entre elas e as habilidades e competências desenvolvidas disciplina é apontada como satisfatória, com 2 deles (50%) a considerando boa e os outros 2 a considerando como excelente.

Da área de Atenção à Saúde, os resultados obtidos variaram consideravelmente, mas foi possível observar que as habilidades e as competências relacionadas com a aplicação teórico-prática e a ética dos conhecimentos adquiridos na atenção à saúde tiveram um maior nível de aproveitamento entre os discentes quando a área dialogava com um caráter mais voltado para a solução de problemas individuais.

Por sua vez, habilidades mais relacionadas a ações de prevenção e promoção à saúde, à Saúde Coletiva e à aplicação de princípios organizacionais do SUS revelaram-se mais frágeis entre os alunos, à medida que habilidades “de educação popular”, “desenvolver intervenções para melhorar indicadores de saúde” e “avaliar ações e projetos desenvolvidos pelo SUS”, por exemplo, foram julgadas como bem trabalhadas na opinião de apenas 17,65%, 23,53% e 35,71% discentes, respectivamente.

Na área de Gestão em Saúde, quase todas as habilidades e competências exigidas apresentaram bom aproveitamento na ótica dos estudantes, demonstrando que possivelmente sentiam-se confiantes para se relacionar com outros profissionais dentro do sistema de saúde a partir dos conhecimentos adquiridos na disciplina.

Entretanto, ter “noções sobre as políticas de Saúde Pública” foi uma habilidade que apenas 23,53% dos questionados apontaram como satisfatória, demonstrando

mais uma vez a fragilidade da disciplina em contextualizar os conhecimentos de Genética Humana com a realidade do sistema de saúde público brasileiro.

Dentre todas, as habilidades e as competências relacionadas com a área de Educação em Saúde foram as de maior aproveitamento entre os discentes, com 4 delas (total de 6) sendo referidas por todos os 17 questionados como satisfatórias, sendo elas de cunho técnico-científico e de processo de ensino-aprendizagem em grupo.

Essas tendem a ser mais facilmente desenvolvidas em uma disciplina de cunho biológico (envolvendo pesquisa de trabalhos, raciocínio e linguagem científicos) e que promove o trabalho em equipe, uma habilidade que qualquer componente curricular pode exercitar ao fazer uso de métodos cooperativos de construção e socialização do conhecimento.

Esses achados apontam para uma excelência técnica-científica em torno da qual a disciplina parece direcionar suas atividades. Por outro lado, mesmo que habilidades de comunicação e escuta ativa tenham sido apontadas como trabalhadas por 76,47% e 70,59%, respectivamente, pelos discentes, é notório que se revela a possibilidade de que a disciplina não capacite de forma suficiente os discentes na adequação de linguagens e de saberes acadêmicos para ações voltadas à comunidade, à medida que as “habilidades de educação popular” foram apontadas como bem desenvolvidas por poucos estudantes no questionário.

Destarte, pode-se perceber que ainda há dificuldades envolvidas na adequação da realidade da disciplina de Genética Humana à DCNs de 2014, tendo em vista que várias das habilidades e competências foram pouco desenvolvidas, o que pode corroborar para a formação de egressos menos preparados para trabalhar com as dificuldades e necessidades inerentes à prática médica seja ela no setor privado ou público, sendo este o mais prejudicado, uma vez que possui maior fragilidades e vulnerabilidades funcionais, sociais e estruturais.

5 | LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações deste trabalho estão contidas no próprio viés interpretativo dos alunos ao responder o questionário, visto que poucos conheciam as DCNs, logo, provavelmente não estavam cientes da extensão de todas as habilidades submetidas a julgamento. Ainda assim, esses resultados tornam claro o potencial de conquista de habilidades das disciplinas planejadas sob a visão do que é, de acordo com as Diretrizes, necessário aprender para se tornar um médico capacitado para o pleno exercício da profissão.

6 | CONCLUSÕES

Mesmo muitas vezes conseguindo atingir parâmetros de excelência técnico-científicos, ainda há muitos desafios a serem superados para que a educação em saúde realmente prepare os profissionais médicos para atuar dentro da realidade do sistema público de saúde brasileiro.

Frente ao exposto, é perceptível que os processos biológicos e éticos envolvidos nos conteúdos abordados nas atividades aplicadas e nas aulas ministradas da disciplina de genética humana mostraram ter sido bem abordados e trabalhados, mas outros aspectos de cunho social e de resolubilidade de situações-problema, encontrados frequentemente na prática profissional, mostram-se pouco explorados, e, podendo, portanto, contribuir de alguma forma para a fragilidade da formação médica dos futuros egressos da UERN nesses aspectos já citados.

A superação desses desafios requer não só mudanças dentro das micropolíticas, com os esforços dos professores e alunos para a transformação do processo de ensino-aprendizagem em saúde, como também das macropolíticas, com incentivos e programas governamentais que estimulem uma formação médica que supere a lógica do pensar em saúde dos antigos modelos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Márcio José de et al. Implantação das diretrizes curriculares nacionais na graduação em medicina no Paraná. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 31, n. 2, p. 156-165, 2007.

BRASIL. Ministério da Educação. Conselho Nacional de Educação. Câmara de Educação Superior. Resolução CNE/CES nº 4, de 7 de novembro de 2001. Institui Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Medicina. **Diário Oficial da União**. Brasília, Seção 1, p. 38. 9 nov. 2001. Disponível em: <<http://portal.mec.gov.br/cne/arquivos/pdf/CES04.pdf>>. Acesso em 24 fev. 2019.

_____. Resolução nº 3, de 20 de junho de 2014. Institui Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Medicina e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, Seção 1, p. 8-11. 23 jul. 2014. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15874>. Acesso em 24 fev. 2019.

CECCIM, Ricardo Burg; BILIBIO, Luiz Fernando Silva. Articulação com o Segmento Estudantil da Área da Saúde: uma Estratégia de Inovação na Formação Recursos Humanos para o SUS. In: Brasil, Ministério da Saúde. **VER-SUS Brasil: Caderno de Textos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. p.9-31.

GOMES, Romeu et al. Aprendizagem Baseada em Problemas na formação médica e o currículo tradicional de medicina: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Educação Médica**. Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 444-451. 2009.

LIMA, Anselmo Pereira de; ALTHAUS, Dalvane; RODRIGUES, Claudinéia Lucion Savi. Formação docente continuada e desenvolvimento do protagonismo discente na universidade: faces de uma mesma moeda. **Synergismus Scientifica UTFPR**, Pato Branco, v. 6, n. 1, 2011.

MORAIS, Natércia; ALMEIDA, Leandro da Silva; MONTENEGRO, Maria Irene. Percepções do ensino pelos alunos: uma proposta de instrumento para o ensino superior. **Análise Psicológica**, v. 24, n. 1, p. 73-86, 2006.

MOREIRA, Carlos Otávio Fiúza; DIAS, Maria Socorro de Araújo. Diretrizes curriculares na saúde e as mudanças nos modelos de saúde e de educação. **ABCS Health Sciences**, v. 40, n. 3, p. 300-5, 2015.

NOGUEIRA, Maria Inês. As mudanças na educação médica brasileira em perspectiva: reflexões sobre a emergência de um novo estilo de pensamento. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 33, n. 2, p. 262-70, 2009.

ROSSONI, Eloá; LAMPERT, Jadete. Formação de profissionais para o Sistema Único de Saúde e as diretrizes curriculares. **Boletim da Saúde**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 87-98, jan./jun. 2004.

SIQUEIRA, Denise de Cássia Trevisan. Relação professor-aluno: uma revisão crítica. **Integração ensino pesquisa extensão**, v. 9, n. 33, p. 97-101, mai. 2003.

WOLYNIAK, Michael John; BEMIS, Lynne Taylor; PRUNUSKE, Amy Jennette. Improving medical students' knowledge of genetic disease: a review of current and emerging pedagogical practices. **Advances in Medical Education and Practice**, v. 6, p. 597-607, 29 out. 2015.

CITOGENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO SULFATO DE COBRE EM DIFERENTES VARIEDADES DE *allium cepa* LINN

Júlio Brando Messias

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro / Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Rosanne Lopes de Brito

Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco, Recife – PE

Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro – Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Inalda Maria de Oliveira Messias

Universidade de Pernambuco -Campus Santo Amaro – Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Mônica Simões Florêncio

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro / Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Betty Rose de Araújo Luz

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro / Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro / Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE

Mércia Cristina de Magalhães Caraciolo

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz, Recife – PE

João Ferreira da Silva Filho

Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro / Instituto de Ciências Biológicas, Recife –

PE

RESUMO: O sistema *Allium cepa* Linn. é utilizado na avaliação dos efeitos deletérios aos cromossomos. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito citogenotóxico e mutagênico do sulfato de cobre nas variedades de cebola, Red creole, White creole e Texas early. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri em água destilada (controle) e sulfato de cobre 0,006 g/L (tratado). Após a germinação procedeu-se a coleta do meristema radicular com fixação em Carnoy. Foram contadas 5000 células por grupo. A citogenotoxicidade foi avaliada pelo cálculo do índice mitótico e a avaliação mutagênica pelas alterações cromossômicas (micronúcleos, brotos, perdas e quebras cromossômicas). Diferenças significativas foram registradas no grupo controle entre as variedades Red creole e Texas early e entre as variedades Texas early e White creole. As variedades analisadas sofreram de forma significativa a ação agressiva do sulfato de cobre, que agiu de forma diferenciada entre as variedades analisadas. Pode-se concluir que a variedade Red creole demonstrou ser a mais resistente enquanto a White creole e a Texas early as mais sensíveis. Os resultados devem ser avaliados com cautela uma vez que podem implicar, dependendo da variedade escolhida,

em respostas tendenciosas para refutar ou confirmar uma ação de um suposto agente estudado.

PALAVRAS-CHAVE: Citologia, genética, toxicidade, cebola, sulfato cúprico.

ABSTRACT: The *Allium cepa* Linn. system is used to evaluate deleterious effects on chromosomes. The objective was of this study was to analyze the cytogenotoxic and mutagenic effect of copper sulphate in onion, Red creole, White creole and Texas early varieties. The seeds were placed to germinate in Petri dishes in distilled water (control) and copper sulphate 0.006 g / L (treated). After the germination, the root meristem was collected with Carnoy fixation. 5000 cells were counted per group. The cytotoxotoxicity was evaluated by calculating the mitotic index and the mutagenic evaluation by the chromosomal alterations (micronuclei, sprouts, losses and chromosomal breaks). Significant differences were recorded in the control group between the varieties Red creole and Texas early and between the varieties Texas early and White creole. The analyzed varieties suffered significantly the aggressive action of copper sulphate, that had different action among the varieties analyzed. It can be concluded that the variety Red creole proved to be the most resistant while White creole and Texas early the most sensitive. The results should be evaluated with caution since they may imply, depending on the variety chosen, tendentious answers to refute or confirm an action of a supposed agent studied.

KEYWORDS: Cytology, genetics, toxicity, onion, cupric sulfate.

1 | INTRODUÇÃO

Existem inúmeros estudos com *A. cepa* L. que utilizam o sulfato de cobre ou cúprico (SO_4Cu) como controle positivo para bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade (LIMA *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2014; MITTEREGGER-JÚNIOR *et al.*, 2006; PRÁ *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2014). Isso se deve ao fato de o sulfato de cobre ser um composto químico constantemente utilizado como fungicida, representando um importante agente de danos ambientais com potencial carcinogênico (PRÁ *et al.*, 2006; TEISSEIRE *et al.*, 1998).

O sulfato de cobre na forma pentaidratada ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), é de grande aplicabilidade na aquicultura para controle de parasitoses e em enfermidades bacteriana, bem como de algas macrófitas aquáticas (ARAUCO *et al.*, 2005). Além disso, o cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância relevante (PRÁ *et al.*, 2006; TEISSEIRE *et al.*, 1998).

O sulfato de Cobre ou cúprico (SO_4Cu) é comumente empregado como fungicida ou incorporado a fertilizantes em plantações agrícolas, também compõe a nutrição humana seja presente nos alimentos, ou na forma de suplementação ou aditivo alimentar (PRÁ *et al.*, 2006; TEISSEIRE *et al.*, 1998). Aguiar (2012) relata que há registros da utilização desse composto para conservação de madeiras destinadas a construção,

além de ser componente de tinturarias ou integrando produtos intermediários industriais. Também está presente como mordente em banhos fotográficos, eletrólito das pilhas e produtos destinados a pirotecnia.

Quando pentahidratados ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), adquire a coloração azulada e por isso conhecido como vítreo azul, esse destinado a função de agrotóxico na aquicultura em decorrência de sua eficácia no combate de patogenias peculiares da piscicultura, desde origem bacteriana, a parasitas, moluscicida até o combate a proliferação de algas macrófitas, estas dificultam a eficiência do processo de fotossíntese reduzindo significativamente os níveis de oxigênio biodisponível na água (ARAUCO *et al.*, 2005; SAMPAIO, 2013).

Como o cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância significativa, além de algicida, bactericida e herbicida deve-se possuir cautela na aplicação do sulfato de cobre. Pois, a dosagem equivocada pode acarretar sérios danos toxicológicos aos peixes, esses ocasionados pela formação de íons cúpricos (Cu^{+2}) ao ser dissolvido em água com níveis mínimos de alcalinidade (PRÁ *et al.*, 2006; TEISSEIRE *et al.*, 1998). Dentre os danos relatados ocorre a produção excessiva de muco nas brânquias dificultando a absorção de oxigênio, além de afetar significativamente o sistema imunológicos dos animais e danificar o sistema nervoso dos mesmos, podendo ocasionar a morte dos peixes (SAMPALIO, 2013).

O artigo 34, § 5º da resolução CONAMA (nº 397/2008) estabelece a concentração máxima de até 0,001 g/L de sulfato cobre para lançamentos de efluentes, além desse valor poderá agir toxicamente nos animais aquáticos (BRASIL, 2008).

A preocupação com a concentração de sulfato de cobre nos mananciais já existe a muitos anos como citado nas pesquisas de Mello e Vidal (1978), e de Arauco e Machado (2005), ao demonstrarem que se configurava necessário estabelecer análises da atuação dessa molécula em ambientes dulcícolas associado ao tempo residual em peixe cultivados; uma vez que já se tornava evidente que afetava a estrutura naturais dos ecossistemas aquáticos, desencadeando danos que inviabiliza o consumo humano e animal dessas águas (GUERRA, 2008; LEBRE, 2005).

Quanto a importância medicinal e farmacológica, alguns reagentes químicos são sintetizados a base de sulfato de cobre, tais como a solução de Feulgen e de Benedict empregada na análise química para detecção de açúcares redutores e o reagente de biureto na avaliação proteica. Também é possível constatar anemia utilizando o sulfato de cobre estabelecendo a densidade desse agente químico e comparando com a das hemoglobinas (FISKEJO, 1984; MELO; VIDAL, 1978; GUERRA, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

A respeito dos danos originários do uso indevido do sulfato de cobre, remete as substâncias serem classificadas como metais tais como ferro, cobre e cromo agem no ciclo redox convertendo-se em moléculas reativas de oxigênio, conseqüentemente ocorre a peroxidação de lipídios provocando danos no DNA e interferindo na

homeostasia de diversos minerais essenciais a manutenção fisiológica do organismo, dificultando a correta manutenção da molécula de DNA (CHASIN; AZEVEDO, 2003; SILVA *et al.*, 2011).

O presente trabalho tem por objetivo verificar se diferentes variedades de *Allium cepa* L. respondem de forma semelhante a ação de um mesmo agente agressor.

2 | METODOLOGIA

2.1 Sulfato de Cobre

Neste estudo foi utilizado o sulfato de cobre na concentração de 0,006g/L. Considerou-se a escolha desse agente químico, por ser um composto com potencial bioacumulativo em ecossistemas aquáticos, prejudicando a biodiversidade limnótica e podendo acarretar danos à fisiologia humana em decorrência da bioacumulação nos níveis tróficos, além de ser utilizado em vários estudos como controle positivo de bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade utilizando o sistema *Allium cepa* L.

2.2 Local de Realização do Estudo

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Técnicas Histológicas e Embriológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco – ICB/UPE.

2.3 Sementes utilizadas

Para realizar a comparação da ação citogenotóxica e mutagênica do sulfato de cobre foram escolhidas as variedades de sementes *Allium cepa* L. Texas Early (Lote: 502476964 52), White Creole (Lote: 4023452) e Red Creole (Lote: 4059052).

2.4 Organização dos Grupos Experimentais

As sementes do grupo 01 (controle negativo) ficaram em uma placa de petri com papel filtro embebido em água destilada; enquanto as sementes do grupo 02, foram colocadas para germinar em uma solução com sulfato de cobre (0,006 g/L), e subdividido em três grupos de acordo com a variedade de cebola. Grupo 02.a: Variedade Red Creole; Grupo 02.b: Variedade White Creole; e Grupo 02.c: Variedade Texas Early.

Todas as placas (controle e tratado) receberam 40 sementes, para cada variedade estudada.

2.5 Preparação das Lâminas

Após germinação procedeu-se o esmagamento dos meristemas radiculares segundo a metodologia de Guerra e Souza (2002).

Inicialmente coletou-se as raízes, fixando-as em Carnoy 3:1 (etanol: ácido

acético), por 24 horas e posteriormente armazenadas em álcool 70% sob refrigeração até a preparação a seguir: três banhos em água destilada (para remover resíduos do Carnoy e do álcool); hidrólise com ácido clorídrico (HCl) 5N, durante 20 minutos, em temperatura ambiente; lavagem em água destilada (para eliminação do HCl); maceração das células meristemáticas entre lamina e lamínula, após a adição de uma gota de ácido acético 45% (espalhamento das células); remoção da lamínula em gelo seco.

2.6 Coloração do material

Após remoção da lamínula e secagem da lâmina foi realizado a coloração em uma solução de Giemsa a 2%, por 20 minutos, conforme procedimento descrito por Guerra e Souza (2002). Após a coloração e secagem foi feita a montagem definitiva, adicionando-se uma gota de Entelan entre lâmina e lamínula para selagem do material.

Por fim, material foi observado em microscópio óptico utilizando a lente objetiva de 40x e ocular de 10x configurando uma ampliação de 400 vezes (FISKEJO, 1984; GRANT, 1982; MELLO *et al.*, 2004).

2.7 Análises das irregularidades celulares nos ensaios com *Allium cepa* L

Foram confeccionadas 10 lâminas para cada ensaio realizado. Em cada lâmina foram analisadas, 500 células, totalizando 5000 para cada tratamento. Foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células de todas as lâminas para cada tratamento.

2.8 Efeitos citogenotóxicos e mutagênicos

A análise genotóxica e mutagênica foi realizada através da presença de ponte (PT); perdas (PE); micronúcleos (MN); brotos (B) e quebras (Q).

A análise citotóxica foi feita pelo índice mitótico (IM), que consiste no número de células em mitose dividido pelo total de células meristemáticas contadas.

2.9 Delineamento estatístico

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Todas as análises foram realizadas através do teste *t* Student, com significância de 5%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados evidenciados na Tabela 1, houve diferenças estatísticas entre todos os grupos tratados em comparação com o controle, evidenciando a ação tóxica do sulfato de cobre, como era esperado, uma vez que este é um agente utilizado como controle positivo nos testes de citogenotoxicidade (CAMPOS; OLIVEIRA; SCHEVEITZE, 2017; GUECHEVA, 2002; KNAPIK; MORGANA, 2013).

Para Costa (2016) o acúmulo lento dos contaminantes nos tecidos ao longo do tempo podem desenvolver características de toxicidade subletal até alcançar níveis danosos para o organismo. Nossos resultados comprovaram o efeito citogenotóxico do Sulfato de cobre através do bioensaio utilizando-se *A. cepa* L. expresso, aqui, como micronúcleo, broto, quebra, ponte e perda. As incidências de pontes e quebras tem correlação com efeitos clastogênicos, enquanto as perdas remetem a aneugênese (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Segundo Fenech (2000) uma das consequências da exposição a agentes genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas (AC), dentre as aberrações está a ocorrência de aneuploidias, que podem levar a formação de micronúcleos (MN). Para Leme e Marin-Morales (2009), os micronúcleos (MNs) têm sido considerados como o mais efetivo e simples fator para analisar efeitos mutagênicos, isso devido ao fato dos MNs resultarem de danos nas células parentais, sendo facilmente observados em células filhas.

Ensaio	Grupo Tratado (Sulfato de Cobre)			Grupo Controle (H ₂ O)		
	Red Creole	White Creola	Texas Early	Red Creole	White Creole	Texas Early
Micronúcleos	3,6 ± 3,78 ^a	13 ± 10,16 ^b	4,7 ± 5,93 ^c	0,4 ± 0,84 ^a	0,1 ± 0,32 ^b	0 ^c
Broto	0,7 ± 0,67 ^d	1,7 ± 1,34 ^e	1,7 ± 1,95 ^f	0 ^f	0 ^e	0 ^f
Quebra	0,5 ± 0,53 ^g	1,3 ± 1,25 ^h	0,1 ± 0,32 ⁱ	0,1 ± 0,32 ^g	0,1 ± 0,32 ^h	0 ⁱ
Ponte	2,5 ± 2,5 ^j	2,0 ± 1,7 ^k	2,3 ± 1,49 ^l	1,1 ± 1,2 ^{j,m,n}	0,1 ± 0,32 ^{k,m}	0,1 ± 0,32 ^{l,n}
Perda	0,9 ± 0,57 ^o	0,9 ± 1,10 ^p	1,2 ± 1,23 ^q	0,2 ± 0,42 ^o	0,1 ± 0,32 ^p	0,1 ± 0,32 ^q

Tabela 1. Distribuição das atividades mutagênicas e genotóxicas observadas em células meristemáticas das variedades Red creole (RC), White creole (WC) e Texas early (TE) de *Allium cepa* L., expostas a mesma concentração de sulfato de cobre*, em comparação ao controle

*(0,001 g/L). Teste t Student. Letras iguais na mesma linha apresentam diferenças estatísticas, a, d, h= p<0,001; l= p<0,01; b, c, e, f, g, i, j, m, n, o, p, q.= p < 0,05.

Conceituando, os MNs originam-se de cromossomos inteiros ou partes fragmentadas durante o processo de divisão celular anormais. Sendo evidenciado após a reconstituição da carioteca que se dar ao redor do material nuclear principal; evidenciando a falha do processo mitótico através do dano estrutural e/ou numérico pela perda da cromatina (FENECH, 1997).

Segundo Aurora *et al.* (1969) e Fenech (1997), tende-se a reduzir a quantidade de MNs nas regiões meristemáticas classificadas como F1 (região mais externa do ápice radicular), havendo maior incidência nos níveis de F2, afetando o ciclo de divisão já que a geração F1 é derivada da F2, essa com tais alterações não consegue dar prosseguimento ao processo mitótico ou meiótico acarretando na tendência a degenerar-se.

Corroborando Krishna e Hayashi (2000) menciona que a síntese de MN advém de quebras cromossômicas por clastogênese ou devido a disfunção da mitose por aneugênese; como no fuso que leva a aneuploidia na fase de divisão celular seguinte, em geral, a anáfase, perdendo-se cromossomos e gerando MNs, sendo facilmente visualizados no citoplasma depois da telófase (KRISHNA; HAYASHI, 2000; BONASSI *et al.*, 2006; SAMANTA; DEY, 2012; CIMINI *et al.*, 2002). Essas e outras alterações podem ser identificadas na Figura 1.

Quanto ao grupo tratado com sulfato de cobre, não houve diferenças significativas, demonstrando que as variedades respondem de forma semelhante ao agente agressor. Porém, comparando-se as variedades do grupo controle, percebe-se distinções estatísticas concernente a incidência de pontes nas variedades Red creole com a White creole; bem como entre a Red creole com a Texas early.

Ao analisarmos o grupo tratado com o controle fica evidente a diferença entre os grupos, para todas as alterações cromossômicas evidenciadas, isso se deve a ação citogenotóxica comprovada do sulfato de cobre (CAMPOS; OLIVEIRA; SCHEVEITZE, 2017; GUECHEVA, 2002; KNAPIK; MORGANA, 2013).

Ao compararmos as variedades do grupo controle (Tabela 2) percebe-se que houve diferenças entre as variedades Red creole e Texas early e entre as variedades White creole e Texas early, sendo a diferença mais significativa entre as duas primeiras, isso se justifica porque existe diferenças entre as variedades que são inerentes as características as quais foram destinadas porque respondem de forma diferente as especificidades das situações de cultivo como condições climáticas, edáficas, patogênicas, manejo agrônomo, entre outras.

Vários autores têm concordado que os níveis de citotoxicidade podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do índice mitótico (IM) (AKINBORO; BAKARE 2007; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014). Todos concordam que a citotoxicidade é prejudicial à célula podendo conduzir a uma proliferação desordenada sendo essas alterações decorrentes da ação química no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos a determinados compostos químicos. Segundo Grant (1978) concentrações elevadas desses compostos, pode interromper totalmente a divisão celular. Ainda segundo ele, esses compostos embora não necessariamente afetem o DNA diretamente, inibem a formação e função do fuso mitótico.

Em relação ao grupo tratado, não foram evidenciadas diferenças entre as variedades investigadas, contudo sabe-se que o Sulfato de cobre é um agente aneugênico e clastogênico (KRISHNA; HAYASHI, 2000; BONASSI *et al.*, 2006; SAMANTA; DEY, 2012; CIMINI *et al.*, 2002) e portanto, a similaridade quanto a suscetibilidade deste agente tóxico era um resultado esperado, contudo ao analisarmos os grupos tratados com o controle verifica-se como esperado que houve diferença entre os grupos, comprovando mais uma vez que o sulfato de cobre é um agente causador de danos celulares.

Variedade	Tratamento	
	Grupo Tratado (Sulfato de Cobre)	Grupo Controle (H ₂ O)
Red Creole	6,64 ± 4,9 ^a	9,18 ± 4,15 ^{a, d}
White Creole	4,18 ± 2,39 ^b	14,36 ± 8,88 ^{b, e}
Texas Early	4,98 ± 4,05 ^c	31,56 ± 14,04 ^{c, d, e}

Tabela 2. Índice mitótico em células meristemáticas das variedades Red creole (RC), White creole (WC) e Texas early (TE) *Allium cepa*, expostas, a mesma concentração de sulfato de cobre*, em comparação ao controle

*(0,001 g/L). Teste t Student. Letras iguais na mesma linha ou coluna apresentam diferenças estatísticas, a= p<0,05; b= p< 0,01; c= p< 0,001.

Todavia, ao comparar-se as Tabelas 1 e 2 referente à variedade Red creole identifica-se que a mesma apresenta uma maior resistência ao sulfato de cobre, uma vez que seu índice mitótico foi superior as outras duas variedades (Tabela 1) e a ocorrência de alterações citogenotóxicas foi menor (Tabela 2), possivelmente por ser a variedade Red creole menos suscetível ao sulfato de cobre, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativo.

Ainda analisando ambas tabelas, que a variedade Texas early expressa ser mais sensível a ação do sulfato de cobre, uma vez que dentre as variedades submetidas ao tratamento foi a que mais sofreu, afetando o índice mitótico com maior incidência de alterações citogenotóxicas.

Para Schneiderman *et al.* (1971), a redução do IM pode ser atribuída a inibição da síntese de DNA, devido ao bloqueio da fase G1 ou bloqueio em G2, evitando a entrada da célula em mitose ou ainda, segundo Mercykuty; Stephen (1980), pelo bloqueio da síntese de nucleoproteínas, as diferentes fases da mitose são demonstradas na Figura 2.

Kirsch-Volders (1984), substâncias com esses efeitos são menos documentadas do que mutágenos que interagem diretamente com o DNA o fato de que chamando a atenção para o fato de que o efeito na divisão celular é similar ao promovido pela colchicina, que promove a destruição dos microtúbulos do ciclo celular bem como, os metais (e.g. chumbo, zinco, organomercuriais) podem inibir a síntese de microtúbulos e/ou destruir microtúbulos pré-formados, bem como agir sobre enzimas necessárias para um processo normal de divisão celular.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam que o sulfato de cobre apresenta potencial citogenotóxico atuando de forma diferenciada entre as variedades analisadas. Contudo, é imprescindível aprofundar os estudos nessa perspectiva almejando compreender melhor os níveis de suscetibilidade das variedades de *A. cepa L.*, além de averiguar se o diferencial de sensibilidade desempenhado seguirá

um padrão independentemente das substâncias químicas aplicadas.

Portanto, a investigação da sensibilidade das variedades deve ser considerada a fim de estabelecer padrões de suscetibilidade no que se refere à avaliação dos efeitos tóxicos. Consequentemente, resultados positivos ou não encontrados em bioteste utilizando *Allium cepa* devem ser considerados com cautela, uma vez que dependendo da variedade escolhida, os resultados podem ser tendenciosos para refutar ou confirmar uma ação de um agente estudado. Portanto, o aprofundamento torna-se primordial almejando averiguar como essa multiplicidade pode afetar resultados de pesquisas que admitem a mesma metodologia em variedades distintas de *Allium cepa* L.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. R. de. **Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulaas em *Paspalum notatum* Flüggé**. Dissertação. Santa Maria, RS: UFSM, 2014. 94p.

AKINBORO, A. BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112. p. 470-475, 2007.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p.111–172, 2000.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**. n. 560, p. 57-67, 2004.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 135p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C. da; MACHADO NETO, J.G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 55-64, 2005 jan./dez.

BRASIL, M. M. A. **Resolução CONAMA n. 397**, 03 de abril de 2008. Brasília, DF: MMA, p. 68-69, 2008.

CAMPOS, F. F. de. OLIVEIRA, L. P. de. SCHVEITZE, B. Tolerância do *Pinus teada* inoculado com fungos ectomicorrizicos (fECM), sob diferentes concentrações de cobre. **Revista brasileira de geografia física**, v.10. n. 2. p. 512-520. 2017.

CHASIN, A. A. da M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, p. 127-163, 2003.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. In: COMBES, R.D. **Chemistry & Industry**, v. 24. p. 950-954, 1992.

COSTA, M. H. P. da; SILVA, P. C. C.; ROCHA, C. A. M. da. Efeitos do cromo hexavalente sobre o crescimento de raízes e ciclo celular no meristema da ponta da raiz de *Allium cepa*. 2016. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 6, n. 3. p. 40-44, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA – Embrapa hostaliças. Como plantar cebolas

– cultivares, 2019.

FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88. p. 252-259. Jul, 2007.

FISKEJO, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102. May, p. 99-112, 1984.

GUECHEVA, T. N. **Avaliação do potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planária**: utilidade deste organismo para biomonitoramento ambiental. Tese. 2002. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2002. 120p.

GUERRA, T. A. **Cobre**: deficiência e intoxicação. Seminário. 2008. Porto Alegre, RS:UFRGS, 2008, 8p, 2008.

SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. 132p.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A reporto f the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutat Res.**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

KNAPIK, L. F. O.; MORGANA, A. **Avaliação de toxicidade de três susbtâncias de referência ao microcrustáceo *Daphnia magna***, 69p. Monografia. 2013. Curitiba, PR: UTFPR, 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos**: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

LEBRE, R.; RUIZ, V.; LEITÃO, S; SANTOS, R.; PORTO, A. Intoxicação aguda por sulfato de cobre. **Medicina interna**. v. 12, p. 220-224, out/dez. 2005.

LEME, D. M. MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutat Res.**, v. 682, n. 1. p. 71-81. Jul-Ago, 2009.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C. et al. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (*Imburana-de-cheiro*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.3, p.415-422, 2013.

MACEDO, J. F. de M.; SILVA, M. S.; BATISTA, N. J. C.; UCHOA, V. T.; ALVES, W. dos S.. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste *Allium cepa*. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 1, art. 2, p. 15-28. Jan./Jul., 2014.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

MANZANO, B. C. **Avaliação dos potenciais citotóxicos, genotóxico e mutagênico das águas do Ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, após o recebimento de efluentes urbanos**. 126p. Dissertação, 2010. Rio Claro, SP: UNESP, 2010.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas testes de *Allium cepa* e cultura de células de mamíferos**. 144p. Dissertação, 209. Rio Claro: UNESP, 2009.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. de C.A. Reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**. Campinas, SP: UNICAMP, 1978. v. 30, n. 6, p. 665-676. Jun. 1978.

MELLO, M. L. S.; JUNQUEIRA, A. C.; MARIA, C. C. J. *et al.* **Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermóneges Freitas Leitão Filho (1998 a 2004)**. In: I Congresso de meio ambiente Paulínia e região metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais - CD-Rom. Campinas: UNICAMP, 2004. p. 1-8.

MITTEREGGER-JÚNIOR, H.; FERRAZ-DIAS, J.; LÚCIA-YONEMA, M. *et al.* Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira-calçadista, utilizando *Allium cepa*. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, 147-151, 2006.

PEREIRA, J. C. da S. **Estudo alelopático, fitoquímico e genotóxico de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. e *Combretum leprosum* Mart. em *Allium cepa***. 69p. Dissertação. 2015. Mossoró, RN: UFERSA/UFRN, 2015.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R. *et al.* Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, p. 171-175, 2006.

SAMPAIO, F. G.; BOIJINK, C. de L.; RANTIN, F. T. **O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos**: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce. Jaguariúna, SP: Embrapa, 2013. 101p.

SANTOS, Igor Cassimiro dos. **Introdução ao mecanismo molecular do câncer, tratamento e prevenção**: uma revisão da literatura. Monografia. 2015. Recife, PE: UFRPE, 2015. 82p.

SANTOS, S. C. dos; OLIVEIRA, U. A. de; TRINDADE, L. de O. R. *et al.* Genotypes selection for plant bioassays using *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. **Pak. J. Bot.**, v. 49, n. 6, p. 2201-2212, 2017.

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J. N. *et al.* Two new ternary complexes of copper (II) with tetracycline or doxycycline and 1, 10-Phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

SOUSA, M. A. N. de; PINHEIRO, M. J. da C.; SILVA, R. K. da *et al.* Avaliação da qualidade da água dos reservatórios de Santa Cruz e Umari – RN: citotoxicidade e genotoxicidade. **Revista saúde e ciência**. v. 3, n. 3, 2014.

TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M.; VERNET, G. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. **Ecotox. Environ. Safety.**, v. 40, p. 194-200, 1998.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. New York, v. 35, p. 206-221, 2000.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2008. 472 p.

ZAGATTO, P. A. *et al.* Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. **Revista SABESP**, n. 166, p. 01-06, 1992.

COMO SURGEM NOVAS ENZIMAS? EVOLUÇÃO MOLECULAR DE NOVAS CÓPIAS GÊNICAS NA SUPERFAMÍLIA DAS RODANASES EM DIPTERA

Luana Sousa Soares

Universidade Federal de Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Biológicas
Jataí - Goiás

Iderval da Silva Júnior Sobrinho

Universidade Federal de Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Biológicas
Jataí - Goiás

RESUMO: A superfamília Rodanase contém proteínas com diferentes funções, o que a torna interessante para estudar a evolução de neofuncionalizações após duplicações gênicas. Apesar dos estudos sobre a organização estrutural e funções dos membros da superfamília Rodanase, os processos evolutivos que levaram à neofuncionalização não foram totalmente compreendidos. Assim, estudamos a evolução molecular da adenililtransferase e sulfotransferase MOCS3 e da tiosulfato sulfotransferase (TST) de precursores com função de *heat shock*, focando nos padrões de restrição seletiva e divergência funcional promovida pela seleção natural. Obtivemos sequências Diptera bem caracterizadas das bases de dados Pfam-Embl e Genbank. Alinhamos as sequências e estimamos as relações filogenéticas por máxima verossimilhança. Testamos a presença de sinais de seleção positiva usando a estratégia

do *branch-site* teste, realizando o teste em duas condições: (a) no ramo onde a nova função do MOCS3 evoluiu pela aquisição de novo domínio; e (b) no ramo onde a função TST evoluiu de proteínas *heat shock*, sem aquisição de novos domínios. Apesar da expectativa de encontrar seleção positiva atuando no ramo com ganho de um novo domínio, a diversificação por seleção positiva foi detectada apenas no ramo em que a neofuncionalização ocorreu sem sua aquisição. Neste evento de neofuncionalização, o teste Bayes Empirical Bayes detectou doze sítios que evoluíram sob seleção positiva, um deles dentro do domínio catalítico. Considerando que as proteínas semelhantes a Rodanase com função de TST representam duplas cópias de genes parálogos, a seleção natural deveria ter sido relaxada nessas cópias, permitindo mudanças mesmo no domínio catalítico conservado.

PALAVRAS-CHAVE: seleção natural, duplicação gênica, superfamília gênica, adenililtransferase e sulfotransferase MOCS3, tiosulfato sulfotransferase.

ABSTRACT: Rhodanese superfamily contains proteins with different functions, which turns it an interesting group to study the evolution of neofunctionalization after gene duplications. Despite of studies on the structural organization and functions of members from Rhodanese superfamily, the evolutionary processes

that led to the neofunctionalization was not fully understood. Therefore, we studied the molecular evolution of adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3 and thiosulfate sulfurtransferase (TS) from precursors with heat shock function, focusing on patterns of selective constraints and functional divergence promoted by natural selection. We obtained well characterized Diptera sequences from Pfam-Esembl and Genbank databases. We aligned the sequences and estimated the phylogenetic relationships among sequences by maximum likelihood. We tested for the presence of positive selection signals using the branch-site-test strategy, performing the test in two conditions: (a) in the branch where new function of MOCS3 evolved by the acquisition of new domain; and (b) in the branch where TS function evolved from heat shock proteins without the acquisition of any new characterized domain. Despite the expectation of finding positive selection acting on the branch with gain of a new domain, diversification by positive selection was only detected in the branch where the neofunctionalization occurred without its acquisition. In this neofunctionalization event Bayes Empirical Bayes test detected twelve sites that evolved under positive selection, three of them within the catalytic domain. Considering that Rhodanese-like proteins with TS function represent duplicated paralogous gene copies, natural selection should have been relaxed in these copies, allowing changes even in the conserved catalytic domain.

KEYWORDS: natural selection, gene duplication, gene superfamily, adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3, thiosulfate sulfurtransferase.

INTRODUÇÃO

A herbivoria é uma interação biótica específica do tipo predador-presa comumente observada entre diversos grupos de animais e plantas, especialmente entre os insetos. A herbivoria teve um efeito marcante na diversidade dos insetos, tornando os insetos herbívoros um dos grupos animais mais diversos por possibilitar explorar diferentes recursos, como alimento e proteção, ou mesmo para completar seu ciclo de vida (FUNK; FILCHAK; FEDER, 2002; GULLAN; CRANSTON, 2017 ; WARD; HACKSHAW; CLARCKE, 2003)

As plantas desenvolveram formas de defesa contra esses herbívoros, ativando um conjunto de respostas altamente reguladas, resumidas em duas principais: (1) as defesas diretas, envolvidas com a produção de aleloquímicos, e (2) as defesas indiretas envolvidas na produção de metabólitos que atraem inimigos naturais dos fitófagos, frequentemente parasitóides e predadores (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007; MITHOFER; BOLAND, 2012;.

Uma defesa direta comumente usada pelas plantas é o uso de glicosídeos cianogênicos, presente em mais de 2500 plantas. Normalmente, os glicosídeos cianogênicos são armazenados nos vacúolos, quando o tecido da planta é destruído por ataque de herbívoros mastigadores, eles entram em contato com enzimas que os hidrolisam em cianeto de hidrogênio (HCN) (ZAGROBELNY et al., 2004). Esta é uma

das substâncias mais tóxicas conhecidas e tem afinidade pela oxidase terminal na cadeia transportadora da mitocôndria, podendo ser letal a vários insetos (BRATTSTEN et al., 1983).

Os insetos, por sua vez, desenvolveram diversas estratégias para evitar os mecanismos de defesas das plantas, algumas simples, outras mais complexas e específicas, entrando em uma corrida armamentista com as plantas. Eles podem evitar a fitotoxina ou mesmo escolher locais da planta nos quais há menor concentração do composto (DAOUST et al., 2010; NEALIS; NAULT, 2005). O inseto pode até mesmo manipular o mecanismo de defesa da planta (BEDE et al., 2006; NYMAN; JULKNEN-TIITTO, 2000; MUSSER et al., 2002). Quando não há possibilidade de evitar a ingestão das fitotoxinas se faz necessária a desintoxicação metabólica (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007; NISHIDA 2002).

As enzimas que normalmente estão envolvidas na desintoxicação metabólica são pertencentes a três famílias gênicas, sendo as carboxilesterases (COEs), as glutathione S-transferases (GSTs) e as citocromo monooxigenases P450 (P450, CYPs para os genes). Porém há outras duas que podem estar envolvidas diretamente com a desintoxicação de glicosídeos cianogênicos, são elas a β -cianoalanina sintase e principalmente algumas enzimas da superfamília rodanase, as tiosulfato:cianeto sulfotransferase (TST) também chamadas de rodanase (BEESLEY; COMPTON; JONES, 1985; DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007; ZAGROBELNY et al. 2004; ZHANG; MA; FENG, 2012).

SUPERFAMÍLIA RODANASE

A rodanase está distribuída na natureza, sendo encontrada nos três principais filos evolutivos. A enzima mais bem caracterizada é a rodanase bovina (PLOEGMAN et al., 1978, 1979). Rodanase, também chamada de tiosulfato:cianeto sulfotransferase (TST, EC 2.8.1.1) é uma enzima que catalisa a transferência de um átomo de enxofre a um aceptor, do tiosulfato para o cianeto (PLOEGMAN et al., 1979). O termo rodanase vem do alemão para tiocinato com 'ase' indicando que esse composto foi formado a partir de uma reação enzimática (CIPOLLONE; ASCENZI; VISCA, 2007).

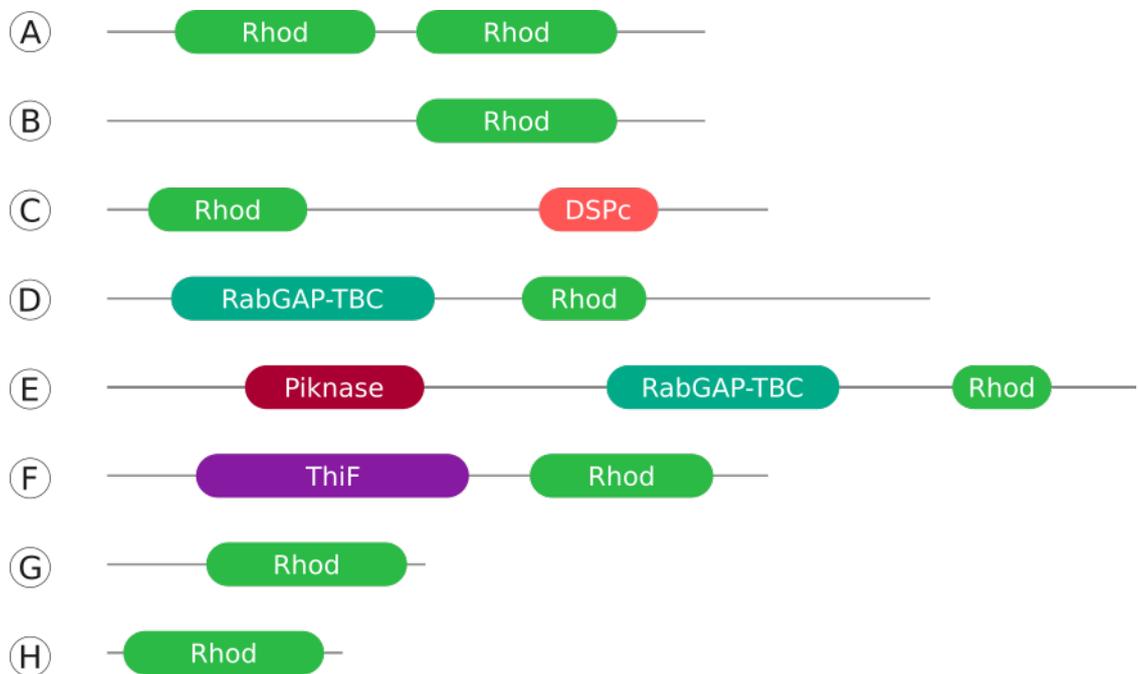


A rodanase faz parte da superfamília Rodanase que abriga todas as proteínas tipo rodanase, que compartilham o mesmo domínio Rhod (Figura 1). Apesar de apresentarem um mesmo domínio em comum, são proteínas altamente heterogêneas estruturalmente e funcionalmente (BORDO, 2002). Frequentemente o domínio Rhod está combinado com outros domínios característicos (Figura 1) (CIPOLLONE; ASCENZI; VISCA, 2007).

Estruturalmente as proteínas do tipo rodanase são compostas por um ou dois domínios rodanase. Normalmente quando há a presença de dois domínios, apenas um é

funcional. O domínio catalítico apresenta um resíduo de cisteína catalítica, o qual é o primeiro resíduo dos seis aminoácidos da alça do sítio ativo (BORDO, 2002).

As proteínas integrantes dessa superfamília podem ser divididas em quatro grupos estruturais: (1) proteínas com apenas um domínio rodanase, entre elas as proteínas heat shock (PHS), e a própria TST (Figura 1-G e H); (2) proteínas com domínios em tandem, como as 3-mercaptopiruvato:cianideo sulfotransferases (Figura 1- A); (3) proteínas com multidomínios, além do domínio rodanase com suas propriedades funcionais, a presença de outros domínios como o ThiF, DSP e UBP, entre outros (Figura 1 – C, D, E e F); e (4) proteínas com alça do sítio ativo alongadas, como as fosfatases cdc25 (Figura 1 – B) (BORDO, 2002; CIPOLLONE; ASCENZI; VISCA, 2007). Apesar do grande conhecimento estrutural das rodanases, há poucos estudos que envolvem suas relações filogenéticas e quais foram os mecanismos evolutivos da diferenciação das funções da proteína.



- | | |
|---|--|
| Ⓐ 3-mercaptopiruvato:cianideo sulfotransferases | Ⓔ Ligação de ATP |
| Ⓑ Fosfatase tirosina | Ⓕ Adenilitransferase e sulfurtransferase MOCS3 |
| Ⓒ Fosfatase de dupla especificidade | Ⓖ <i>Heat shock</i> |
| Ⓓ Ativadora de GTPase | Ⓗ Tiosulfato sulfurtransferase |

Figura 1. Organização de domínios dos grupos de proteínas da Superfamília Rodanase.

EVOLUÇÃO DE FAMÍLIAS GÊNICAS

Famílias gênicas são grupos de genes descendentes de um ancestral comum que retêm sequências similares e/ou frequentemente funções similares, tanto para genes dentro de um genoma (cópia paráloga) e para genes relacionados entre genomas

(ortólogos e parálogos)(DAYHOFF et al., 1975; DEMUTH; HAHN et al., 2009):

As famílias geralmente surgem a partir de genes órfãos (AMIRI, 2003) e podem surgir de três maneiras diferentes: (I) cópias duplicadas que se tornam suficientemente divergentes e não são reconhecidas como membros da mesma família (SCHMID; AQUADRO, 2001); (II) genes transferidos horizontalmente (i.e transferência de material genético para outra célula que não é sua descendente) (HALL; BRACHAT; DIETRICH, 2005) e (III) novos genes a partir de sequências não-codificantes (BEGUN et al., 2007; DEMUTH; HAHN et al., 2009). A duplicação gênica é o principal mecanismo na conseguinte evolução de uma família gênica (DAYHOFF et al., 1975; MAGADUM et al., 2013). Depois da duplicação, as cópias podem ter diversos destinos diferentes. Os principais destinos são a pseudogenização (i.e. perda de função a partir de mutações deletérias) (Figura 2-A), a conservação da função (Figura 2-C), a subfuncionalização (Figura 2-D) e a neofuncionalização (Figura 2-B) (INNAN; KONDRASHOV, 2010; MAGADUM et al., 2013).

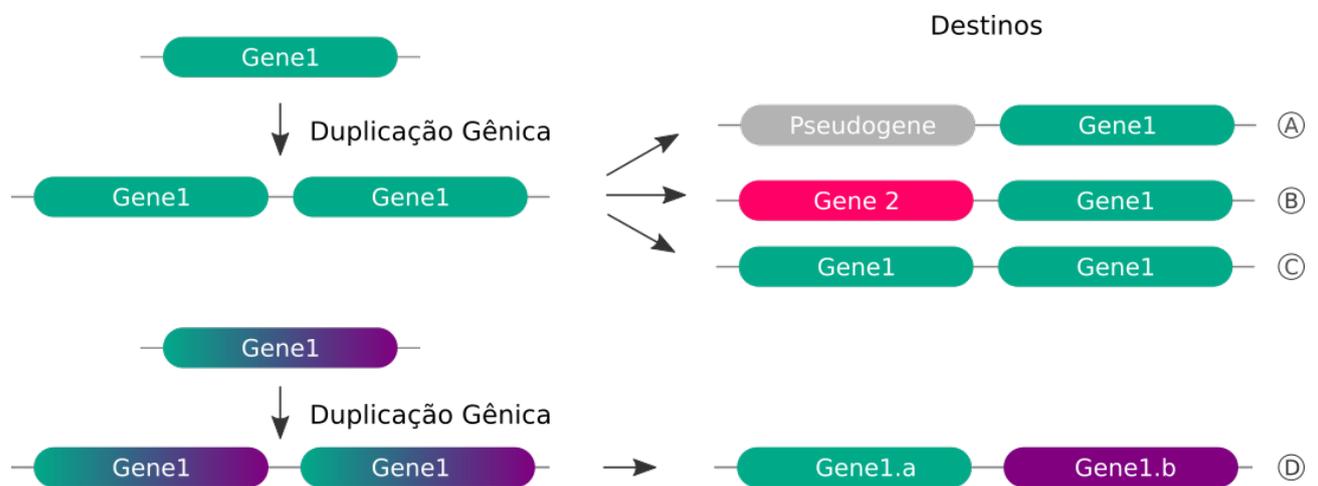


Figura 2. Principais destinos de genes duplicados. A – pseudogenização, B- neofuncionalização, C- conservação gênica, D- subfuncionalização.

Há vários modelos evolutivos capazes de explicar esses destinos, que podem ser classificados em principalmente três categorias (INNAN; KONDRASHOV, 2010). A primeira categoria contém os modelos que assumem as duplicações que não causam efeitos no valor adaptativo, deixando a fixação da cópia duplicada como um processo neutro. A principal característica dos modelos dessa categoria é que após a duplicação, há uma redundância entre as cópias, assim a seleção natural se afrouxa, permitindo que modificações ocorram, sendo a maior parte neutra. Dessa forma, pode-se levar facilmente à pseudogenização de pelo menos uma das cópias. Quando isso não ocorre, é possível os outros destinos (FORCE et al., 1999; OHNO et al., 1970; HUGHES 1994).

Nos modelos da segunda categoria, a duplicação por si só é vantajosa. São possíveis três razões para esse tipo de adaptação: benefício no aumento da dosagem do produto gênico, mascaramento de mutações deletérias e oportunidade

de surgimento mediado de uma nova função, normalmente sendo todas mediadas, predominantemente, por seleção positiva. Por último, a categoria que abriga os modelos na qual a duplicação ocorre em um gene polimórfico, e o aumento de variabilidade na população é vantajosa, promovendo rapidamente a fixação da cópia (INNAN; KONDRASHOV, 2010).

Apesar dos estudos comparando as funções, sequências e estruturas tridimensionais das proteínas do tipo rodanase, ainda há poucos trabalhos elucidando os mecanismos evolutivos que levaram a Superfamília Rodanase ao seu grande número de proteínas com funções tão diversificadas e presentes em quase todos os organismos.

OBJETIVOS

Tivemos como objetivo analisar o padrão de evolução molecular de adeniltransferase e sulfotransferase (MOCS3) e tiosulfato sulfotransferase (TST) pertencentes a superfamília Rodanase, utilizando o grupo dos Diptera como modelo evolutivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Testar a expectativa de que o sinal de seleção positiva pode ser detectado em ramos que representem o surgimento de novas funções nas proteínas da família gênica das rodanases, sendo um ramo em que evoluiu a neofuncionalização sem surgimento de novo domínio (TST) e no ramo no qual evoluiu a neofuncionalização pela aquisição de novo domínio (MOCS3).

– Testar como TST e MOCS3 se comportam após a duplicação e a neofuncionalização.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sequências

Utilizamos os dados de sequências de proteínas da superfamília Rodanase depositadas no Pfam sob o código PF00581. Focamos nos dados de Diptera, por ser um dos grupos mais bem estudados quanto à organização genômica dos genes da superfamília Rodanase.

A partir dos números de acessos das proteínas, fornecidos pelo Pfam, obtivemos as respectivas sequências codificantes completas de aminoácidos e de DNA a partir do Uniprot, Genbank (NCBI) e Embl. A partir do alinhamento de aminoácidos, realizado pelo PRANK v. 140603 ³⁶(LÖYTYNOJA; GOLDMAN, 2010), geramos uma árvore filogenética pelo método da Máxima Verosimilhança, utilizando o software MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) (Figura 3).

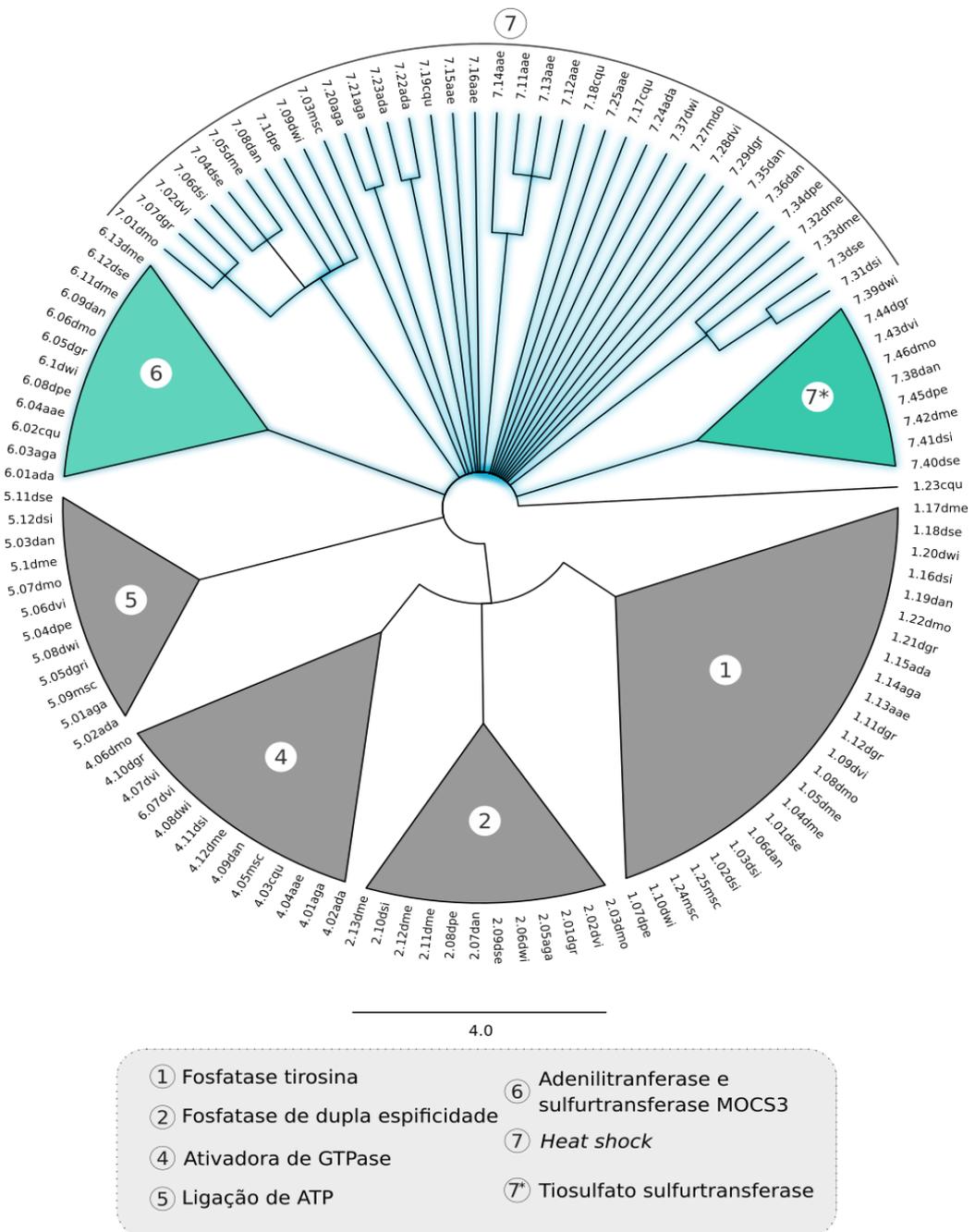


Figura 3. Árvore filogenética gerada a partir de alinhamento de aminoácidos dos genes com o domínio Rodanase em Diptera. Os ramos marcados em azul foram utilizados nas análises. Os números indicam as funções de cada proteína da superfamília da Rodanase.

A partir dessa primeira estimativa da relação filogenética entre as sequências das linhagens de Diptera, escolhemos as linhagens marcadas em azul na Figura 3. Nestas linhagens estão representadas proteínas da superfamília Rodanase que possuíam o domínio da rodanase, mas que evoluíram para três funções diferentes. Para as análises subsequentes utilizamos apenas as sequências de DNA (58 sequências de 14 organismos). Esquema da obtenção das sequências pode ser observado na Figura 4.

Alinhamos estas sequências de DNA por análise códon a códon pelo software PRANK v. 140603 (LÖYTYNOJA; GOLDMAN, 2010). O alinhamento de sequências de

DNA torna-se problemático quando se lida com sequências muito divergentes, como aquelas encontradas na superfamília Rodanase. Dessa forma, adotamos a estratégia de alinhamento em blocos, criada em nosso laboratório. Nesta estratégia separamos regiões de maior similaridade em grupos isolados, sendo cada grupo de similaridade alinhado separadamente para ser posteriormente reagrupado, de forma a restaurar a sequência completa do gene.

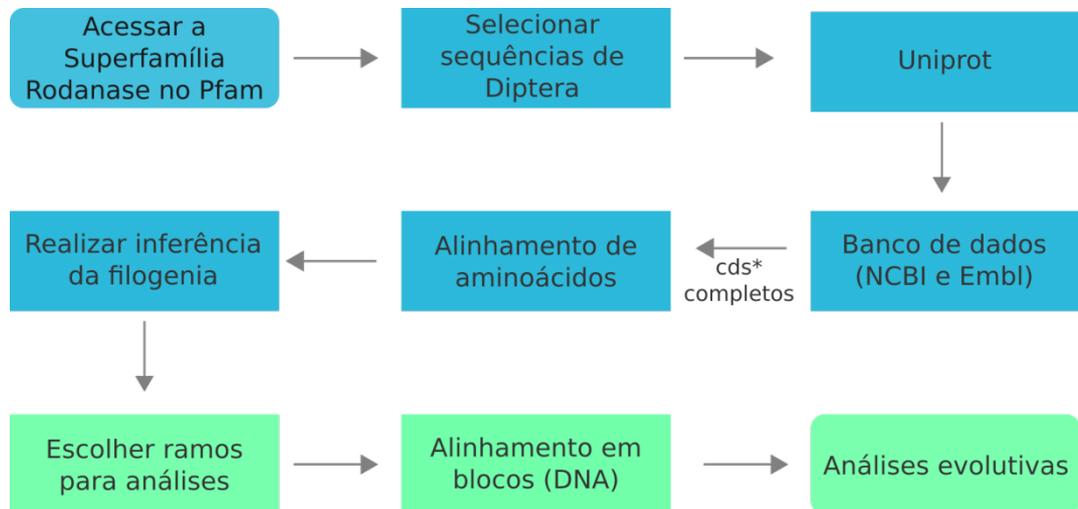


Figura 4. Esquema de obtenção das sequências. *Sequências codificantes

Inferimos a filogenia por máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo GTR+G+I (General Time Reversible, com distribuição gama e com sítios invariáveis). A estimativa do modelo evolutivo e a inferência da filogenia por foi realizada no software MEGA7.0.26 (KUMAR; STECHER; TAMURA et al., 2016).

ANÁLISE DO PADRÃO DE EVOLUÇÃO MOLECULAR

Em famílias gênicas com várias cópias parálogas, espera-se um relaxamento da restrição seletiva sobre as cópias gênicas após um evento de duplicação, facilitando a diversificação de uma delas por seleção natural. Portanto, a expectativa seria a de que o sinal de seleção positiva pudesse ser detectado em ramos que representassem o surgimento de novas funções nas proteínas dessa família gênica. Em nosso estudo, o teste de seleção positiva (*branch-site test*), foi aplicado em dois ramos distintos da filogenia estimada anteriormente, cada qual representando uma forma distinta de neofuncionalização da cópia paróloga: (1) no ramo no qual evoluiu a neofuncionalização sem surgimento de novo domínio (tiosulfato sulfurtransferase) (*foreground 1*) e (2) no ramo no qual evoluiu a neofuncionalização pela aquisição de novo domínio (domínio ThiF em adenililtransferase e sulfurtransferase MOCS3) (*foreground 2*). Em cada perfil de análise os demais ramos excluídos dos *foregrounds* foram denominados *backgrounds*, sendo usados para as comparações dos testes.

O *branch-site test* baseia-se na comparação entre o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS) e o número de substituições não-sinônimas por sítio

não-sinônimo (dN). Substituições sinônimas são substituições de sítios fixadas em uma linhagem evolutiva, na qual não ocorreu alterações na sequência do aminoácido. Por outro lado, nas substituições não-sinônimas o aminoácido é modificado. Em um modelo no qual a seleção natural não está atuando, a razão esperada entre as taxas de substituições sinônimas e não sinônimas é de 1 ($dN/dS = 1$), pois a taxa de fixação é praticamente igual entre os dois tipos de substituição. Se a sequência estiver sob seleção purificadora, a taxa de substituições sinônimas será maior que a taxa de substituições não-sinônimas ($dN/dS < 1$), indicando que o códon ou a região gênica está sob uma restrição seletiva. Por outro lado, se a taxa de substituições não-sinônimas for maior que a taxa de substituições sinônimas, a sequência está sendo selecionada positivamente ($dN/dS > 1$), indicando que a seleção natural está favorecendo a divergência adaptativa de uma determinada região gênica.

Assim, no *branch-site test* verificamos a razão dN/dS nos dois ramos especificados tendo como hipótese nula de que a diferenciação observada entre as cópias parálogas deveu-se apenas pela ação da deriva genética, caracterizando uma evolução neutra. Essa hipótese foi tratada em um modelo nulo, chamado de M1a, no qual os códons podem apenas evoluir por seleção purificadora ($dN/dS < 1$) ou neutramente ($dN/dS = 1$). A hipótese alternativa considera que a diferenciação observada entre os parálogos ocorreu pela ação da seleção natural, promovendo a neofuncionalização de um dos parálogos. Esta hipótese foi tratada em um modelo, chamado de MA, que permite a evolução dos códons também por seleção positiva ($dN/dS > 1$). O *branch-site test* foi realizado no software CODEML implementado no pacote PAML 1.40603 (YANG, 2007; ZHANG; WONG; NIELSEN, 2005). Os testes foram contrastados através de um teste de razão de verossimilhanças (LRT – *likelihood ratio test*), utilizando o valor de $\ln L$ (log do *likelihood*) de cada modelo.

Para os dois ramos foram estimadas a presença de seleção positiva em códons individuais, utilizando o teste *Bayes Empirical Bayes* (BEB) acoplado ao *branch-site test* (YANG; WONG; NIELSEN, 2005). Também realizamos o *site-test* separadamente em cada ramo, utilizando o software Selecton (STERN et al., 2007).

RESULTADOS

Evolução molecular pós duplicação gênica

A duplicação gênica é um dos principais mecanismos da evolução de famílias gênicas. Um dos possíveis destinos das cópias é a evolução de novas funções a partir de substituições na sequência de DNA, com ou sem o ganho de novos domínios funcionais. Dessa forma, testamos a expectativa de que o sinal de seleção positiva pudesse ser detectado em ramos que representassem o surgimento de novas funções nas proteínas da família gênica das rodanases.

As duas linhagens evidenciadas na Figura 5 foram usadas como os *foregrounds* utilizados no *branch-site* teste. Foram utilizados os modelos nulos M1a e MA restrito e

modelo alternativo MA usados para contraste em cada *foreground*. Há três proporções para cada modelo. Sendo eles, p^1 são proporções de códons em seleção purificadora, p^2 evolução neutra e p^{3+4} seleção positiva. Normalmente espera-se que a maior proporção de códons seja de códons em seleção purificadora, porém, no *foreground* 2, há uma maior proporção de códons em seleção positiva.

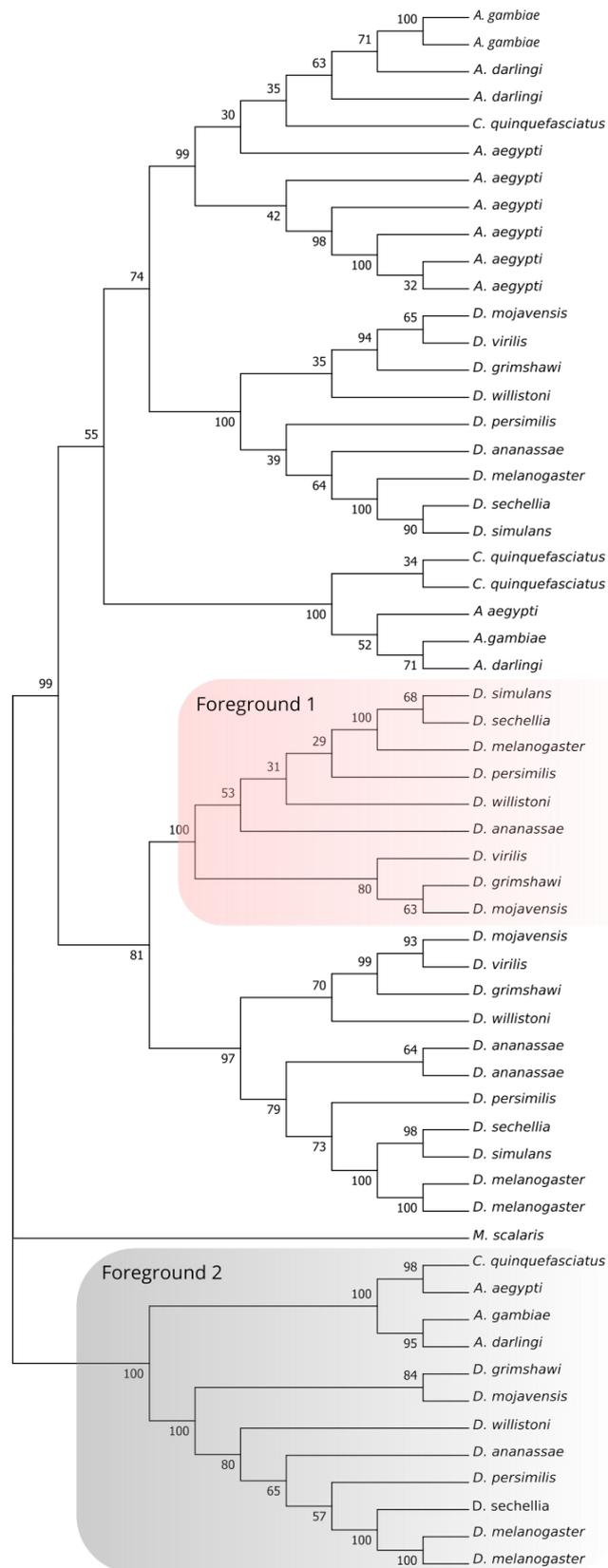


Figura 5. Árvore filogenética estimada a partir do método de Máxima Verosimilhança para a análise de seleção positiva. A área evidenciada em vermelho indica o ramo foreground no qual as proteínas evoluíram para novas funções sem ganho de domínio aparente e a área

evidenciada em cinza indica, o ramo foreground em que as proteínas ganharam um domínio.

Os modelos nulo (ausência de seleção positiva) e alternativo (presença de seleção positiva) foram contrastados utilizando o valor de LNL pelo teste de LRT (Tabela 1). No *foreground 1*, o modelo MA foi significativo no contraste entre o M1a e MA null ($p = 0.003$ e $p = 0.00004$ respectivamente), evidenciando evolução por seleção positiva nessa linhagem. Entre os contrastes com o *foreground 2*, não houve diferença significativa (Tabela 1).

A análise do *Bayes Empirical Bayes*, utilizando o *foreground 1*, mostrou que doze códons estavam sendo selecionados positivamente ($P > 95\%$), sendo quatro com mais de 99% de probabilidade (Tabela 1). Na Figura 6 podemos observar o alinhamento dessa linhagem com os respectivos códons em seleção. Curiosamente, um desses códons está no sítio catalítico da enzima, região essa que normalmente é a mais conservada da proteína.

<i>Foreground</i>	Contraste	GI	LRT	Códons selecionados positivamente (BEB)
2	M1a x MA	2	4.438	
	MA null x MA	1	0.319	
1	M1a x MA	2	20.135*	964, 969, 970, 978, 1024, 1030, 1038,
	MA null x MA	1	8.676**	1041, 1042, 1063, 1070, 1081.

Tabela 1. Contraste dos modelos M1a, MA restrito e MA por LRT

* $p < 0.003$ ** $p < 0.00004$. Códons marcados em negrito com $p > 99\%$

A partir desses resultados deduzimos que a evolução da nova função de TST das proteínas do tipo rodanase, foi predominantemente por seleção positiva, porém para a função de MOCS3 não há sinal significativo de seleção positiva promovendo sua mudança.

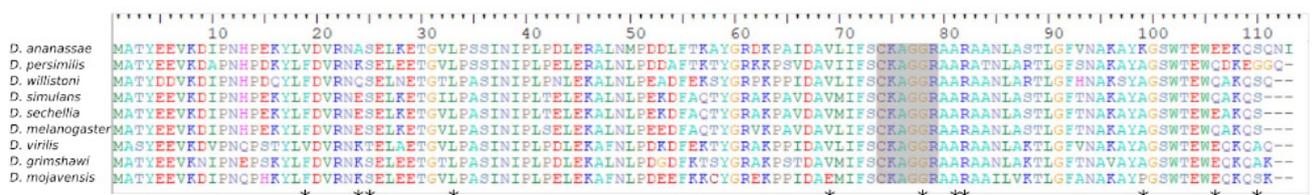


Figura 7. Alinhamento do ramo foreground 1, linhagem TST. * - Sítios selecionados positivamente. Evidenciado em está o sítio catalítico



Figura 8. Análise de padrão de seleção por códon (site-test) em MOCS3 (1) e TST (2). Evidenciado em rosa estão os domínios Thif e Rhod, em cinza (A) e (B), domínios conservados similares nas duas linhagens.

EVOLUÇÃO MOLECULAR PÓS NEOFUNCIONALIZAÇÃO

Após a duplicação em famílias gênicas é comum encontrar um padrão em que as cópias parálogas evoluem por uma seleção purificadora mais relaxada e se diversificam posteriormente por seleção positiva (KAESSMANN et al., 2010). Depois da neofuncionalização, espera-se que a seleção natural por trás desse evento, torne-se purificadora, mantendo a nova função adquirida (INNAN, KONDRASHOV, 2010). Para testar como TST e MOCS3 se comportaram após a duplicação e a neofuncionalização, realizamos o *site test* dentro de cada grupo. O resultado deste teste não mostrou qualquer códon sendo selecionado positivamente, indicando uma predominância de códons sob seleção purificadora (Figura 7). Na Figura 7 ainda é possível observar duas regiões (A e B) mais conservadas no domínio Rhod, sendo uma delas o domínio catalítico (A). Apesar da predominância da restrição seletiva, a seleção purificadora ocorreu de forma mais relaxada em alguns segmentos das MOCS3 e TSTs.

DISCUSSÃO

Padrão de seleção nas linhagens MOCS3 e TST.

Após eventos de duplicações dentro de famílias gênicas, o novo gene pode sofrer uma neofuncionalização com ou sem ganho de domínio (MAGADUM et al., 2013). Apesar da expectativa de encontrar seleção positiva nas duas formas de mudança de função, não encontramos sinal de seleção positiva na linhagem MOCS3, na qual

houve ganho de domínio em sua neofuncionalização. É possível que a diferenciação de função tenha ocorrido sob influência da seleção positiva em MOCS3, mas o teste *branch-site* poderia não ter o poder estatístico necessário para a detecção desse tipo de seleção dada a elevada divergência entre as sequências de MOCS3. Quando há grande divergência entre as sequências estudadas, o *branch-site* teste perde poder estatístico e não detecta sinais de seleção (YANG; REIS, 2011).

Por outro lado, detectamos sinal de seleção positiva para a linhagem de TST. Curiosamente alguns sítios sob seleção positiva foram identificados no sítio catalítico da enzima ou próximo a ele. Normalmente nessas regiões encontra-se apenas a seleção purificadora, impedindo que alterações se fixem, visto que pequenas mudanças podem ser capazes de alterar a estrutura da proteína ou afinidade com o substrato, ou seja, comprometendo a funcionalidade da proteína (CARLSON et al., 1994; HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; HANKS; HUNTER, 1995). Apesar de ser um padrão inesperado, a diversificação por seleção positiva em domínios conservados foi também observada em proteínas como DOUBLESEX (SOBRINHO; BRITO, 2012). Isso pode ser entendido a partir do processo do surgimento das novas cópias dentro da família gênica. Assim sendo, quando há duplicação gênica, a pressão seletiva se afrouxa, inclusive no sítio catalítico, pois possíveis mutações que alterariam o funcionamento da proteína, podem ser mantidas, visto que, há uma redundância das cópias. Esta redundância permite que uma das cópias desenvolva novas propriedades funcionais, enquanto a outra cópia é preservada em sua função ancestral (INNAN; KONDRASHOV, 2010; KAESSMANN, 2010; OHNO, 1970).

Origem das TST

Observando a filogenia (Figura 4) é possível verificar que as TST formam um grupo monofilético. Esse grupo surge a partir de proteínas mais diversas que também possuem o domínio Rhod, sendo algumas identificadas como proteínas *heat-shock* (PHS). Hipotetizamos então, que possivelmente as TST tenham se originado a partir das PHS, uma vez que estas últimas são proteínas mais inespecíficas (FEDER; HOFMANN, 1999), e não possuem grande especificidade a um único substrato (SUN; MACRAE, 2005). Essa inespecificidade pode ter sido um fator que tenha facilitado a evolução das TST como um grupo de proteínas mais especializado na transferência do sulfato, por não exigir mudanças radicais no momento da troca para afinidade por um substrato específico.

Esse tipo de evolução pode ser evidenciado pelo trabalho de Bordo (2002), no qual o autor verificou que a mudança mais expressiva entre as TST e fosfatases *cdc25*, da mesma família gênica das rodanases, era o ganho de um aminoácido no sítio catalítico das *cdc25*. Esse único aumento resultou em um sítio catalítico mais amplo, que foi capaz de acomodar um átomo de fósforo, quimicamente maior que um átomo de enxofre, possibilitando a reação de fosfatase em vez de sulfurtransferase.

O presente trabalho indica mudanças maiores, como evidenciado pelos 11 sítios sob seleção positiva, incluindo um dentro do sítio catalítico.

Apesar de o ramo monofilético indicar a evolução das TST a partir das proteínas menos especializadas, esta hipótese deve ser corroborada por uma análise mais ampla de toda a família gênica das rodanases, pois esta divergência pode ter sido mais antiga que a presente no ramo dos Diptera analisado aqui.

EVOLUÇÃO APÓS NEOFUNCIONALIZAÇÃO

Após eventos de duplicações e neofuncionalizações, um dos modelos esperados é o de que seleção purificadora mantenha as novas funções dos novos genes (FORCE et al., 1999; INNAN; KONDRASHOV, 2010). TST e MOCS3 mostram esse comportamento, evidenciado pelo padrão de seleção purificadora mostrado pelo *site-test* (não verificando seleção positiva). Este mesmo padrão é também evidenciado no contraste entre genes Acp (Proteínas da Glândula Acessória) e não-Acp de *Drosophila*, que mostra uma maior força da seleção purificadora após a duplicação gênica e uma possível neofuncionalização (ALMEIDA; DESALLE, 2008). Da mesma forma, no genoma do milho, foram encontrados genes regulatórios neofuncionalizados que experimentaram seleção purificadora (HUGHES; LANGDALE; KELLY, 2014).

Outros modelos sugerem que a seleção purificadora atua normalmente apenas na cópia ancestral, com a seleção positiva atuando na cópia neofuncionalizada. Este não parece ser o padrão de evolução das TST e MOCS3 do presente estudo, mas foi encontrado na evolução dos genes *Caf1-55* e *Caf1-55dup* de *Drosophila*. Neste caso, a seleção purificadora atuou fortemente na manutenção da função da cópia ancestral (*Caf1-55*), ao passo que a seleção positiva atuou após a neofuncionalização da nova cópia (*Caf1-55dup*) (CALVO-MARTÍN; PAPACEIT; SEGARRA, 2017).

CONCLUSÃO

Não encontramos sinal de seleção positiva na linhagem MOCS3, na qual houve ganho de domínio em sua neofuncionalização. É possível que a diferenciação de função tenha ocorrido sob influência da seleção positiva em MOCS3, entretanto é necessário a utilização de testes menos sensíveis a sequências divergentes.

Por outro lado, no ramo das TST foi possível detectar sinal de seleção positiva, além de alguns códons sendo selecionados positivamente, indicando que a diferenciação da função de TST foi determinada por seleção positiva.

Após os eventos de duplicação que culminaram nas novas funções de MOCS3 e TST, observamos que a seleção purificadora manteve as funções de ambas as proteínas.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Elaine Christina Castelhana e à MS. Olivia Basso Rocha pelas valiosas sugestões e pela revisão crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. C.; DESALLE, R. Orthology, Function and Evolution of Accessory Gland Proteins in the *Drosophila* repleta Group. *Genetics*, v. 181, n. 1, p. 235–245, 17 nov.2008.
- AMIRI, H. Birth and Death of Orphan Genes in *Rickettsia*. ***Molecular Biology and Evolution***, v. 20, n. 10, p. 1575–1587, 27 jun. 2003.
- BEDE, J. C. et al. Caterpillar Herbivory and Salivary Enzymes Decrease Transcript Levels of *Medicago truncatula* genes Encoding Early Enzymes in Terpenoid Biosynthesis. ***Plant Molecular Biology***, v. 60, n. 4, p. 519–531, mar. 2006.
- BEESELEY, S. G.; COMPTON, S. G.; JONES, D. A. Rhodanese in insects. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 11, n. 1, p. 45–50, 1985.
- BEGUN, D. J. et al. Evidence for de novo evolution of testis-expressed genes in the *Drosophila yakuba/Drosophila erecta* clade. ***Genetics***, v. 176, n. 2, p. 1131–7, jun. 2007.
- BORDO, D. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. ***EMBO Reports***, v. 3, n. 8, p. 741–746, 15 ago. 2002.
- BRATTSTEN, L. B. et al. Cyanide as a feeding stimulant for the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. ***Ecological Entomology***, v. 8, p. 125–135, 1983.
- CALVO-MARTÍN, J. M.; PAPACEIT, M.; SEGARRA, C. Evidence of neofunctionalization after the duplication of the highly conserved Polycomb group gene Caf1-55 in the obscura group of *Drosophila*. ***Scientific Reports***, v. 7, p. 40536, 17 jan. 2017.
- CARLSON, K. M. et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. ***Medical Sciences***, v. 91, p. 1579–1583, 1994.
- CIPOLLONE, R.; ASCENZI, P.; VISCA, P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. ***IUBMB Life***, v. 59, n. 2, p. 51–59, 2007.
- DAOUST, S. P. et al. Influence of epicuticular-wax composition on the feeding pattern of a phytophagous insect: implications for host resistance. ***The Canadian Entomologist***, v. 142, n. 03, p. 261–270, 2 jun. 2010.
- DAYHOFF, M. O. et al. Evolution of sequences within protein superfamilies. ***Die Naturwissenschaften***, v. 62, n. 4, p. 154–161, abr. 1975.
- DEMUTH, J. P.; HAHN, M. W. The life and death of gene families. ***BioEssays***, v. 31, n. 1, p. 29–39, jan. 2009.
- DESPRÉS, L.; DAVID, J.-P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. ***Trends in Ecology & Evolution***, v. 22, n. 6, p. 298–307, jun. 2007.
- FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. ***Annu. Rev. Physiol.***, v. 61, p.

243–282, 1999.

FORCE, A. et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. **Genetics**, v. 151, n. 4, p. 1531–45, abr. 1999.

FOX, C. W. et al. Genetic architecture of population differences in oviposition behaviour of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 5, p. 1141–1151, 8 abr. 2004.

FUNK, D. J.; FILCHAK, K. E.; FEDER, J. L. Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology. **Genetica**, v. 116, n. 2/3, p. 251–267, 2002.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Insetos e plantas. In: **Insetos - Fundamentos da Entomologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. p. 215–238.

HALL, C.; BRACHAT, S.; DIETRICH, F. S. Contribution of Horizontal Gene Transfer to the Evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 6, p. 1102–1115, 1 jun. 2005.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 8, p. 576–596, maio 1995.
HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4861, p. 42–52, 1 jul. 1988.

HUGHES, A. L. The Evolution of Functionally Novel Proteins after Gene Duplication. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 256, n. 1346, p. 119–124, 23 maio 1994.

HUGHES, T. E.; LANGDALE, J. A.; KELLY, S. The impact of widespread regulatory neofunctionalization on homeolog gene evolution following whole-genome duplication in maize. **Genome Research**, v. 24, n. 8, p. 1348–1355, ago. 2014.

INNAN, H.; KONDRASHOV, F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 2, p. 97–108, 6 fev. 2010.

KAESSMANN, H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. **Genome Research**, v. 20, n. 10, p. 1313–1326, 1 out. 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016.

LOYTYNOJA, A.; GOLDMAN, N. webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 579, 2010.

MAGADUM, S. et al. Gene duplication as a major force in evolution. **Journal of Genetics**, v. 92, n. 1, p. 155–161, 2013.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 431–450, 2 jun. 2012.

MUELLER, J. L. Cross-Species Comparison of *Drosophila* Male Accessory Gland Protein Genes. **Genetics**, v. 171, n. 1, p. 131–143, 18 jun. 2005.

MUSSER, R. O. et al. Caterpillar saliva beats plant defences. **Nature**, v. 416, p. 599–600, 2002.

NEALIS, V. G.; NAULT, J. R. Seasonal Changes in Foliar Terpenes Indicate Suitability Of Douglas-fir Buds for Western Spruce Budworm. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 4, p. 683–696, 25 abr. 2005.

- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 57–92, 2002.
- NYMAN, T.; JULKNEN-TIITTO, R. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. **PNAS**, v. 97, n. 24, p. 13184–13187, 2000.
- OHNO, S. **Evolution by Gene Duplication**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970.
- PLOEGMAN, J. H. et al. Structure of Bovine Liver Rhodanese I. Structure Determination at 2.5 Å Resolution and a Comparison of the Conformation and Sequence of its Two Domains. **J. Mol. Biol.**, v. 128, p. 557–594, 1978.
- PLOEGMAN, J. H. et al. The Structure of Bovine Liver Rhodanese II. The Active Site in the Sulfur-substituted and the Sulfur-free Enzyme. **J. Mol. Biol.**, v. 127, p. 149–162, 1979.
- SCHMID, K. J.; AQUADRO, C. F. The evolutionary analysis of “orphans” from the *Drosophila* genome identifies rapidly diverging and incorrectly annotated genes. **Genetics**, v. 159, n. 2, p. 589–98, out. 2001.
- SOBRINHO, I. S.; DE BRITO, R. A. Positive and purifying selection influence the evolution of doublesex in the *Anastrepha fraterculus* species group. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33446, 2012.
- STERN, A. et al. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W506–W511, 8 maio 2007.
- SUN, Y.; MACRAE, T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 21, p. 2460–2476, 7 nov. 2005.
- WARD, L. K.; HACKSHAW, A.; CLARCKE, R. T. Do food-plant preferences of modern families of phytophagous insects and mites reflect past evolution with plants? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 51–83, 2003.
- YANG, Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **Molecular biology and evolution**, v. 24, p. 1586–1591, 2007.
- YANG, Z.; DOS REIS, M. Statistical Properties of the Branch-Site Test of Positive Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 3, p. 1217–1228, 1 mar. 2011.
- YANG, Z.; WONG, W. S. W.; NIELSEN, R. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 4, p. 1107–18, abr. 2005.
- ZAGROBELNY, M. et al. Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 293–306, fev. 2004.
- ZHANG, J.; NIELSEN, R.; YANG, Z. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 12, p. 2472–2479, dez. 2005.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) REVELA DIFERENTES LINHAGENS EM BACIAS MARANHENSES

Walna Micaelle de Moraes Pires

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias- MA

Maria Claudene Barros

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias- MA

Elmary da Costa Fraga

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias- MA

RESUMO: A espécie *Hoplias malabaricus*, conhecida popularmente como traíra é considerada uma única espécie nominal, porém, estudos citogenéticos e moleculares vêm confirmando a existência de um complexo de espécies com uma diversidade cariotípica de sete citótipos reconhecidos. Neste contexto, objetivando determinar os padrões de diversidade genética, bem como a ocorrência de diferentes linhagens em bacias hidrográficas maranhenses utilizou-se a Região Controle do DNA mitocondrial. Amostras de *H. malabaricus* foram coletadas dos rios Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru e Parnaíba. O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega seguindo as instruções do fabricante e a amplificação gênica realizada

via PCR com posterior sequenciamento. Os dados foram analisados com os softwares BioEdit, MEGA6, DNAsp 5.1, Haploviewer, BAPS 6.0 e ARLEQUIN 3.5. Os resultados obtidos revelaram um processo de diferenciação genética entre as amostras analisadas. A árvore gerada mostrou o agrupamento dos espécimes em três haplogrupos maiores com os suportes variando de 88 a 98% de *bootstrap* estando bem suportados. A AMOVA realizada mostrou valores de F_{st} elevado (0,465) e valores de p altamente significativos, confirmando processo de diferenciação em curso. Os resultados evidenciam um processo de diferenciação genética em *H. malabaricus* nas bacias estudadas, uma vez que para os espécimes maranhenses, que segundo a literatura são representados por um único citótipo, obtivemos três linhagens diferentes corroborando com os dados cromossômicos e citogenéticos existentes na literatura e reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica.

PALAVRAS-CHAVE: Traíra, Complexo de espécies, Divergência Genética, Maranhão.

ABSTRACT: The species *Hoplias malabaricus*, popular trahira is considered a single nominal species, however, cytogenetic and molecular studies have confirmed the existence of a complex of species with a karyotype diversity of seven recognized cytotypes. In this context,

aiming determine the genetic diversity patterns and the lineage occurring in Maranhão basins we used the Region Control of mitochondrial DNA. *H. malabaricus* samples were collected from rivers Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru and Parnaíba. Total DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit of Promega according to the manufacturer's instructions and the gene amplification performed by PCR with subsequent sequencing. Data were analyzed with the software BioEdit, MEGA6, DNAsp 5.1, Haploviewer, BAPS 6.0, and ARLEQUIN 3.5. The generated tree showed the grouping of specimens into three major haplogroups, with support ranging 88-98 % of *bootstrap* being well supported. The AMOVA performed showed high values of *Fst* (0.465) and highly significant *p*- values, confirming ongoing differentiation process. The results show a process of genetic differentiation in *H. malabaricus* in the studied basins, once for maranhenses specimens, which according to the literature are represented by a single cytotype, we obtained three different strains corroborating existing chromosome and cytogenetic data in the literature and reinforcing the need for taxonomic revision.

KEYWORDS: Trahira, Species Complex, Genetic Divergence, Maranhão.

1 | INTRODUÇÃO

A Ordem Characiformes compreende um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, e apresentam destacada importância na pesca comercial e de subsistência (BRITSKI et al., 1999), sendo vulgarmente chamados de peixes de escamas. A ordem, é constituída por cerca de 1.674 espécies válidas, distribuídas em 270 gêneros, sendo que na Amazônia ocorre mais da metade de suas espécies (NELSON, 2006).

A família Erythrinidae compreende um pequeno grupo de Characiformes com apenas 14 espécies (FRICKE; ESCHMEYER, 2012), agrupadas nos gêneros *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1985 e *Hoplias* Gill, 1903 e distribuídas na região Neotropical. É um táxon endêmico das Américas do Sul e Central (OYAKAWA, 2003).

Apesar de ser uma família relativamente pequena, a identificação precisa das espécies que compõem a mesma é bastante problemática. A espécie *H. malabaricus* (BLOCH, 1794) de acordo com diversos estudos citológicos e moleculares correspondem, na realidade a um grupo de espécies com taxonomia confusa.

Segundo Morellí (1998), *H. malabaricus*, conhecida popularmente como traíra, apresenta o corpo cilíndrico com uma leve depressão lateral, possui nadadeira dorsal angular, cabeça bastante longa, boca ampla e mandíbulas proeminentes, possui dentes fortes e cônicos, com presença de caninos, possui coloração que varia desde marrom escuro passando a um bege claro possibilitando que a traíra se camufle na vegetação para capturar suas presas (OYAKAWA, 1998). É uma espécie sedentária bem adaptada a ambientes lênticos de água doce, embora possa ser encontrada em rios de grande e pequeno porte (SABINO; ZUANON, 1998).

Estudos citogenéticos em *H. malabaricus* vêm sendo realizados desde a década de 70 (BERTOLLO, 1978; BERTOLLO et al., 2000; PAZZA; JÚLIO Jr., 2003; VICARI et al., 2005; JACOBINA et al., 2009; BLANCO et al., 2010; MARQUES et al., 2013). Além desses, outros mais recentes de cunho molecular (SANTOS et al., 2009; PEREIRA et al., 2012, MARQUES et al., 2013) vêm confirmando a existência de um complexo de espécies atribuídas a este táxon. Uma vez que, estes tem revelado uma diversidade cariotípica com sete citótipos reconhecidos denominados de A-G com uma elevada diversidade genética. Para a região de São Luís no Maranhão, foi reportado por Bertollo et al. (2000) que as populações de *H. malabaricus* são caracterizadas pelo citótipo F (2n=40), com distribuição geográfica do Suriname ao rio São Francisco.

1.1 Marcadores Moleculares

A delimitação precisa das espécies é um problema clássico das ciências biológicas. Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies. Com o desenvolvimento de novos métodos, as investigações com DNA mitocondrial passaram a ser um dos principais métodos para diferenciação de espécies (AVISE, 2004).

Dentre os genes mitocondriais, a Região Controle, também conhecida como *D-loop*, é uma das mais utilizadas em estudos populacionais. Possui em torno de 1.100 pares de bases e em peixes localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (tRNA), o tRNA da prolina e o tRNA da fenilalanina (LUI et al., 2012). A taxa de mutação deste segmento chega a ser cem vezes mais rápida do que acontece no DNA nuclear (AVISE, 2004). Conseqüentemente, a região controle tem sido utilizada em estudos da variação genética intraespecífica, incluindo espécie de peixes, revelando diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas (PANARARI-ANTUNES et al., 2012).

Como a espécie *H. malabaricus* é taxonomicamente confusa, com a ocorrência de sete citótipos reconhecidos e com grande variabilidade genética para os mesmos, e considerando-se que o Estado do Maranhão está localizado em uma região de transição entre a Amazônia, o Cerrado e a Caatinga, pretendeu-se verificar por meio desse estudo, se os espécimes maranhenses de *H. malabaricus* pertencem a uma única linhagem, a partir da análise dos índices de diversidade genética e assim gerar informações sobre as populações para este táxon, procurando elucidar questões sobre a taxonomia e estrutura genética de suas populações, bem como verificar se o possível (eis) citótipo (s) ocorrente(s) constitui linhagens diferenciadas.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.2 Área de Coleta

As amostras foram obtidas dos seguintes rios maranhenses: Itapecuru, Pindaré,

Mearim, Turiaçu e Parnaíba. As bacias maranhenses estudadas possuem diferentes características hídricas (Figura 1).

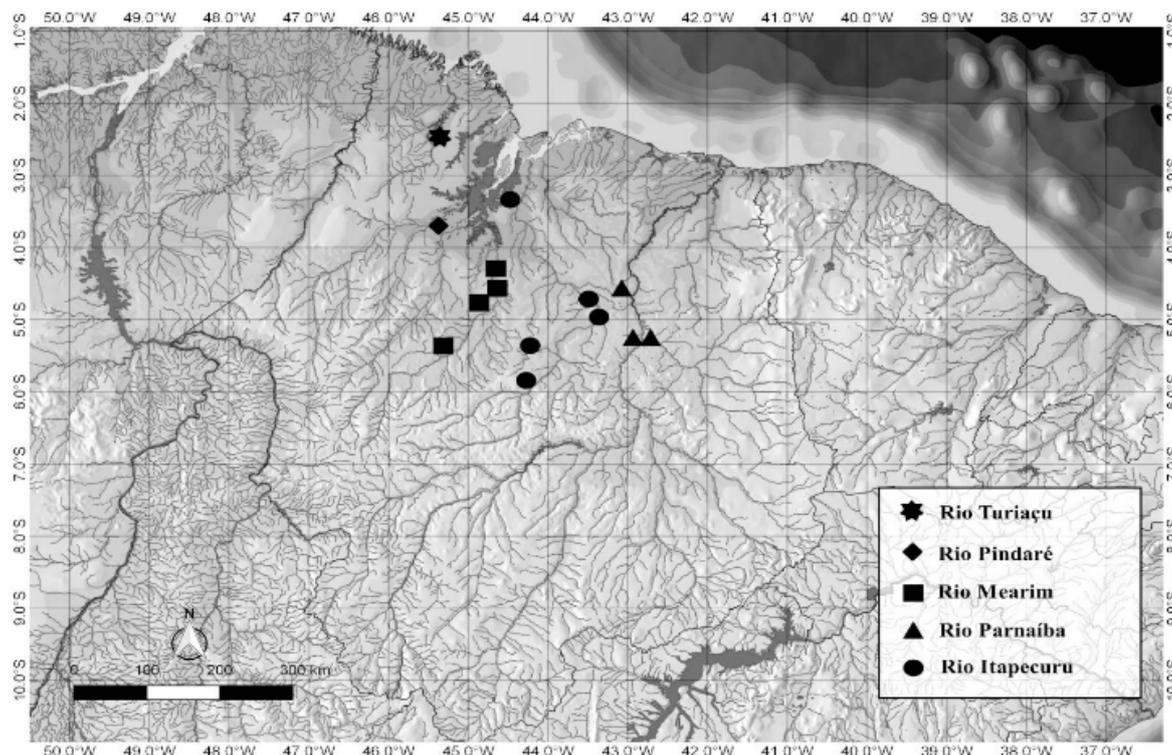


Figura 1. Localização dos pontos amostrais em cada bacia. Modificado por TEIXEIRA (2016). Criado com o programa Quantum GIS 2.6.

2.3 Amostragem

A amostragem foi constituída de espécimes de *H. malabaricus* coletados no curso das bacias dos rios Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba e Turiaçu. Para a coleta foram utilizados apetrechos de pesca como redes de arrasto, malhadeiras de vários milímetros, currais e tarrafas. Para a identificação taxonômica utilizou-se literatura científica (BRITSKI et al., 1999; PIORSKI et al., 2007; BERTOLLO et al., 2000) e posterior confirmação por especialista. As coletas realizaram-se mediante a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (n°. 02012.004159/2006 - rio Itapecuru, ICMBIO n°.46367-1 -rio Pindaré, ICMBIO- MMA n° 42.119-2 - rio Mearim e ICMBIO n°. 46367-1 - rio Turiaçu).

2.4 Técnicas moleculares

O DNA total foi isolado a partir das amostras de tecido muscular empregando-se o protocolo kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e amplificação da Região Controle a partir do DNA total foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se uma combinação de *primers* específicos e seguindo as condições descritas por Rodrigues et al. (2008). Os produtos das PCRs foram purificados com o KIT ExoSap IT foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA utilizando o método

Didesoxiterminal (SANGER et al., 1977), após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas e em seguida foram submetidas ao sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies).

2.5 Análise dos dados

As sequências foram alinhadas no CLUSTAL W 1.4 (THOMPSON et al., 1994) e editadas no BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999). Foi verificado o melhor modelo evolutivo para a reconstrução filogenética de no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Posteriormente a escolha do modelo evolutivo, foram geradas árvores filogenéticas. A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (1000 réplicas) (FELSENSTEIN, 1985). O programa MEGA 6 também foi usado para gerar a matriz de distância genética entre os espécimes dos rios analisados, sob o modelo evolutivo Kimura-2- parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Uma sequência de *Prochilodus argenteus* (NC027689), foi incorporada às análises como grupo externo. As redes de haplótipos foram construídas a partir do programa Haploviewer (SALZBURGER et al., 2011). As análises populacionais foram obtidas através dos softwares DNAsp 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009), BAPS 6.0 (CORANDER et al., 2008) e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER et al., 2007). A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi realizada no software ARLEQUIN 3.5. (EXCOFFIER et al., 2007).

3 | RESULTADOS

3.6 Análise do polimorfismo do fragmento

Um fragmento de 797 pb (pares de base) da região controle (*D-loop*) foi obtido para 37 espécimes de *H. malabaricus* provenientes de cinco Bacias Hidrográficas do Maranhão. Comparações das bases de nucleotídeos mostraram 697 sítios conservados e 100 sítios variáveis, sendo 95 informativos para parcimônia. Foram obtidos 30 haplótipos, com diversidade haplotípica de 0,984 e a diversidade nucleotídica de 0,044. Quando analisada isoladamente as populações, observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as populações das bacias do Pindaré e Parnaíba com valor de ($h= 1,000$) para ambas (Tabela 1). Os demais valores foram sumarizados na tabela 1.

Populações	N	NH	K	S	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica (H)	Nucleotídica (π)
Itapecuru	14	11	28,533	80	0,943	0,035
Pindaré	6	6	18,933	42	1,000	0,023
Parnaíba	2	2	5,000	5	1,000	0,006
Mearim	6	4	31,600	64	0,800	0,039
Turiaçu	9	8	5,556	12	0,972	0,006

Populações Agrupa- das	37	30	35,229	95	0,984	0,044
-----------------------------------	----	----	--------	----	-------	-------

Tabela 1. Diversidade genética dos espécimes de *H. malabaricus* de diferentes bacias maranhenses baseado em 797 pb da Região Controle.

(**N**= número amostral, **NH**= número de haplótipos, **K**= número médio de diferenças nucleotídicas, **S**= sítios polimórficos).

Do total de haplótipos encontrados, 29 correspondem a haplótipos únicos (*singletons*) distribuídos diferentemente entre as bacias analisadas e um foi compartilhado entre os rios Pindaré e Mearim (Figura 2). A análise da rede de haplótipos permite inferir que existe uma separação incompleta de linhagens, constatada pelo padrão de distribuição dos haplótipos observados, que não permite separar claramente as populações dos rios entre si, devido aos poucos passos mutacionais que separam um haplótipo do outro, chegando a ocorrer o compartilhamento de haplótipos entre as bacias.

3.7 Análises filogenéticas e distância genética

Os resultados mostraram o agrupamento dos espécimes em três haplogrupos maiores para as populações maranhenses onde estes tiveram os suportes variando de 88 a 98% de *bootstrap* estando bem suportados. O primeiro haplogrupo foi formado pelos haplótipos do rio Mearim e Itapecuru, sendo suportado pelos valores de 88NJ/81MP/86ML. Este haplogrupo possui dois subclados, onde o primeiro foi formado por três haplótipos do rio Itapecuru e o segundo por haplótipos do rio Mearim, ambos com suporte de 100NJ/99MP/99ML. O segundo haplogrupo foi formado pelos haplótipos do rio Turiaçu, com suporte de 98NJ/95MP/96ML. O terceiro haplogrupo foi constituído por espécimes das populações dos rios Pindaré, Mearim e Parnaíba com suporte de 84NJ/67MP/80ML. Dentro deste haplogrupo, houve a formação de dois subclados sendo o primeiro formado por haplótipos do rio Parnaíba com valores de 100NJ/99MP/99ML e o segundo subclado foi formado por haplótipos do rio Pindaré, com suporte de 100NJ/99MP/99ML (Figura 3). As divisões observadas na árvore são um claro indicativo de politomia das amostras com separação incompleta das linhagens e são semelhantes àqueles evidenciados na rede de haplótipos.

A distância genética média entre os grupos variou de 3,4 a 5,9%, com a população do rio Pindaré sendo a mais diferenciada. Os demais valores de divergência obtidos para as populações estão sumarizados na Tabela 2.

Populações	% Divergência Nucleotídica				
	1	2	3	4	5
1. Turiaçu	0,7				
2. Itapecuru	5,4	3,7			
3. Mearim	5,7	4,9	4,1		

4. Pindaré	4,3	5,9	4,6	2,4	
5. Parnaíba	3,4	5,3	5,1	3,4	0,6

Tabela 2. Média de distância genética K2P para a Região Controle nas populações de *H. malabaricus*. Os valores em diagonal correspondem à diversidade média intraespecífica.

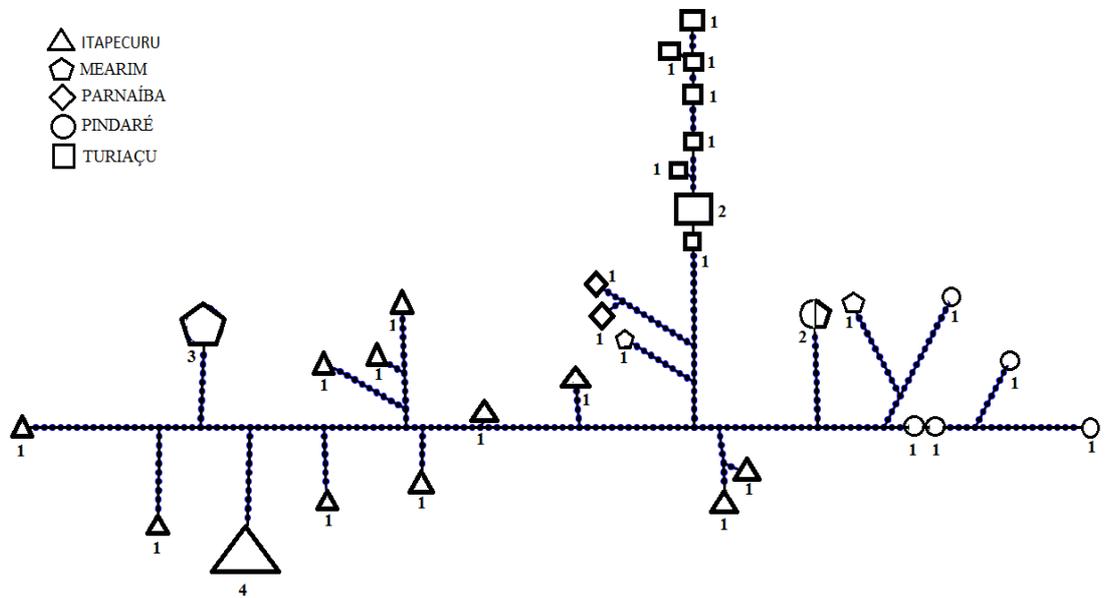


Figura 2. Rede de haplótipos gerada para populações de *H. malabaricus* provenientes das bacias maranhenses com base na Região Controle. Os números próximos aos símbolos representam as frequências com que os haplótipos ocorrem.

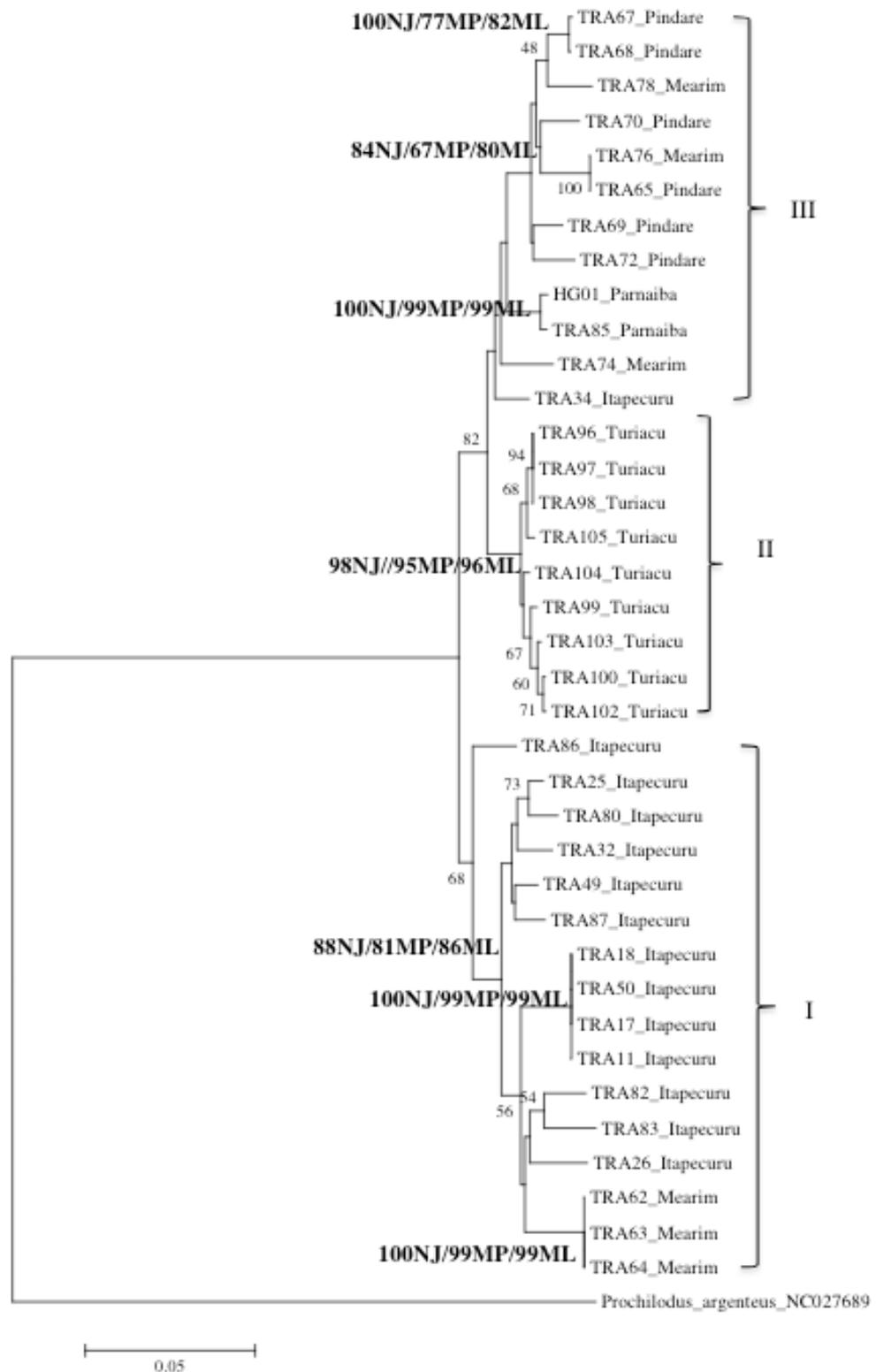


Figura 3. Árvore de haplótipos Região Controle obtida com 1000 réplicas de *bootstrap*. Os números nos ramos indicam da esquerda para a direita os valores de *bootstrap* para NJ, MP e ML

Análise Molecular de Variância (AMOVA)

Os resultados dos testes de AMOVA mostraram que a maior porcentagem de variação genética ocorreu dentro das populações (53,43%) com valores de p e F_{st} altamente significativo, sendo indicativo de um processo de diferenciação genética em curso nas populações dos rios estudados (Tabela 3).

Tipos de variação	Componentes de Variação	% Total de Variação	Fst Estatístico	p
Grupo Maranhão (Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba, Turiaçu)				
Entre populações	924.696Va	53,43	0,465	<0,001
Dentro das populações	1.062.997Vb	46,52		

Tabela 3. Resultados da AMOVA nas populações de *H. malabaricus* analisadas.

*valores de *p*, calculados aleatoriamente com 1023 permutações.

Verificamos por meio dos resultados gerados pelo BAPS que há um compartilhamento de linhagens entre as bacias. Entretanto a configuração de grupos apresentada por essa análise não difere daquilo que foi evidenciado em outras análises no presente estudo, apontando para a existência de três grupos diferenciados. Onde há ocorrência de uma única linhagem para o rio Turiaçu. No grupo do rio Itapecuru e Mearim observam-se à presença de uma linhagem exclusiva para este rio. A análise revelou ainda que no grupo do rio Mearim, ocorrem duas linhagens, onde uma delas compartilhada com o rio Itapecuru e a outra compartilhada com os rios Parnaíba e Pindaré, corroborando o padrão evidenciado tanto na rede, quanto na árvore de haplótipos (Figura 4).

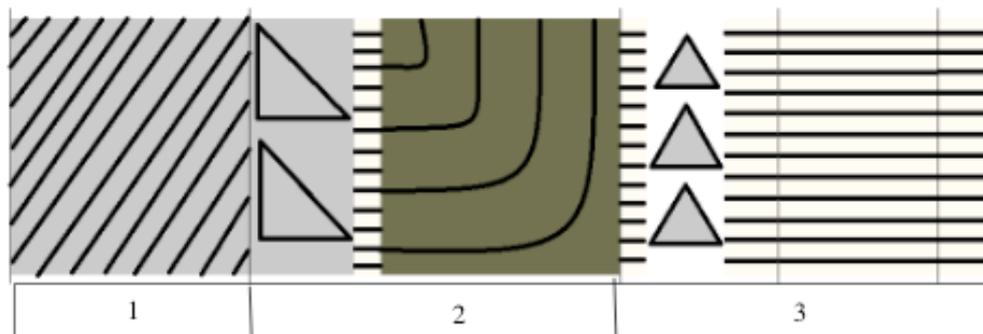


Figura 4- Gráfico em barras gerado pela análise no Programa BAPS v.6, a qual estima a probabilidade posterior da formação de grupos. Na figura os grupos são representados pelos desenhos, e pela numeração das populações, mostrando um total de 3 grupos. **1** – Turiaçu, **2** – Itapecuru e Mearim, **3**- Mearim, Pindaré e Parnaíba.

DISCUSSÃO

Os resultados da análise das populações agrupadas de *H. malabaricus* com base na análise da Região Controle mostrou alta diversidade haplotípica para os espécimes maranhenses. Estes resultados são similares aqueles encontrados por Pereira et al. (2013), analisando populações de *H. malabaricus* oriundas de bacias da região do leste do Brasil, utilizando os marcadores ATPase-6 e o gene nuclear ativador de recombinação (RAG2), encontrou alta divergência molecular (8,7% e 11,1%), para os espécimes estudados e distribuídos em quatro haplogrupos (Nordeste, Leste A, Leste B e Sudeste).

Segundo Lundberg et al. (1998) o padrão de divergência pode ser explicado levando-se em consideração a história geomorfológica das bacias hidrográficas a qual habitam. A ocorrência de espécies relacionadas nas bacias brasileiras tem sido atribuída aos efeitos das variações do nível do mar provocadas por ciclos de glaciação (WEITZMAN et al., 1988). Durante a máxima glacial, a diminuição nos níveis do mar podem ter favorecido a confluência dos rios adjacentes e permitido que os peixes de água doce tenham se dispersado entre bacias (BEHEREGARAY et al., 2002). Além disso, captura de cabeceira entre bacias (LUNDBERG et al., 1998) pode explicar similaridades de fauna. Tais fatores podem ser considerados para tentar entender a distribuição dos espécimes entre as bacias analisadas.

Os resultados demonstraram uma alta variabilidade genética para as populações estudadas. A variabilidade genética é um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo, uma vez que é devido a ela que uma espécie está apta a se adaptar as constantes modificações do meio ambiente (FRANKHAM et al., 2002). É a variabilidade genética que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam às pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional e à extinção local (WANG et al., 2002). A alta variabilidade evidenciada em nosso estudo aparenta ser uma característica comum da espécie, já que elevados índices de diferenciação foram relatados por outros autores utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, como nos estudos de Dergam et al. (1998), Peres et al. (2002), Marques et al. (2013), Rosso et al. (2012) e Pereira et al. (2013).

A reconstrução filogenética obtida mostrou a formação de três haplogrupos entre os espécimes maranhenses, indicando a ocorrência de diferentes linhagens para estes rios. Resultados similares foram obtidos por Abreu-Souza (2014), estudando *H. malabaricus* de drenagens maranhenses (Turiaçu, Pindaré, Mearim, Itapecuru, Munim, Gurupi, Parnaíba e Tocantins) através da região *D-loop*. Convém ressaltar que o “n amostral” obtido no estudo de Abreu-Souza foi maior. Marques et al. (2013) estudando populações de *H. malabaricus* da bacia Amazônica, por meio do gene COI, encontrou a formação de seis haplogrupos, demonstrando um padrão de diferenciação para o táxon. Estes resultados permitem constatar a alta variabilidade presente no grupo e

a ocorrência de diferentes linhagens mesmo dentro de uma única bacia hidrográfica. Esse padrão de distribuição também foi constatado por meio das redes de haplótipos e pelas análises do BAPS.

Segundo Avise (2004) a variação genética populacional deve ser função tanto da diversidade genética disponível originalmente para a espécie, quanto de processos contemporâneos como seleção, fluxo gênico, sistema de cruzamento entre outros, que governam como aquela variação é posteriormente repassada entre e dentro das populações. No caso dos peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (RAMOS, 2007). Como *H. malabaricus* é uma espécie sedentária e vive preferencialmente em populações isoladas, há o favorecimento da diferenciação genética entre as populações devido aos baixos níveis de fluxo gênico. Os peixes sedentários têm maior capacidade de registrar em seu DNA os eventos vicariantes ou ecológicos aos quais são submetidos, pois a sua condição sedentária limita a sua capacidade para superar as barreiras físicas, ou fugir espacialmente de pressões ambientais impostas (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Considerando-se os resultados obtidos por meio das demais análises e com o intuito de verificar o nível de diferenciação entre as populações de *H. malabaricus*, utilizou-se o teste de AMOVA, onde o mesmo revelou que há uma estruturação genética para estas populações, a qual é apoiada significativamente pelo índice de fixação (F_{st}) e pelos valores de $p < 0,001$. De acordo com Wright (1965), valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada, e acima de 0,25 indicam elevada diferenciação. Nossos resultados permitiram inferir que as populações analisadas apresentam valores de F_{st} (0,465), sendo considerado elevado. Portanto mais um indicativo de que os espécimes das bacias analisadas estão em processo de estruturação genética, considerando-se os parâmetros adotados por Wright.

4 | CONCLUSÃO

Estudos dessa natureza são necessários, uma vez que nem sempre as mudanças ocorridas em nível molecular em uma espécie, aparecem na morfologia, o que torna fundamental a associação de estudos genéticos, citogenéticos, morfológicos e ecológicos. Os dados de diversidade e estruturação genética encontrados na presente análise em populações de *H. malabaricus* nas bacias hidrográficas maranhenses por meio da Região Controle, nos fornecem informações importantes quanto à diferenciação genética em populações desta espécie e evidenciam a ocorrência de diferentes linhagens nas bacias estudadas.

Os dados obtidos são um indicativo de que mesmo dentro de um único citótipo, como é relatado na literatura para os rios maranhenses (citótipo F), há uma grande

variação genética nos espécimes. Resultado semelhante foi detectado por Marques et al. (2013) estudando um único citótipo do rio Amazonas, reforçando a problemática taxonômica existente em *H. malabaricus*. Portanto, faz-se necessário a conservação das bacias hidrográficas em questão como forma de não perder parte da diversidade deste táxon, uma vez que o estudo mostrou grande diferenciação genética entre as populações analisadas.

REFERÊNCIAS

- ABREU – SOUZA, C. P. **Diversidade e morfométricas de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís. 2014.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sinauer Associates. 2004.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação**. Embrapa. Brasília – DF. 1999.
- BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D. A. **A rapid fish radiation associated with the last sea level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex**. Proceedings of the Royal Society of London B, v. 269, p. 65-73. 2002.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. **Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae)**. Revista Brasileira de Genética, n. 1, v. 2, p.103-120. 1978.
- BERTOLLO, L.A.C; BORN, G.G.; DERGAM, J.A; FENOCHIO, A. S; MOREIRA-FILHO, O. **A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus***. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomy considerations. Chromosome Research, v. 8, p. 603-613. 2000.
- BLANCO, D. R.; LUI, L. R.; BERTOLLO, L. A. C.; DINIZ, D.; FILHO, O. M. **Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae)**. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2010.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TANG, J. **Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations**. BMC Bioinformatics, v. 9, p. 539. 2008.
- DERGAM, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO JR; HORÁCIO, F.; GIULIANO-CAETANO, L.; BLACK, I.V.; WILLIAM, C. **Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi and Paraná rivers**. Genetics and Molecular Biology, v. 21, p. 493-496. 1998.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin: a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva: University of Geneva. 2007.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.R.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England 640pp. 2002.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. Evolution, v. 39, p. 783-791. 1985.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N. **Journals**. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/journals.asp>). 2012. Electronic version accessed 21/09/2012.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucleic acids symposium. Serie A. v. 41, p. 95-98. 1999.

JACOBINA, U. P.; AFFONSO, P. R. A. M.; CARNEIRO, P. L. S.; DERGAM, J. A. **Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil**. Neotropical Ichthyology, v. 7, n. 4, p.617-622. 2009.

KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**. Journal of Molecular Evolution, v. 16, p. 111-120. 1980.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. Bioinformatics, v. 25, p. 1451-1452. 2009.

LÓPEZ – FERNÁNDEZ, H.; ARBOUR, J. H.; WINEMILLER, K. O; HONEYCUTT R. L. **Testing for ancient adaptive radiations in Neotropical cichlid fishes**. Evolution, v. 67, p. 1321– 1337. 2013.

LUNDBERG, J. G; MARSHALL, L. G.; HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L.; WESSELINGH, F. **The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers**. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. p 13–48. 1998.

LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MARGARIDO, V. P.; KUHN, G. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. **A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae)**. Mitochondrial DNA, v.23, p.388-395, 2012.

MARQUES, D. F.; SANTOS, F. A.; SILVA, S. S.; SAMPAIO, I.; RODRIGUES, L. R. R. **Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River**. Neotropical Ichthyology, v. 11, n.2, p. 459-466. 2013.

MORELLI, S. **Citogenética Evolutiva em Espécies do Gênero *Hoplias*, grupo lacerdae. Macroestrutura Cariotípica, Heterocromatina e Regiões Organizadoras de Nucléolo**. 1998. 76 p. (Tese de doutorado). São Carlos: UFSCar. 1998.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4^a ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 600f. 2006.

OYAKAWA, O. T. **Relações Filogenéticas das Famílias Pyrrhulididae, Lebiassinidae e Erythrinidae (Osteichthyes, Characiformes) (tese)**. São Paulo (SP): Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1998.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae (Trahiras). Pp. 238- 240. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferrari Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; GOMES, V. N.; JULIO JR; AGOSTINHO H. F.; SILVA FILHO, C. S.; BONI, J. P.; PRIOLI, L. M. **Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in Neotropical regions**. Journal of Fish Biology, v.80, p.2434-2447, 2012.

PAZZA, R.; JULIO JR, H. F. **Occurrence of three sympatric cytotypes of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) in Upper Paraná River floodplain (Brazil)**. Cytologia, v 68, p.159-163. 2003.

PEREIRA, T. L., SANTOS, U.; SCHAEFER, C. E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. **Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin**. Journal of Biogeography,

2012: 1-10. 2012.

PEREIRA, T. L.; SANTOS, U.; SCHAEFER, C. E.; SOUZA, G. O.; PAIVA, S. R.; MALABARBA, L. R.; SCHMIDT, E. E.; DERGAM, J. A. **Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin.** Journal of Biogeography, v. 40, 905–914. 2013.

PERES, M. D.; ERASMO, R.; LAPENTA, A. S.; ZAWADZKI, C. H. **Genetic Variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in Fluvial and Lacustrine Environments in the Upper Paraná River Floodplain (Parana State, Brazil).** Biochemical Genetics, v. 40, n. 7/8, p. 209- 223. 2002.

PIORSKI, N. M.; CASTRO A. C. L.; SOUSA NETO, A. M. DE S. **Peixes do cerrado da Região sul Maranhense.** In: Barreto, L. et al, Cerrado do Norte do Brasil. North cerrado of Brasil. Pelotas: Ed. USEB,. 378 f. 2007.

RAMOS, J. V. B. **Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas – rio Paranapanema.** 2007. 85f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RODRIGUES, R.; Schneiderl, H.; Santos, S.; Vallinoto, M.; Sain-Paul, U.; Sampaio, I. **Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Noryhern coast of Brazil.** Genetics and Molecular Biology, v. 31, n. 2, p. 487-489. 2008.

ROSSO, J. J.; MABRAGAÑA, E.; GONZÁLEZ CASTRO, M.; DÍAZ DE ASTARLOA, M. **DNA barcoding Neotropical fishes: recente advances from the Pampa Plain, Argentina.** Molecular Ecology Resources, v.12, p. 999-1011. 2012.

SABINO, J.; ZUANON, J. **A stream fish assemblage in central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior.** Ichthyological Exploration of Freshwaters, v. 8 p. 201-210. 1998.

SALZBURGER, W.; EWING, G.B.; VON HAESELER, A. **The performance of phylogenetic.** 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5467. 1977.

SANTOS, U.; VÖLCKER, C.M.; BELEI, F.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A. **Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil.** Journal of Fish Biology, 75, 2326-2343. 2009.

TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A; KUMAR, S. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution, v.:30, p. 2725-2729. 2013.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Research. n. 22, p. 4673-4680. 1994.

VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. **Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae): a population analysis in adjacent hydrographics basins.** Genetics and Molecular Biology, v. 28, n. 1, p. 103-110. 2005.

WANG, J. T. L.; ZHANG, K; CHANG, G; SHASHA, D. **Finding approximate patterns in undirected acyclic graphs.** Pattern Recognition, v. 35, n.2, p. 473- 483. 2002.

WEITZMAN, S. H.; MENEZES, N. A.; WEITZMAN, M. J. **Phylogenetic biogeography of the**

Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns (ed. por P.E. Vanzolini & W.R. Heyer), 379-427. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brasil. 1988.

WRIGHT, S. **The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating.** Evolution, v. 19, p. 395-420. 1965.

DNA BARCODING CONFIRMA A OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS NA ICTIOFAUNA DO RIO TURIUAÇU, MARANHÃO/BRASIL

Bruno Rafael da Silva Teixeira

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

Maria Claudene Barros

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

Elmary da Costa Fraga

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

RESUMO: Os peixes Neotropicais compõem a ictiofauna de água doce mais rica e diversificada do mundo, mais grande parte dessa ictiofauna permanece inexplorada, no Estado do Maranhão, a bacia do rio Turiaçu apresenta-se como exemplo de um ecossistema a ser estudado com relação a sua biodiversidade ictiofaunística. Com isso a implementação da técnica DNA barcode constitui uma importante ferramenta que contribuirá na identificação dos peixes dessa bacia e possibilitará uma melhor compreensão da taxonomia ictiofaunística, fornecendo informações que poderão subsidiar programas de manejo, conservação e preservação. A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica. O DNA total desses espécimes foi extraído

usando o kit da Promega. A partir do qual amplificando o gene COI através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Os produtos das PCRs foram purificados e sequenciados em sequenciador automático de DNA. Obteve-se 124 sequencias, correspondendo a 30 espécies, 26 gêneros, 16 famílias e seis ordens, que constituíram-se de um fragmento de 656 pb do gene COI, apresentando 340 sítios conservados e 316 variáveis. A árvore filogenética revelou a formação de clados fortemente suportados, exceto para as espécies *Leporinus* sp. e *Crenichichla* sp. Os espécimes identificados morfologicamente em nível genérico quando submetidos a identificação molecular na plataforma BOLD Systems, obteve-se seus níveis específicos com índice de similaridade superior a 97% exceto para *Rhamphichthys* sp. e *Pimelodella* sp. As espécies *Triportheus trifurcatus*, *Shizodon fasciatus*, *Serrasalmus eigenmanni* e *Loricaria cataphracta* se caracterizaram como novos registros para o Maranhão.

PALAVRAS-CHAVE: Peixes, DNA mitocondrial, COI.

ABSTRACT: The fish neotropical up the fish fauna of the richest and diverse freshwater in the world, most of this fish fauna remains unexplored, the Maranhão Basin Turiaçu river is presented as an example of an ecosystem to

be studied in relation to fish populations and biodiversity. Thus, the implementation of the DNA barcode is an important tool which will help the fish bowl identification and provide a better understanding of the fish fauna and their taxonomy, providing information that may assist management programs, conservation and preservation. The taxonomic identification was performed with the aid of specific literature. Total DNA was extracted from these samples using the kit from Promega. From which the COI gene amplification by polymerase chain reaction technique. The products of the PCR reactions were purified and sequenced on an automated DNA sequencer. 124 sequences were obtained, representing 30 species, 26 genera and 16 families six orders, which consisted of a 656 bp fragment of the gene COI, 340 and 316 stored local variables. The phylogenetic tree revealed the formation of strongly supported clades, except for the species *Leporinus* sp. and *Crenichichla* sp. they formed. The specimens morphologically identified in generic level when subjected to molecular identification in BOLD Systems platform has its specific levels more than 97% similarity index, except for *Rhamphichthys* sp. and *Pimelodella* sp. The species *trifurcatus* *Triportheus*, *Shizodon fasciatus*, *eigenmanni* *Serrasalmus* and *Loricaria cataphracta* were characterized as new records for Maranhao.

KEYWORDS: Fish, mitochondrial DNA, COI.

1 | INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Ictiofauna

Os peixes são representantes da maioria dos vertebrados, englobando cerca de 28.000 espécies e distribuído nos mais diversos ambientes aquáticos. Sua maioria são de espécies marinhas, com grande número desses vivendo em águas tropicais (NELSON, 2006). Os peixes Neotropicais de água doce são os mais diversificados do mundo, onde seus principais representantes são os Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (LUNDBERG et al., 2000).

A ictiofauna de água doce da América do Sul é a mais rica de todo o planeta, compreendendo cerca de 6.000 espécies conhecidas, mas com uma riqueza que pode chegar até em 8.000 espécies, sendo que devido a reduzida variabilidade morfológica destas espécies, torna difícil a compreensão dos processos que originaram suas diferenciações (SCHAEFER 1998; REIS et al., 2003; TURNER et al., 2004).

O sistema hidrológico brasileiro abriga grande parte dessa fauna de peixes, aproximadamente 4.100 espécies, sendo que são 2.800 continentais e 1.300 marinhos (LEWINSOHN; PRADO, 2005). No entanto, deve-se ressaltar que esse número tende a aumentar, pois muitas áreas permanecem inexploradas e com isso as amostragens das espécies são muito pequenas (LANGEANI et al., 2007; JUNK, 2007). No Estado do Maranhão, a bacia do rio Turiaçu apresenta-se como exemplo de um ecossistema a ser estudado com relação a sua biodiversidade ictiofaunística. A realização de um estudo na bacia do Rio Turiaçu, ampliará o conhecimento da fauna de peixes desta

bacia, assim como fornecerá informações genéticas que possam contribuir com a identificação dos peixes em nível específico, além de detectar possíveis ocorrências de novas espécies. Uma vez que este é o primeiro estudo ictiofaunístico desta bacia.

1.2 Identificação Molecular de Espécies

Historicamente os dados morfológicos foram os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies, com isso se desenvolveu novos métodos de estudos, essas novas metodologias foram se tornando disponíveis para a compreensão da biodiversidade. Mas diante da necessidade de se padronizar a identificação em grande escala de todas as formas de vida na terra. Hebert et al. (2003) propuseram a utilização de sequências de DNA como um identificador genético denominado DNA barcode ou código de barras de DNA. Essa abordagem tem como premissa o fato de que toda espécie possui um “código de barras único” e que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica.

Neste cenário a utilização do DNA barcode objetiva: proporcionar a identificação molecular de espécies já descritas, por meio de comparação com sequências disponíveis no banco de referências de DNA barcode – BOLD Systems e potencializar a descoberta de novas espécies e facilitar sua identificação, particularmente em organismos crípticos, microscópicos ou que apresentam morfologia complexa ou inacessível (MAIA; ALVES-GOMES, 2012). A utilização desse sistema contribuirá na identificação dos peixes da bacia do Turiaçu e possibilitará uma melhor compreensão da taxonomia ictiofaunística dessa bacia fornecendo informações que poderão subsidiar programas de manejo, conservação e preservação.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de Estudo e Obtenção das Amostras

As coletas foram realizadas e autorizadas pelo Instituto Chico Mendes ICMBio/MMA nº 46367-1/2014, na bacia do rio Turiaçu na Cidade de Santa Helena, entre as coordenadas: 02°15'869" S e 45°19'365" W.

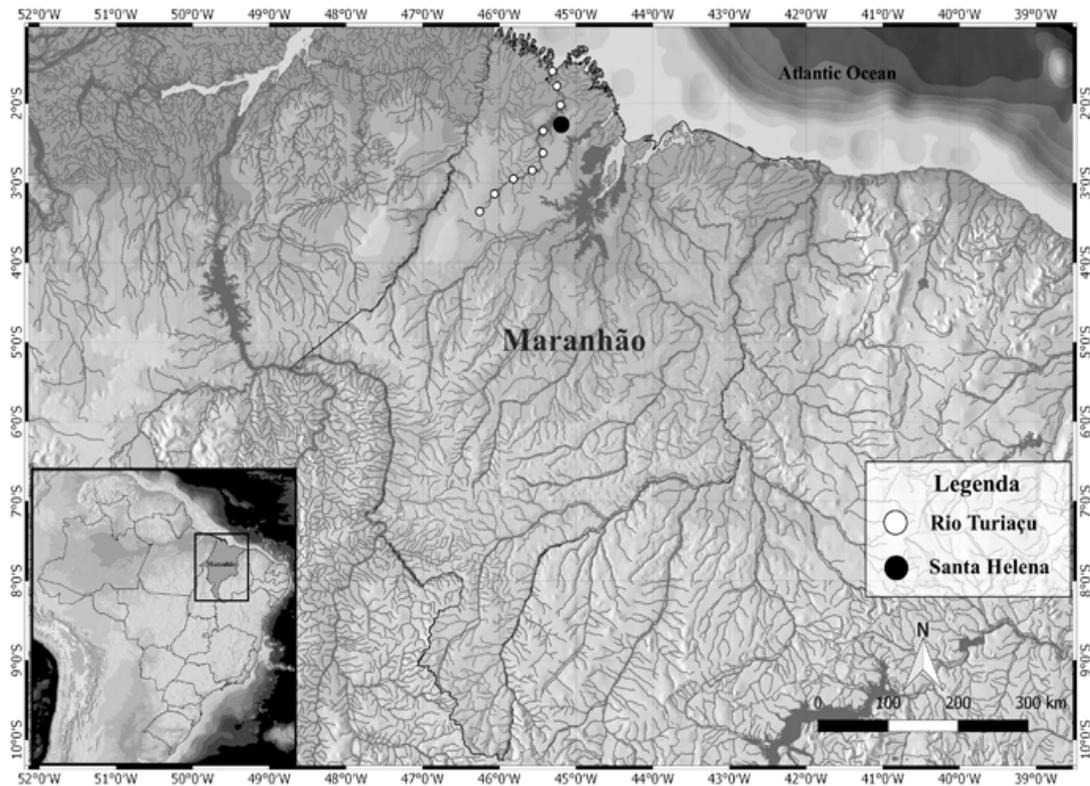


Figura 1. Mapa da Bacia do rio Turiaçu, Maranhão. Elaborado pelo autor, programa Quantum GIS 2.6.0

Para as coletas foram utilizados apetrechos de pesca como redes de arrasto, malhadeiras de vários milímetros e tarrafas. A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica (BRITSKI et al., 2007; SOARES, 2005) e os espécimes foram depositados na coleção do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão CESC/UEMA.

2.2 Procedimentos Genéticos

O DNA total foi extraído usando o kit Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e amplificação do gene COI a partir do DNA total foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* universais (WARD et al., 2005). Os produtos das PCRs purificados com o KIT ExoSap IT foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA utilizando o método Didesoxiterminal (SANGER et al., 1977), após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas para a retirada do excesso de reagentes não incorporados e em seguida foram submetidas ao sequenciador automático de DNA.

2.3 Análises dos Dados

As sequências de DNA foram editadas e alinhadas no Clustal W (THOMPSON et al., 1994) do programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999). A composição nucleotídica, matriz de distância genética e análises filogenéticas, foram geradas no programa MEGA 6.0

(TAMURA et al., 2013) utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (SAITOU; NEI, 1987) utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (1000 réplicas) (FELSENSTEIN, 1985). A saturação dos dados foi estimada utilizando o programa DAMBE 5.3.110 (XIA; XIE, 2001). A identificação molecular a partir do gene COI foi realizada por comparação das sequências obtidas com dados disponíveis na plataforma bioinformática BOLD Systems (*Barcode of Life Data Systems*) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica

Foram obtidas 124 sequências, correspondendo a 30 espécies, 26 gêneros, 16 famílias e seis ordens (Tabela 1). As ordens Characiformes e Siluriformes apresentaram um maior número de espécies, Gymnotiforme apresentou duas espécies e as ordens Elopiformes, Clupeiformes e Perciformes foram representadas por uma espécie cada.

Ordem	Família	Gênero	Espécie	N	
Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	9	
		Characidae	<i>Serrasalmus</i>	<i>Serrasalmus</i> sp. (Lacepède, 1803)	6
			<i>Serrasalmus rhombeus</i> (Linnaeus, 1766)	12	
	<i>Triportheus</i>		<i>Triportheus</i> sp. (Cope, 1872)	4	
	<i>Mylossoma</i>		<i>Mylossoma</i> sp. (Eigenmann, 1903)	5	
	<i>Tetragonopterus</i>		<i>Tetragonopterus</i> sp. (G. Cuvier, 1816)	5	
	Anostomidae		<i>Leporinus</i>	<i>Leporinus</i> sp. (Agassiz, 1829)	6
			<i>Schizodon</i>	<i>Schizodon</i> sp. (Spix & Agassiz, 1829)	5
	Prochilodontidae		<i>Prochilodus</i>	<i>Prochilodus</i> sp. (Spix & Agassiz, 1829)	9
	Curimatidae	<i>Curimata</i>	<i>Curimata cyprinoides</i> (Linnaeus, 1766)	4	
Hemiodontidae	<i>Hemiodus</i>	<i>Hemiodus</i> sp. (J. P. Müller, 1842)	3		
		<i>Hemiodus argenteus</i> (Pellegrin, 1909)	1		
	Acestrorhynchidae	<i>Acestrorhynchus</i>	<i>Acestrorhynchus</i> sp. (C. H. Eigenmann & C. H. Kennedy, 1903)	6	
Elopiformes	Megalopidae	<i>Megalops</i>	<i>Megalops atlanticus</i> (Valenciennes, 1847)	1	
Clupeiformes	Engraulidae	<i>Pterengraulis</i>	<i>Pterengraulis atherinoides</i> (Linnaeus, 1766)	1	

Siluriformes	Auchenipteridae	<i>Trachelyopterus</i>	<i>Trachelyopterus</i> sp. (Valenciennes, 1840)	5
	Pimelodidae	<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus ornatus</i> (Kner, 1858)	3
			<i>Pimelodus blochii</i> (Valenciennes, 1840)	1
			<i>Pimelodus</i> sp. (Lacépède, 1803)	5
		<i>Hemisorubim</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchus</i> (Valenciennes, 1840)	3
		<i>Pseudoplatystoma</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (Linnaeus, 1766)	6
	Heptapteridae	<i>Pimelodella</i>	<i>Pimelodella</i> sp. (Müller & Troschel, 1848)	3
	Doradidae	<i>Platydoras</i>	<i>Platydoras brachylecis</i> (Piorski, Garavello, Arce H. & Sabaj Pérez, 2008)	3
		<i>Hassar</i>	<i>Hassar affinis</i> (Steindachner, 1881)	3
	Loricariidae	<i>Hypostomus</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i> (Linnaeus, 1758)	3
		<i>Loricaria</i>	<i>Loricaria</i> sp. (Linnaeus, 1758)	2
		<i>Loricariichthys</i>	<i>Loricariichthys</i> sp. (Bleeker, 1862)	3
	Perciformes		<i>Crenicichla</i>	<i>Crenicichla</i> sp. (Heckel, 1840)
Gymnotiforme	Sternopygidae	<i>Sternopygus</i>	<i>Sternopygus macrurus</i> (J. P. Müller & Troschel, 1849)	1
	Rhamphichthyidae	<i>Rhamphichthys</i>	<i>Rhamphichthys</i> sp. (J. P. Müller & Troschel, 1846)	1
6	16	26	30	124

Tabela 1 – Espécies de peixes do rio Turiaçu/MA analisadas neste estudo por meio do gene mitocondrial COI. N = Número Amostral.

As sequências obtidas, constituíram-se de um fragmento de 656 pares de base (pb) do gene COI. Na análise para esse fragmento, verificou-se que 340 sítios foram conservados e 316 variáveis. A composição nucleotídica foi de 28,8% para timina; 28,4% citosina; 25,1% adenina e 17,7% guanina. Valores similares foram encontrados por Henriques (2010), em seu estudo com peixes do rio Ribeira de Iguape, onde obteve uma média de 29,7% para timina, 27,9% para citosina, 24,22% para adenina e 18,17% para guanina.

3.2 Relações Filogenéticas e Divergência Genética

A árvore filogenética baseada no método de agrupamento de vizinhos (NJ), modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P), revelou a formação de clados fortemente suportados com 100% de *bootstrap*, agrupando os espécimes identificados como coespecíficos em conjuntos coerentes (Figura 2).

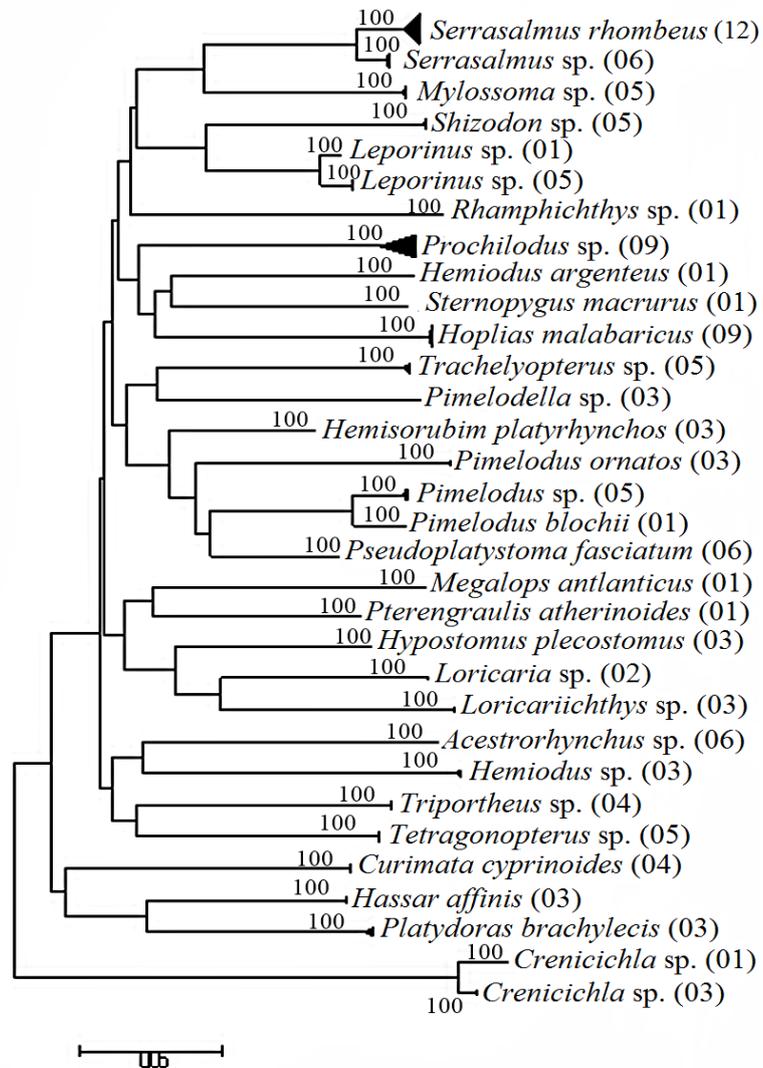


Figura 2 – Árvore filogenética obtida por abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas); valores entre parênteses (número de espécimes analisados).

No entanto, para as espécies *Leporinus* sp. e *Crenicichla* sp. foi observado a formação de subclados, sugerindo a existência de diferenciação genética dentro destas espécies na bacia do rio Turiaçu (Figura 3).

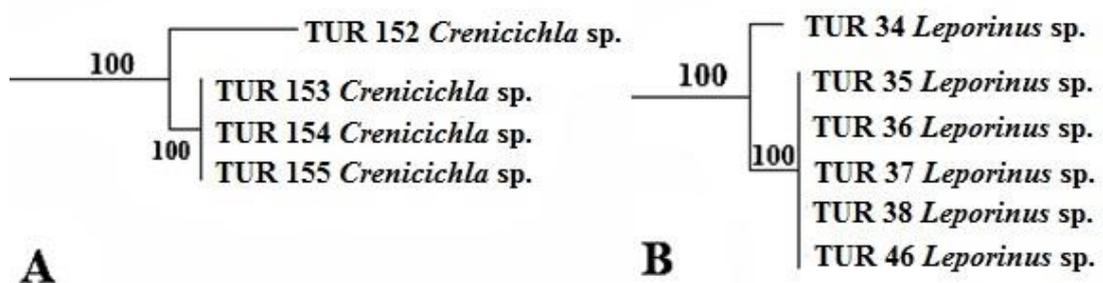


Figura 3 - Dendrograma de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de bootstrap de espécies que mesmo apresentando média de distância genética intraespecífica (Kimura 2 Parâmetros) inferior a 2% apresentaram a formação de subclados. A - *Crenicichla* sp. e B - *Leporinus* sp.

As médias de divergências genéticas interespecíficas variaram de 2,9% a 36,1%,

a menor foi observada entre as espécies *Serrasalmus rhombeus* e *Serrasalmus* sp. pertencentes ao mesmo gênero, e a maior divergência ocorreu entre as espécies *Rhamphichthys* sp. e *Crenicichla* sp. pertencentes as ordens Gymnotiformes e Perciformes, respectivamente. As médias intraespecíficas foram obtidas apenas das espécies representadas por mais de um exemplar. Todas as espécies revelaram médias inferiores a 2% exceto *Crenicichla* sp. cuja a divergência entre seus espécimes variou de 0 a 3,9%, com média de 2,3% refletindo o observado na análise de NJ, onde essa espécie apresentou-se dividida em dois grupos. Apesar dos espécimes de *Leporinus* sp. apresentarem a formação de subclados sua média intraespecífica foi menor que 2%.

Segundo Pereira (2011) as espécies que apresentarem elevados valores de divergência intraespecífica (>2%) são responsáveis nas maiorias dos casos por elevar o valor médio de divergência genética intraespecífica, uma vez que para o conjunto de espécies analisadas isso pode representar casos onde há profunda estruturação populacional.

3.3 Identificação Molecular (BOLD Systems)

As amostras foram submetidas a comparações de similaridade na plataforma de bioinformática BOLD Systems, para obter a identificação das espécies por meio do DNA *barcode* considerando a divergência de 2 a 3% como valor de corte para delimitação de espécie como é inferido em literatura para peixes neotropicais. Isso significa se a sequência de DNA de um exemplar diferir menos que 3% (ou obter um índice de similaridade superior a 97% no BOLD) da sequência de uma das espécies já conhecidas, ele será identificado como pertencente àquela espécie uma vez que se encontra dentro do parâmetro de 3% (SOLÉ-CAVA; WORHEIDE, 2007; SOLÉ-CAVA, 2008).

A identificação morfológica das espécies *Hoplias malabaricus*, *Serrasalmus rhombeus*, *Megalops atlanticus*, *Pterengraulis atherinoides*, *Pimelodus ornatos*, *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Hypostomus plecostomus*, *Sternopygus macrurus*, *Hemisorubim platyrhynchos*, *Pimelodus blochii*, *Platydoras brachylecis* e *Hassar affinis* foram confirmadas com os dados moleculares, considerando um limiar de até 3% de divergência para delimitação de espécies (Tabela 3).

Morfológica	Molecular	Similaridade (%)
<i>Hoplias malabaricus</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>	99,68%
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	99,84%
<i>Megalops atlanticus</i>	<i>Megalops atlanticus</i>	100%
<i>Pterengraulis atherinoides</i>	<i>Pterengraulis atherinoides</i>	98,07%
<i>Pimelodus ornatos</i>	<i>Pimelodus ornatos</i>	98,23%
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100%

<i>Hypostomus cf. plecostomus</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	98,36%
<i>Sternopygus macrurus</i>	<i>Sternopygus macrurus</i>	98,32%
<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	98,37%
<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	97,30%
<i>Platydoras brachylecis</i>	<i>Platydoras brachylecis</i>	99,68%
<i>Hassar affinis</i>	<i>Hassar affinis</i>	99,81%

Tabela 3. Percentual de similaridade obtido por meio de comparações das sequências de COI no BOLD Systems para as espécies de peixes identificadas morfologicamente e que foram confirmadas com os dados moleculares.

Na identificação das espécies *Hemiodus* sp., *Hemiodus argenteuse* e *Loricariichthys* sp. observou-se que os valores encontrados para essas espécies foram abaixo de 97% estando fora do padrão para a utilização com DNA *barcode*.

No entanto, algumas espécies identificadas morfologicamente em nível genérico quando comparadas com amostras da plataforma constatou-se os resultados observados na tabela 4.

Morfológica	Molecular	Similaridade (%)
<i>Acestrorhynchus</i> sp.	<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	99,45%
<i>Triportheus</i> sp.	<i>Triportheus trifurcatus</i>	99,67%
<i>Shizodon</i> sp.	<i>Shizodon fasciatus</i>	99,49%
<i>Serrasalmus</i> sp.	<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	99,68%
<i>Tetragonopterus</i> sp.	<i>Tetragonopterus argenteus</i>	100%
<i>Mylossoma</i> sp.	<i>Metynniss maculatus</i>	100%
<i>Prochilodus</i> sp.	<i>Prochilodus lacustres</i>	100%
<i>Pimelodus</i> sp.	<i>Pimelodus maculatus</i>	99,84%
<i>Trachelyopterus</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	99,84%
<i>Loricaria</i> sp.	<i>Loricaria cataphracta</i>	97,18%
<i>Crenicichla</i> sp.	<i>Crenicichla menezesi</i>	99,48%

Tabela 4. Percentual de similaridade obtido por meio de comparações das sequências de COI no BOLD Systems para algumas espécies de peixes do rio Turiaçu.

A espécie *Acestrorhynchus* sp. apresentou similaridade consistente com *Acestrorhynchus cf. falcatus*. Esta espécie já foi registrada no estudo realizado por Ramos et al. (2014) para a bacia do rio Parnaíba.

As espécies *Triportheus* sp., *Shizodon* sp., *Serrasalmus* sp. e *Loricaria* sp. quando submetidas a identificação molecular verificou-se como sendo *Triportheus trifurcatus*, *Shizodon fasciatus*, *Serrasalmus eigenmanni* e *Loricaria cataphracta* respectivamente. Com base em estudos anteriores sabe-se que não há registros das mesmas em bacias

Maranhenses (BARROS et al., 2011; RAMOS et al., 2014).

Suas ocorrências são registradas em algumas das bacias hidrográficas amazônicas, a espécie *Triportheus trifurcatus* tem sua distribuição nas bacias Tocantins - Araguaia, *Shizodon fasciatus* tem sua distribuição no alto rio Amazonas e bacias costeiras da Guiana Francesa, a espécie *Serrasalmus eigenmanni* se distribui pelo rio Amazonas bacias Norte e Leste e rios da Guiana e pôr fim a *Loricaria cataphracta* na bacia do rio Amazonas e rios costeiros das Guianas (FISHBASE, 2016). Tendo em vista que a bacia do rio Turiaçu possui características amazônicas (PIORSKI, 2010), e que esse rio recebe influência das marés e braços dos rios amazônicos, infere-se que este seja o provável fator que pode associado a migração destas espécies de peixes características das bacias amazônica. Portanto, a ocorrência dessas espécies para o rio Turiaçu, constituem-se em novos registros confirmados através da análise do DNA *barcoding*.

Os exemplares identificados morfologicamente como *Tetragonopterus* sp. e *Mylossoma* sp. apresentaram similaridade de 100% com *Tetragonopterus argenteus* e *Metynnis maculatus* respectivamente, *Tetragonopterus argenteus* foi registrada para a bacia do rio Parnaíba (RAMOS et al., 2014) e *Metynnis maculatus* foi registrada para a Bacia Itapecuru em nível genérico por Barros et al. (2011) e teve confirmação em nível específico por Nascimento (2015).

A espécie *Prochilodus* sp. quando submetida a identificação molecular verificou-se similaridade de 100% com *Prochilodus lacustris* corroborando Piorski (2010) para as bacias maranhenses onde se observou a distribuição dessa espécie para as bacias do Turiaçu, Parnaíba, Itapecuru, Mearim e Pindaré.

As espécies *Pimelodus* sp. e *Trachelyopterus* sp. foram identificadas molecularmente como *Pimelodus maculatus* e *Trachelyopterus galeatus* respectivamente. Essas espécies também ocorrem para a bacia do rio Parnaíba (RAMOS et al., 2014).

A espécie *Crenicichla* sp. foi identificada molecularmente com *Crenicichla menezesi*. Esta já foi registrada para as bacias do rio Parnaíba e rio Itapecuru, sendo uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil (BARROS et al., 2011; RAMOS et al., 2014).

Os espécimes de *Leporinus* sp. apresentaram similaridade consistente com três espécies do mesmo gênero (Tabela 5). Cinco espécimes apresentaram similaridade de 99,04% para *Leporinus* sp10 e 98,56% para *Leporinus friderici* e um espécime ficou identificado como *Leporinus piau*. Nos Trabalhos de Fraga et al. (2014) e Aragão (2015) com *Leporinus* de bacias maranhenses foram observados resultados similares, mostrando um processo de diferenciação genética neste táxon.

Nossos resultados permitem inferir quanto à divergência existente na identificação morfológica e molecular, reforçando a problemática taxonômica de *Leporinus piau*, já que a espécie possui taxonomia complexa, possivelmente por conter caracteres morfológicos bastante similares com outras espécies do gênero. Contudo, de acordo com Henriques (2010) a resolução de problemas relacionados a identificação de uma

espécie exige uma cuidadosa análise morfológica de taxonomistas especialistas antes que quaisquer recomendações finais possam ser feitas. Sendo assim, as análises de DNA *barcode* e a análise morfológica devem caminhar juntas na resolução desta problemática.

Morfológica	Molecular	Similaridade (%)
<i>Leporinus</i> sp.	<i>Leporinus</i> sp10	99,04%
	<i>Leporinus friderici</i>	98,56%
<i>Leporinus</i> sp.	<i>Leporinus piau</i>	98,49%

Tabela 5. Percentual de similaridade obtido por meio de comparações das sequências de COI no BOLD Systems para as espécies de *Leporinus* sp. do rio Turiaçu.

A identificação morfológica de *Curimata cyprinoides* divergiu da molecular que evidenciou tratar-se de *Psectrogaster rhomboides* com similaridade de 97,10%. A identificação errônea desta espécie pode estar relacionada ao fato de ambas apresentarem grandes semelhanças morfológicas dificultando muitas vezes a correta identificação baseada apenas em morfologia. Em estudos de Barros et al. (2011) e Ramos et al. (2014), foi confirmado a ocorrência de *Curimata cyprinoides* e *Psectrogaster rhomboides* nas bacias do Itapecuru e Parnaíba.

As espécies identificadas morfológicamente como *Rhamphichthys* sp. e *Pimelodella* sp. quando submetidas a identificação molecular confirmou-se apenas seus níveis genérico com similaridade de 98,41% e 97,2% respectivamente, estas espécies foram as únicas que não se obteve os seus níveis específicos. Os gêneros *Rhamphichthys* e *Pimelodella* já foram registrados em bacias maranhenses em estudos realizados por Barros et al. (2011) e Ramos et al. (2014), não descartando a ocorrência de espécie desse gênero para a bacia do Turiaçu.

Neste estudo, a utilização do gene COI como código de barras de DNA para os peixes do rio Turiaçu mostrou-se eficaz, pois das 30 espécies analisadas 90% (27 espécies) apresentaram medias de divergências intraespecíficas inferiores a 3%. Portanto, o uso desta robusta metodologia gerou os primeiros códigos de barra para os peixes da bacia do rio Turiaçu.

4 | CONCLUSÃO

O código de barras de DNA foi eficiente para a identificação das espécies de peixes do Rio Turiaçu, identificando e confirmando 90% das espécies analisadas. As espécies identificadas morfológicamente em nível genérico, foram identificadas a nível específico como *Triportheus trifurcatus*, *Shizodon fasciatus*, *Serrasalmus eigenmanni*, *Tetragonopterus argenteus*, *Metynnis maculatus*, *Prochilodus lacustres*, *Pimelodus maculatus*, *Trachelyopterus galeatus*, *Loricaria cataphracta* e *Crenichichla menezesi*. As espécies *Triportheus trifurcatus*, *Shizodon fasciatus*, *Serrasalmus eigenmanni* e

Loricaria cataphracta se caracterizaram como novos registros para o Maranhão. Os resultados indicam que a espécie *Leporinus* sp. precisa ser melhor investigada.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, D. G. **Identificação molecular (DNA barcode) e variabilidade genética em *Leporinus piau* (Characiformes: Anostomidae) de bacias hidrográficas do estado do Maranhão, Brasil.** UEMA, 2015. Dissertação 51f (Mestrado em Conservação e reprodução Animal). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, São Luis. 2015.
- BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; BIRINDELLI, J. L. **Fishes from the itapecuru river basin, state of Maranhão, Northeast Brazil.** Brazilian Journal of Biology (Impresso)., v.71, p.In Press - . 2011.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação.** – 2. ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, 227p, 2007.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FRAGA, E.; SILVA, L.M.M.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; BARROS, M.C. **Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru.** Revista Trópica, p.28-40, v.8, n. 2, 2014.
- FROESE, R.; PAULY, D. (eds.) 2016. **FishBase, World Wide Web electronic publication.** Disponível em [http: < www.fishbase.com >](http://www.fishbase.com), version (01/2016). Consulta em Janeiro de 2016.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium. Ser. v. 41, p. 95-98, 1999.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; de WAARD, J. R. **Biological identification through DNA barcode.** Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences, London, v. 270, n. 15, p. 313-321, fev. 2003
- HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA barcode) dos peixes da bacia do rio ribeira de Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo.** 2010. 117f. Tese (Ciências Biológicas Zoologia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo, 2010.
- JUNK, W. **Freshwater fishes of South America: Their biodiversity, fisheries, and habitats – a synthesis.** Aquatic Ecosystem & Management v. 10, n. 2, p. 228-242, 2007.
- LANGEANI, F.; CASTRO, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. **Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras.** Biota Neotropica, v. 7, n. 3, p. 181-197, 2007.
- LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I.; **Quantas espécies há no Brasil? Megadiversidade.** v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.
- LUNDBERG, J.G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G.R.; STIASSNY, M.L.J.: **So many fishes, so little time: na overview of recente ichthyological Discovery in continental Waters.** Ann Mo Bot Gard. v. 87, p. 26-62, 2000.
- MAIA, C. R.; GOMES, J. A. A. **Utilização do código de barras de DNA na estimativa da diversidade de peixes elétricos do gênero *Microsternarchus* (ostariophysi: gymnotiformes) na Bacia do rio Negro, Amazonas.** INPA, 2012.
- NASCIMENTO, M. H. S.: **Código de barras (DNA barcode) da ictiofauna do rio itapecuru, Maranhão.** UEMA, 2015. Dissertação (Mestrado em Conservação e reprodução Animal). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, São Luis. 2015.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world. 4ª edição.** New York: John Wiley & Sons. 601p. 2006.

- PEREIRA, L. H. G. **Identificação Molecular dos Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná**. Botucatu, 2011.
- PIORSKI, N. M. **Diversidade Genética e Filogeografia das Espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustres* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil**. 2010. 152F. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Área de concentração: Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- RAMOS, T. P. A.; RAMOS, R. T. C.; RAMOS, S. A. Q. A. **Ichthyofauna of the Parnaíba river Basin, Northeastern Brazil**. *Biota Neotropica*. v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **BOLD: The Barcode of Life Data System**. *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, p. 355 – 364, 2007.
- REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**, EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp. 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Molecular Biology Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 74, p. 5463-5468, 1977.
- SOARES, E. C. **Peixes do Mearim**. São Luiz: Editora Instituto Geia, 2005.
- SOLÉ-CAVA, A. M.; **Códigos de barra de DNA: o rabo que abana cachorro**. *Ciência Hoje*, v. 41: n. 245, p. 65-67, 2008
- SOLÉ-CAVA, A. M.; WORHEIDE, G. **The perils and merits (or The Good, the Baland the Ugly) of DNA barcode of sponges – a controversial discussion**. *Porifera Research-Biodiversity, Innovation and Sustainability*, v. 28, p. 603-612, 2007.
- SCHAEFER, S.A. **Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae)**. In: MALABARBA, L.R., REIS, R.E., VARI, R.P., LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre:EDIPUCRS. p. 375-400. 1998.
- TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A and KUMAR, S. **MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBONS, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Research*, v.22, p. 4673-4680, 1994.
- TURNER, T.F.; PHEE, M.V., CAMPBEL, P.; WINEMILLER, K.O. **Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America**. *Journal of Fish Biology*, n. 64, p. 186-201, 2004.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H., LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. **DNA barcode Australia's fish species**. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.
- XIA, X.; XIE, Z. **DAMBE: Data Analysis in Molecular Biology and e Evolution**. *J. Hered*, 92: 371-373, 2001.

EVALUATION OF HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MGSO₄ AND IPTG IN ESCHERICHIA COLI W110

Yago Queiroz dos Santos

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Gabriella Silva Campos Carelli

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Bruno Oliveira de Veras

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Joelton Igor Oliveira da Cruz

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Geovanna Maria Medeiros Moura

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Antônio Moreira Marques Neto

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Anderson Felipe Jácome de França

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte,

Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Multicampi School of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil.

ABSTRACT: Since the improvement of gene sequencing techniques, the expression of heterologous proteins is gaining increasing relevance given the possibility of large-scale production when compared to the isolation of these same molecules in their original sources. However, heterologous expression systems continue to require for a suitable induction relevant amounts of synthetic molecules like IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) which have toxicity and cost limitation when used in large scale. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of bivalent salts such as MgSO₄ in association with IPTG on heterologous expression system pDMI.1 for a possible better cost-benefit proposal in the current heterologous protein expression protocol. Magnesium Sulfate contributes to an increase in bacterial physiology as a whole, inducing a higher protein expression acting as an indirect and alternative inducer in these conditions, with the advantages of presenting low cost and low cellular toxicity. Based on these obtained data, we propose the usage of low MgSO₄ molar concentrations in current heterologous protein expression protocols

performed in our group for the pDMI.1 vector. Additional studies are still needed in order to evaluate the effects of this salt on different expression systems at wide range of microorganisms.

KEYWORDS: Escherichia coli, Heterologous protein, H-ras.

INTRODUCTION

Escherichia coli is the first host microorganism widely used for the production of recombinant proteins (SWARTZ, 2001). Many of the proteins made by *E. coli* are expressed through complicated processes of production, which increases costs and makes productivity unfeasible (VILLAVERDE & CARRIO, 2003).

Several studies on cell culture systems have been published, showing the best compositions of culture media, factors such as pH, temperature, amount of oxygen and inducers of gene expression, which affect mRNA translation, and the levels of proteins production (BIRD, et al, 2004; CORISDEO; WANG, 2004).

The expression of recombinant proteins results from rapid responses of changes in the metabolism of microorganisms (DONG, et al, 1995; RINAS, 1996).

Currently, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) is one of the most widely used inductors in many high-end systems. Despite its effectiveness as a catalyst in various expression systems, one of the major drawbacks to using it is that it is toxic to most cells which limits its use in large-scale protein production systems (HUMBERTO and SILVA, 2006). Therefore, the discovery of new fewer toxic inductors than IPTG is of great use for the production of proteins (HUMBERTO, SILVA, 2006).

Minerals are involved in the functioning of the organisms as key components in cellular metabolism, from the lowest level of functioning of organisms to the most complex (BURGER, M.M, 2008). Magnesium is the second most abundant intracellular that serves as a cofactor for over 300 different enzymatic reactions, including carbohydrates, fat, electrolyte metabolism, nerve conduction, muscle contractility, protein synthesis and integrity (BURGER, 2008). It is considered as a group of mineral micronutrients classified as "major mineral" (essential mineral for life) and the fourth most abundant element in the intracellular grinding organ, but it is second only to potassium, which makes it a nutrient which has some important implications for essential metabolic functions (NIELSEN, 2006; LAI RES, 1991).

The H-ras protein has 188 amino acids and can be found in all tissues, whether they are adult or fetal. It is estimated that there are approximately 3×10^5 molecules per cell and that tumor cells can express up to six times as much H-ras protein (LOWY; WILLUMSEN, 1993). Based on the difficulties of producing proteins using IPTG as an inducer, the present study aims to evaluate the expression of total proteins from the wild-type and mutated H-ras group in *E. coli* W110 strains in different concentrations of magnesium sulfate ($MgSO_4$) compared to IPTG.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Cultures were carried out in Luria-Bertani Agar (LB) strains with *E. coli* W110 strains containing the 5262 base pair pDMI.1 plasmid and 3740 base pairs with a gene encoding the wild-type H-ras protein. Another culture was made using recombinant *E. coli* W110 carrying the pDMI.1 plasmid encoding the mutated H-ras protein, with a cysteine substituting a glycine at position 12, and the plasmid pDMI.1, according to Santos (1999).

Colonies were selected and submitted to culture in 5 mL of LB medium in the presence of antibiotics, in order to promote the selection of colonies of resistant bacteria. Cultures were incubated under stirring at 160 RPM (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) for 24 hours at 37 ° C.

Induction test

Colonies of both wild and muted condition were selected and submitted to liquid culture in 5 ml of LB broth in the presence of antibiotics (ampicillin and kanamycin) in order to select resistant colonies (i.e. having successfully internalized functional plasmids) being incubated overnight under stirring at 160 RPM and 37 °C.

After incubation period, 10 µl of the cultures were transferred to individual tubes containing 10 ml of LB with IPTG and MgSO₄ at concentrations of 0.05 M, 0.16 M, 0.25 M or 0.5 M. The bacterial cells were kept under stirring for 8 hours at 37° C and then centrifuged, lysed by ultrasonication and its protein content quantified according to Bradford method and analyzed by SDS-PAGE 12,5% according to Laemmli.

EXTRACTION, QUALIFICATION AND QUANTIFICATION OF TOTAL PROTEINS

For the extraction, previously weighed microtubes were separated, where Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, Lysozyme 1 mg / mL, pH 7.0) was added in a 0.2 g / mL ratio, where a same cell mass, 50mg, for all experiments. Initially, the microtubes containing the cells were immersed in ice and then in lysis buffer. Subsequently, the biomasses were submitted to ultrasonic lysis (HD2070, Bandelin Sonoplus) in six cycles of 12 seconds, with a maximum power of 40%.

This mixture was centrifuged for 10 minutes at 4 ° C and 12.000 RPM, and the supernatants were transferred to new microtubes for analysis. To qualify the total proteins, electrophoresis was performed with 100 µl of the supernatants, which were separated and precipitated overnight with acetone and then centrifuged at 15.000 RPM at 40 ° C for 15 minutes. The precipitate was loaded into 12.5% SDS-PAGE.

The protein quantification was made from the initial supernatant according to the Bradford methodology in A595 (BRADFORD, 1976). The results were analyzed applying the values of the readings are given in the equation $y = 0.0087x + 0.0025$ and

$R^2 = 0.9954$. The experiments were carried out in triplicates and the mean values were adopted for protein quantification.

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that cultures of *E. coli* carrying the mutated H-ras gene in pDMI.1 plasmid (Figure 1) showed a higher growth in the concentrations of 0.05 to 0.25 M of magnesium sulfate ($MgSO_4$) compared to the other concentrations and negative control as well as when compared with the absence of such ion in the presence of IPTG.

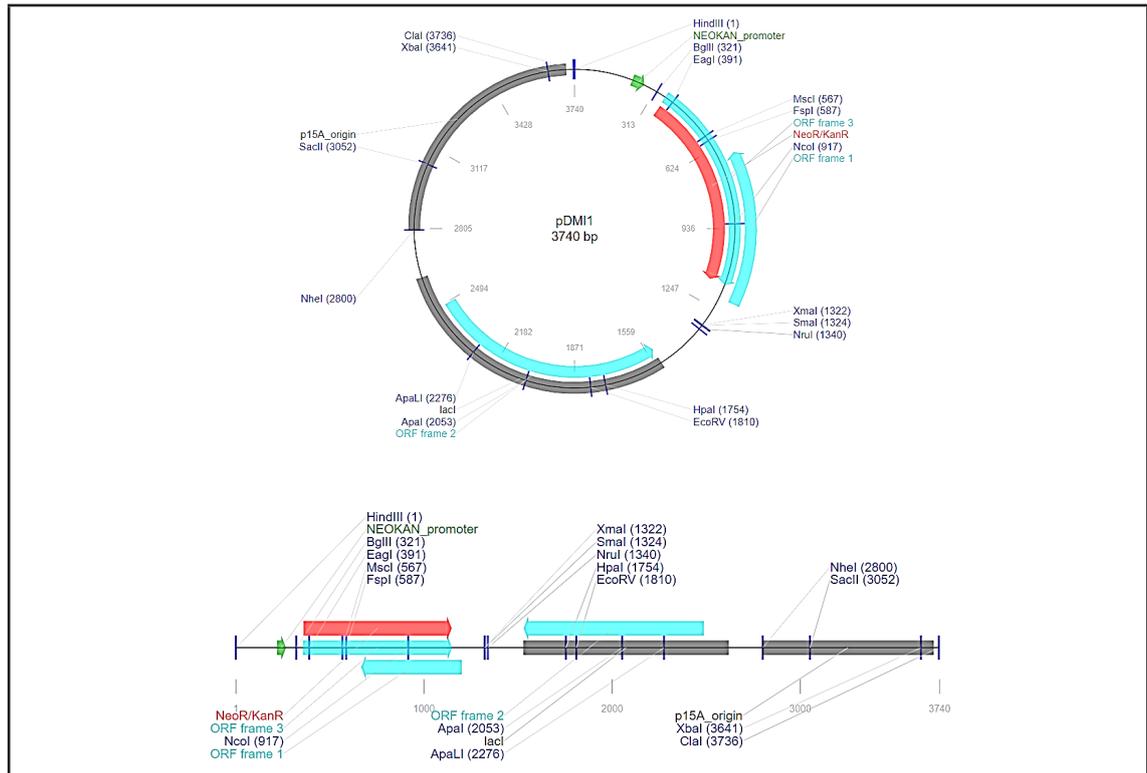


Figure 1. Circular and linear maps of pDMI1 plasmid.

At concentrations of 0.16 to 0.5M $MgSO_4$, protein expression was better in relation to the IPTG-induced cultures and the other $MgSO_4$ concentrations, data confirmed in electrophoresis (Figure 2), and protein quantification by the Bradford (Figure 3).

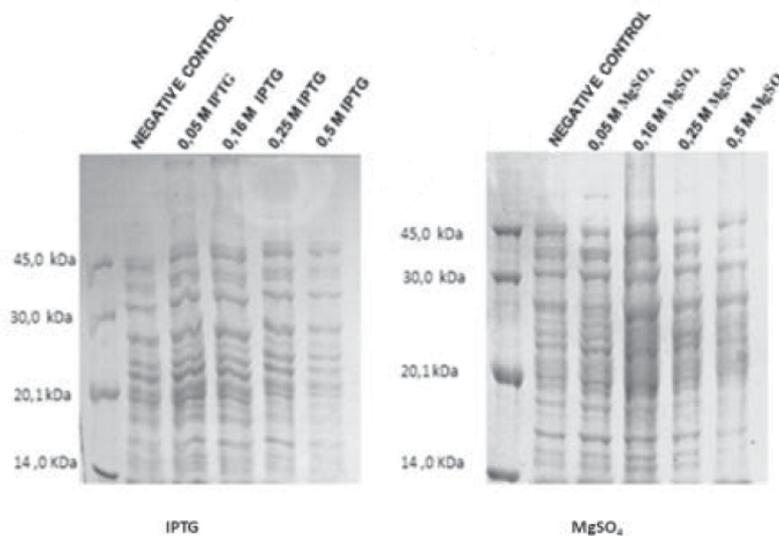


Figure 2. SDS-PAGE of *E. coli* carrying the mutated H-ras gene in different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

At the concentration of 0.16 M $MgSO_4$, the cultures showed a better protein concentration in relation to the others, in the presence of $MgSO_4$, and in relation to those in the presence of IPTG, data visualized in electrophoresis and by total protein dosage (Figure 2 and Figure 3).

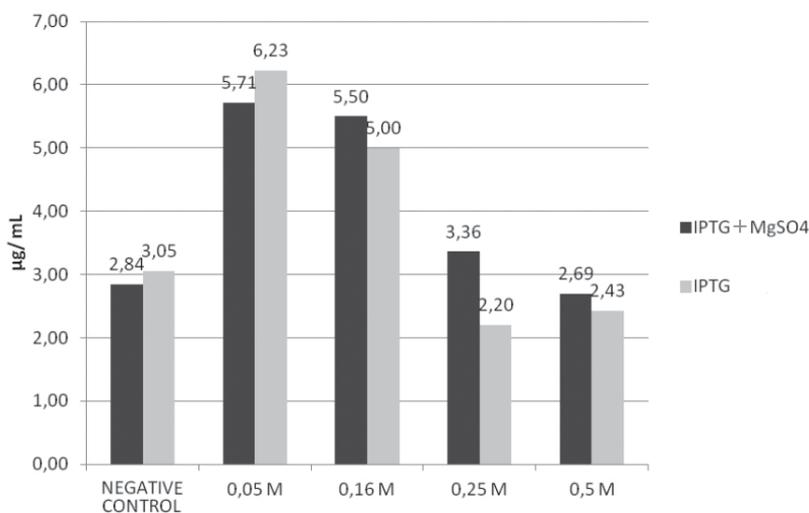


Figure 3. Total proteins ($\mu\text{g/ml}$) quantification of *E. coli* transporting the mutated H-ras gene at different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

The results suggest that, at these concentrations, $MgSO_4$ may act as a promoter of growth and expression of mutated and total H-Ras protein. As most of the proteins are accumulated in the intracellular portion of recombinant *E. coli*, the productivity is proportional to the final cell density (BA-BAEIPOUR et al., 2007).

To deviate from this variable, all experiments were standardized on the same amount of cellular biomass.

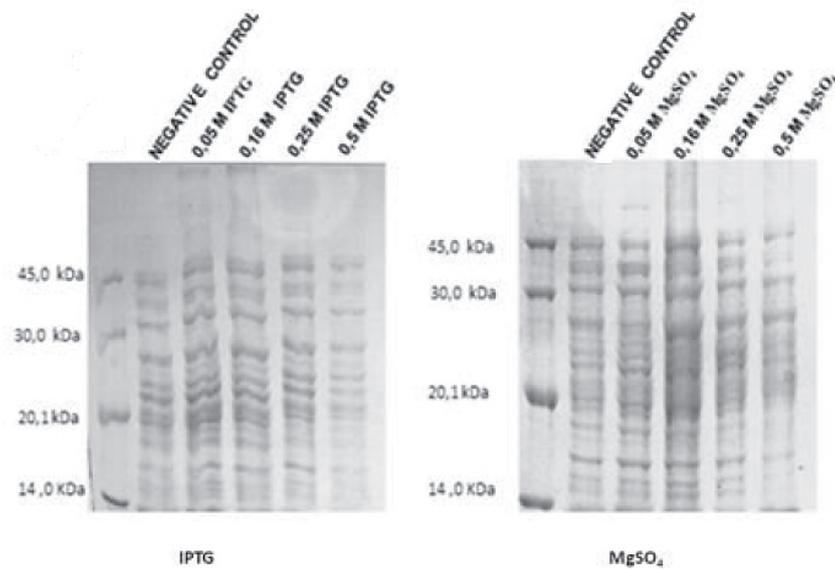


Figure 4. SDS-PAGE of *E. coli* carrying the wild H-ras gene in different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

The use of magnesium sulphate in the composition of the culture medium plays an important role in cell metabolism. The Mg^{2+} and Cu^{2+} ions present an important role for the living being (BURGER, 2008; PROHASKA, 2004). The Magnesium is incorporated as a source of magnesium ion, which is required in a variety of enzymatic reactions, including DNA replication (BIOSYSTEMS, 2009; EXPRESSION TECHNOLOGIES INC., 2003), which interferes, directly and quantitatively, in the protein expression of the cell culture.

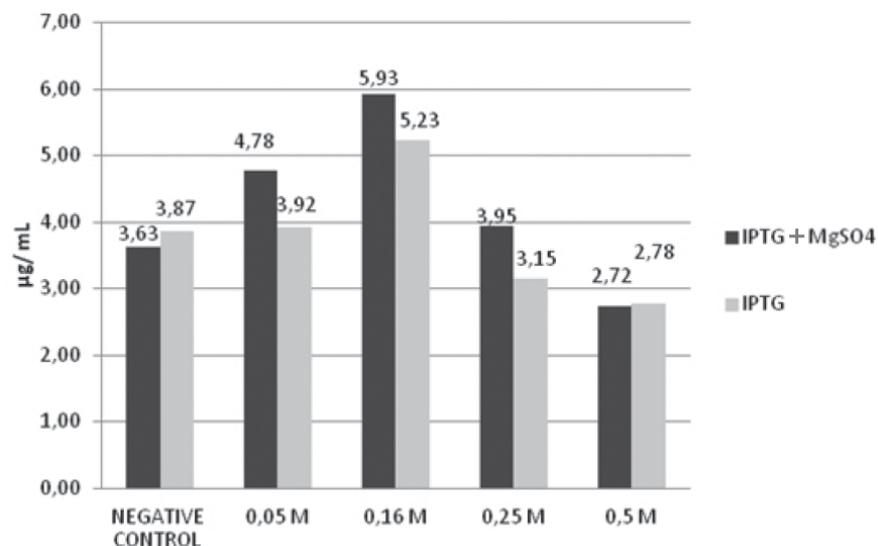


Figure 5. Total proteins ($\mu\text{g}/\text{mL}$) quantification of *E. coli* transporting the wild H-ras gene at different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

In cultures carrying the wild-type H-ras gene, the behavior is not very distant from that of the mutated H-ras gene. In the cultures carrying the wild-type gene, good protein expression was observed at concentrations between 0.05 and 0.5 M ($MgSO_4$), while

in the cultures of the mutated gene, a better expression was observed at 0.25 to 0.5 M (MgSO_4), relative to the IPTG-induced cultures. These results can be visualized in electrophoresis and total protein dosage of the bacterial and recombinant proteins from wild-type (Figure 4). In cultures carrying the mutated gene, the protein quantification differences were quite proportional to observed at wild-type (Figure 3 and Figure 5).

CONCLUSIONS

Magnesium sulphate was the best inducer of the expression of the mutated protein in comparison with IPTG at concentrations of 0.16, 0.25 and 0.5M MgSO_4 , and in the expression of the wild-type protein in concentrations 0.05, 0.16 and 0.25M compared to expression with IPTG in strains of *E. coli*.

MgSO_4 is suggested as an alternative inducer under these conditions, because it presents low cost, low cellular toxicity and excellent protein expression. The difference in protein quantification may be from bacterial proteins, but also from expressed recombinant protein, as shown in the results. The difference in the scale of the induction power of the expression between the mutated and the wild-type protein may be related to the structure of the inserted gene.

Based on these obtained data, we propose the usage of low MgSO_4 molar concentrations in current heterologous protein expression protocols performed in our group for the pDMI.1 vector. Additional studies are still needed in order to evaluate the effects of this salt on different expression systems at wide range of microorganisms.

REFERENCES

- ADAM, E.T. **Advances in Protein Chemistry**, 1991, v.42, CRC Press, 145.
- BIRD, P.I.; PAK, S.C.L.; WORRALL, D.M. & BOTTOMLEY, S.P. **Production of recombinant serpins in Escherichia coli**. *Methods*. 32: 169-176, 2004.
- BOS, J.L. **Ras oncogenes in human cancer: a review**. *Cancer Research*, v. 49, p. 4682-4689, 1989.
- BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.
- BURGER, M.M. **Comportamento do íon magnésio em prova triathlon meio-ironman**. *Brazilian Journal of Biomotricity*, 2007.
- CORISDEO, S.; WANG, B. B. **Functional expression and display of an antibody Fab fragment in Escherichia coli: study of vector designs and culture conditions**. *Protein Expression and Purification*. 34 : 270-279, 2004.
- DONG, H.; NILSSON, L. & KURLAND, C. G. **Gratuitous overexpression of genes in Escherichia coli leads to growth inhibition and ribosome destruction**. *J.Bacteriology*. 177:1497-1504, 1995.
- FONSECA, G. G.; ANTONIO, R. V. **Plasmid stability in PHA-producing recombinant Escherichia coli strains**. *Journal of Biological Sciences*. v. 6, n. 5, p. 893-898, 2006.

FOSSUM, B.; GEDDE-DAHL, T.; ERIKSEN, J.A.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. **Overlapping epitopes encompassing a point mutation (12Gly Arg) in p21 ras can be recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells.** European Journal Immunology. v. 23, p. 2687-2691, 1993.

HUMBERTO, J. L.; SILVA, T. H. A. **Síntese de derivados de Tio-β- alactopiranosídeos como indutor em sistemas de expressão de proteínas que utilizam o “lac- operon”.** 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006.

JOHNSON, WT and Thomas, AC (1999) **Cu deprivation potentiates oxidative stress in HL-60 cell mitochondria.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 221, 147.

KHOO, T. K.; SANTHNAM, A.; NOORDIN, R.; ARIFIN, N. **Production of Brugia malayi BmSXP recombinant protein expressed in Escherichia coli.** Malaysian Journal of Microbiology. v. 6, n. 2, p. 115-122, 2010.

LACAL, J.C.; SANTOS, E.; NOTARIO, V.; BARBACID, M.; YAMAZAKI, S.; KUNG, H.; SEAMANS, C.; MCANDEW, S.; CROWL, R. **Expression of normal and transforming H-Ras genes in Escherichia coli and purification of their encoded p21 proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 81, p 5305-5309, 1984.

LAIRES, M.J.; ALVES, F. **Changes in plasma, erythrocyte, and urinary magnesium with prolonged swimming exercise.** Magnesium research. 1991 Jun;4(2):119-22.

MIDLEY, R.S.; KERR, D.J. **Ras as a target in cancer therapy.** Critical Reviews in Oncology/Hematology. v. 44, p. 109-120, 2002.

NIELSEN, F.H.; LUKASKI, H.C. **Update on the relationship between magnesium and exercise.** Magnesium research. 2006; 19 83):180-9.

OLIVEIRA, W. A. **Efeito das fases do extrato de Aloe vera (L.) na resposta imunológica in vitro junto à proteína H-Ras.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. João Pessoa, Paraíba. 2008.

PROHASKA, JR and Gybina, AA (2004) **intracellular Cu transport in mammals.** J. Nutr. 134, 1003.

RINAS, U. **Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant Escherichia coli.** Biotechnol Prog. 12:196–200, 1996.

SANTOS, C. F. **Identification et Caracterisation des epitopes des Proteines p21-Ras et Etude de Interactions Peptides-Molecules HLA-DR.** Soutenu le 1er octobre 1999. Doctorat de l'Université Paul Sabatier-Toulouse III/INSERM U.395 Purpan, BP 3028-F-31024 Toulouse Cedex 3.

SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M.R.; WIESMULER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. **The Ras-Gap complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants.** Science, v. 277, p. 333-338, 1997.

SWARTZ, J.R. **Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins.** Current Opinion in Biotechnology. 12 : 195-201, 2001.

VILLAVERDE, A. & CARRIÓ, M.M. **Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies.** Biotechnology Letters. 25:1385-1395, 2003.

ANÁLISE DA IMPORTANCIA DE ESTUDOS DO GENE MDR1 E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE MULTIRESISTENCIA A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE

Lucas Lopes Lima

Bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário UNINOVAFAPI
lucaslopeslima@hotmail.com

Benedito R. Da Silva Neto

Pós-Doutorando em Genética Molecular com
concentração em Proteômica e Bioinformática.
Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública
pela Universidade Federal de Goiás. Mestrado
em Biologia Celular e Molecular. Tem experiência
na área de Microbiologia Genômica, Engenharia
Genética e Quimioinformática.
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública –
IPTSP/UFG
dr.neto@ufg.br

RESUMO: Introdução: A incidência de candidíase e infecções invasivas por Cândida está aumentando em todo o mundo. A Cândida é capaz de provocar infecções que abrangem desde de uma infecção cutânea, tópica, até infecções invasivas, sistêmicas, que envolvem sérios riscos à vida do paciente. Os antifúngicos azólicos, incluindo o Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, são usados largamente para tratar pacientes com infecções por Cândida. No entanto cepas de *C.albicans* resistentes às drogas azólicas surgiram, o que tornou a erradicação de infecções deste patógeno uma tarefa muito difícil, aumentando as chances de infecções recorrentes. **Objetivo:** Demonstrar

a importância em investigar os mecanismos moleculares de resistência aos fármacos azólicos em virtude de melhorar a eficácia do tratamento para candidíase. **Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática e estruturada de artigos com alvo a infecção por cândida, tendo como subalvo o gene ABCB1/MDR1 e seu envolvimento na multirresistência a fármacos. Realizada a partir do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), com data de publicação entre os anos de 2012 até o presente ano de 2018. **Resultados:** Diversos estudos analisados apontaram o gene MDR, associado a outros, como o ERG11, CAP1 e MRR1, como diretamente ou indiretamente responsável aos mecanismos de multirresistência e resistência cruzada às drogas utilizadas em tratamentos para Cândida. **Conclusão:** Como apontam diversos estudos, o gene MDR, associado a outros, como o ERG11, CAP1 e MRR1, está diretamente ou indiretamente ligado aos mecanismos de multirresistência, sendo o MDR1 um fator predominante e, por tanto, importante como alvo de estudos. **PALAVRAS-CHAVE:** Cândida; MDR1; multi resistencia.

ABSTRACT: Introduction: The incidence of candidiasis and invasive infections by *Candida* is increasing worldwide. *Candida* is able to

cause infections ranging from a skin disease, as a topical infection, to an invasive one, as systemic infections, which involve serious risks to the life of the patient. Azole antifungals, including Fluconazole, Itraconazole and Voriconazole, are widely used to treat patients with *Candida* infections. However, strains of *C. albicans* resistant to azolic drugs arose, which made the eradication of infections of this pathogen a very difficult task, increasing the chances of recurrent infections. **Objective:** To demonstrate the great importance of investigating the molecular mechanisms of resistance to azole drugs with the purpose of improving the efficacy of the treatment for candidiasis. **Methods:** This is a systematic and structured review of articles targeting candida infection, with the ABCB1/MDR1 gene as sub-target and its involvement in multidrug resistance. Made from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database, with publication date between the years of 2012 and the present year of 2018. **Results:** Several studies analyzed indicated that the MDR1 gene, associated with others, such as ERG11, CAP1 and MRR1, as directly or indirectly responsible for the mechanisms of multiresistance and cross resistance to the drugs used in treatments for *Candida*. **Conclusion:** According to several studies, the MDR gene, associated with others, such as ERG11, CAP1 and MRR1, is directly or indirectly linked to the mechanisms of multiresistance, with MDR1 being a predominant factor and, therefore, very important as a target for further studies.

KEYWORDS: *Candida*; MDR1, drug resistance.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas constituem um problema de saúde extremamente importante. Todos os anos, por volta de 1,2 bilhões de pessoas são infectadas por algum tipo de fungo e, mesmo assim, sua contribuição para o Índice Global de Doenças não é amplamente reconhecida. Algumas espécies de *Cândida* comensais pertencem à microbiota de humanos saudáveis. O comprometimento da imunidade do hospedeiro ou da microbiota hospedeira normal pode levar à infecção por *Cândida* (Candidíase)^{7, 11}.

A incidência de candidíase e infecções invasivas por *Cândida* está aumentando em todo o mundo¹.

A Candidíase ocorre frequentemente em recém-nascidos, em pessoas como sistema imune deprimido como em pacientes que desenvolveram a AIDS, e também em pessoas que estão sendo tratadas com antibióticos de amplo espectro. Das 150 espécies de *Cândida*, poucas podem causar infecções em humanos, sendo a *Cândida albicans* a mais patogênica de todas⁸.

A *Cândida*, fungo predominantemente levedura, é um organismo comum presente na mucosa reprodutiva e gastrointestinal e pode ser isolado da cavidade oral^{7, 8} e, portanto, até 80% da população saudável é considerada propensa às infecções fúngicas mais comuns, como a candidíase⁸.

Cinco espécies de *Cândida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, e *C.krusei*) somam em mais de 90% de todos os diagnósticos de casos de candidíase tópica e invasiva, mas a frequência relativa varia dependendo da população envolvida, região geográfica, exposição prévia a agentes antifúngicos e idade do paciente¹¹.

A *C.albicans* é o agente etiológico mais comum em casos de candidíase, porém, *C.glabrata* e outras espécies de *cândida* estão sendo consideradas hoje em dia como microrganismos oportunistas emergentes, pois representam um aumento significativo no número de infecções fúngicas, que dependem da resistência dessas leveduras a vários agentes antimicrobianos. A *C.glabrata* está em segundo lugar em isolados de infecções por *Cândida*, e junto com a *C.albicans* são responsáveis por aproximadamente 75% de todas as candidíases sistêmicas¹¹.

Entre as outras espécies também patogênicas para humanos incluem, entre outras, a *C.lusitaniae*, *C.dublinsiensis*, *C.kefyr*, *C.guilliermondii* e a *C.stellatoidea*⁸.

Pessoas imunocomprometidas são muito susceptíveis a infecções por fungos. A má nutrição, que engloba tanto a subnutrição quanto a supernutrição, é responsável por um enorme peso na saúde global da população. Os resultados da má nutrição também podem ser vistos através de infecções microbianas recorrentes, e também leva à inflamação crônica implicando em um comprometimento da resposta imune¹¹.

A *Cândida* é capaz de provocar infecções que abrangem desde de uma infecção cutânea, tópica, até infecções invasivas, sistêmicas, que envolvem sérios riscos à vida do paciente⁸.

As doenças fúngicas infecciosas, como a candidíase, são iniciadas pela adesão das células de levedura nas células hospedeiras. A adesão é realizada por proteínas adesinas que estão ligadas à parede celular e se estendem para fora da mesma para interagir com outras células ou substratos. A aderência de leveduras patogênicas nos tecidos hospedeiros pode ocorrer em diferentes locais no corpo humano e nas células, um dos alvos potenciais de adesão é o glicocálice. A adesão da *Cândida* em células hospedeiras, especialmente em células epiteliais, representa o início da infecção, que poderá se seguir pela invasão e disseminação. A estratégia das diferentes espécies de *Cândida*, para aderir, invadir tecidos, obter nutrientes e evadir o sistema imune, variam significativamente dependendo da espécie. Como exemplo, a *C.albicans* adota uma estratégia mais agressiva para subverter a resposta imune do hospedeiro e obter seus nutrientes. Já a *C.glabrata* possui uma estratégia baseada em se esconder e evitar o sistema imune do hospedeiro, persistentemente, sem causar danos graves¹¹.

A *C.albicans* tem a habilidade de adotar diferentes morfologias, como cepas, hifas e pseudo-hifas, através dos estímulos que recebe do ambiente, o que influencia na virulência da espécie. Células elípticas, alongadas, que estão ligadas umas às outras são chamadas de pseudo-hifas, já as células que são consideradas hifas verdadeiras são caracterizadas como cilíndricas e separadas por paredes septais perpendiculares⁸.

O diagnóstico é crucial não apenas para a confirmação da infecção, mas também para a identificação da espécie do patógeno causador, e iniciar o antifúngico correto

para o tratamento. Quando se compara uma candidíase cutânea a uma candidíase disseminada, a última é mais difícil de ser diagnosticada devido a apresentação clínica inespecífica. Para um tratamento eficaz, a identificação correta da espécie de cândida é essencial⁸.

Métodos convencionais de diagnóstico de candidíase (observação direta, cultura em ágar, testes sorológicos, entre outros), são menos efetivos e demorados, por tanto, técnicas moleculares e de imunodiagnóstico são recomendadas para diagnóstico rápido e específico⁸, podendo assim iniciar o tratamento com os fármacos mais adequados à espécie causadora da infecção.

Os antifúngicos azólicos, incluindo o Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, são usados largamente para tratar pacientes com infecções por Cândia. No entanto cepas de *C.albicans* resistentes às drogas azólicas surgiram, o que tornou a erradicação de infecções deste patógeno uma tarefa muito difícil, aumentando as chances de infecções recorrentes. Portanto, investigar os mecanismos moleculares de resistência aos fármacos azólicos é de grande importância para melhorar a eficácia do tratamento da candidíase^{2, 6}.

O gene MDR1 (ABCB1) é um gene do tipo cassetes de ligação por ATP (*ATP-binding cassette* – ABC) que é estudado pela sua função de bomba de efluxo, o qual transporta ativamente compostos xenobióticos para fora da célula⁹. Em alguns trabalhos já se evidencia sua participação em mecanismos de multirresistência a antifúngicos, transformando infecções fúngicas simples em problemas graves de saúde, podendo levar a morte^{6, 8}.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, fez-se uma revisão sistemática e estruturada de artigos que tinham como alvo a infecção por cândia. Depois uma análise teórica e fundamentada, para correlacionar o gene ABCB1/MDR1 e seu envolvimento na multirresistência a fármacos, em *Candida sp.* A revisão foi realizada utilizando-se do bando de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), buscando artigos com data de publicação entre os anos de 2010 até o presente ano de 2018.

Como descritores, foram utilizados os seguintes: *Candida*, *Candidiasis*, *MDR1*, *drug resistance*. Adotou-se como critérios de exclusão os seguintes: *informational update*, *reports*, além de artigos que se desviavam do alvo central dessa revisão. A partir dessa busca, obteve-se um total de 91 artigos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 2013 o CDC (Centers for Disease Control and Prevention)⁴, localizado nos Estados Unidos da América, publicou um manual contendo uma lista das ameaças de microrganismos resistentes a antimicrobianos, intitulado: “CDC – Antibiotic Resistance

Threats in the United States, 2013: Fluconazole-Resistant *Candida*". Nesse manual o CDC já classificava a *Candida* resistente ao fluconazol como nível 4, numa escala de 1 a 5 de ameaça, e divulgou dados conforme a figura 1.

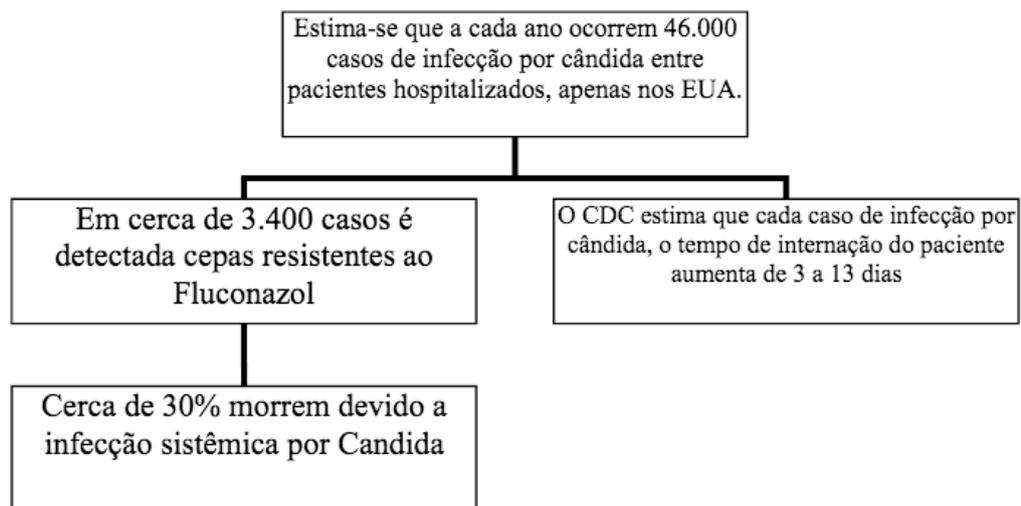


Figura 1 - Estimativa anual de infecções por candida nos EUA

Após a interação da cepa de *C. albicans* com as células epiteliais, o organismo desencadeia a liberação de citocinas e quimiocinas, que por sua vez causam a ativação de células inflamatórias, bem como células imunes, a exemplo dos fagócitos, células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T. Em seguida as células dos fungos são identificadas, envolvidas e mortas pelos fagócitos por surto oxidativo, bem como pela liberação de citocinas⁸.

Nos tratamentos para candidíase, o manejo de infecções por *Candida* é geralmente baseado na localização anatômica da infecção, no estado imunológico do paciente, fatores de risco para os pacientes com infecção, espécies de *Candida* responsáveis pela patologia e, por último, na suscetibilidade dessas espécies ao antifúngico. Um dos critérios mais importante para a seleção de agentes antifúngicos é a suscetibilidade, da espécie de *Candida* isolada, aos agentes potenciais. A Tabela 1 representa a susceptibilidade in vitro de de cepas de *Candida* isoladas de hemoculturas, aos agentes antifúngicos mais utilizados frequentemente, com base na resistência apresentada⁸.

Espécie de Candida	AMB	5-FC	FCZ	ITZ	VCZ	PCZ	AFG	CFG	MFG
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. grabrata</i>	S	S	I-R	S-I-R	S-I-R	S-I-R	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S-I	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	I	I	I
<i>C. krusei</i>	S	R	R	I-R	S-I-R	S-I-R	S	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	R
<i>C. lusitanae</i>	S-I-R	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela 1 – Susceptibilidade in vitro das espécies de *Candida* mais patogênicas.

AMB: Amfotericina-B; 5-FC: Flucytosina; FCZ: Fluconazol; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; AFG: Anidulafungi; CFG: Caspofungi; MFG: Micafungi; S: Suscetível; I: Intermediário; R: Resistente⁸. (Hani, 2015)

Para o tratamento de infecções fúngicas, os agentes azólicos são os mais amplamente utilizados^{1, 5, 10} entre eles o Fluconazol é a droga preferida em muitos países, por causa do seu baixo custo aliado ao seu perfil mais seguro¹. O fluconazol atua inibindo a biossíntese de ergosterol, o principal esteroide em membranas de células fúngicas. Mutações na enzima alvo da droga, esteroide 14 α -desmetilase, codificada por ERG11, resulta em trocas de aminoácidos que reduzem a afinidade da enzima pela droga⁷.

O gene MDR1 pertence à classe dos genes ABC, que estão presentes em todos os reinos de vida, e são responsáveis pela homeostase celular. Esses genes codificam proteínas transportadoras multimembranosas, que canalizam domínios formando um poro e domínios de ligação a nucleotídeos intracelulares para transporte, dependente de ATP, de substratos ou íons através da membrana celular. Apesar das proteínas codificadas por genes ABC bacterianos funcionarem como importadores e exportadores, todas as proteínas codificadas por genes ABC eucarióticos são bombas de efluxo⁹.

Os genes MRR1, TAC1 pertencem à família do fator de transcrição do aglomerado de zinco, que é exclusivo do reino fúngico, e que regulam a expressão das bombas de efluxo MDR1 e CDR1/CDR2, respectivamente⁷.

O gene MDR1 foi originalmente identificada como um gene que confere resistência a múltiplos fármacos (MDR – *Multi Drug Resistance*) a células cancerígenas, e as proteínas relacionadas posteriormente a esses genes, foram descobertas como transportadoras alternativas, mediadoras de mecanismos de resistência aos fármacos³.

P-glicoproteína, codificada a partir do gene MDR1, participa de uma bomba de efluxo que contribui para a defesa da célula contra toxinas do ambiente. Ela transporta uma grande variedade de componentes estruturalmente diversificados, estando envolvida na limitação da absorção de xenobióticos³. A P-glicoproteína pode ser induzida ou inibida pela presença de xenobióticos, portanto, contribuindo para a disposição e interação das drogas com a célula³.

Mutações com ganho de função nos fatores de transcrição MRR1 e TAC1, que regulam a expressão das bombas de efluxo MDR1 e CDR1/CDR2, respectivamente, resultam em superexpressão constitutiva de seus genes-alvo e são responsáveis pela resistência ao Fluconazol em muitos isolados clínicos de *C. albicans*. É concebível que mutações de ganho de função, como as encontradas em MR1, TAC1, também possam ocorrer em outros membros da família e conferir novos fenótipos que são vantajosos sob condições adversas⁷.

Um estudo, realizado em 2012, já demonstrou que dois polimorfismos no gene MDR1, podem estar associados com o desenvolvimento dessa resistência

ao fluconazol. Estudos mais recentes demonstraram que alterações na expressão de genes como o MDR1, Cap1 e Mrr1, estão associados com esse mecanismo de resistência, transportando ativamente a droga para fora da célula⁶.

Segundo Andrea Lohberger¹⁰ em um artigo publicado em 2014, a resistência a fármacos azólicos pode ocorrer em *C.albicans*, principalmente, por superexpressão do gene transportador de múltiplas drogas CDR1, CDR2 ou MDR1 ou pela superexpressão de ERG11, que codifica o alvo azólico. A expressão desses genes é controlada pelos fatores de transcrição (TFs) TAC1 (envolvidos no controle da CDR1 e CDR2), MRR1 (envolvido no controle de MDR1) e UPC2 (envolvido no controle de ERG11)¹⁰.

A base molecular da resistência ao Fluconazol em *C.parapsilosis* foi estudada por Mohammad Asadzabeh¹ e tipicamente envolve a superexpressão e/ou mutações em genes como o ERG11 e, adicionalmente, a superexpressão de bombas de efluxo como o CDR1, e o MDR1, possivelmente devido a mutações nos seus reguladores transcritpcionais, TAC1 e MRR1, respectivamente¹.

Em seu trabalho Feng, *et al*⁶ sugere que a superexpressão do gene MDR1, regulada pela superexpressão do gene Cap1 estão associados com o desenvolvimento de cepas resistentes ao Fluconazol. A superexpressão do gene MDR1 associada com resistência cruzada entre Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, estão correlacionadas com mutações, nos genes Cap1 e Mrr, e não com a superexpressão desses genes⁶.

Nesse mesmo estudo, Feng *et al*⁶, ainda demonstrou que as cepas resistentes ao Fluconazol tiveram um aumento significativo nos níveis de mRNA de CAP1 e MDR1, ao se comparar com cepas sensíveis ao Fluconazol ($P < 0.01$). Os níveis de mRNA dos genes CAP1, MRR1 e MDR1 estavam significativamente aumentados em cepas resistentes ao Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, quando comparado com cepas sensíveis aos três agentes ($P < 0.001$, $P = 0.037$ e $P < 0.001$, respectivamente). Wenli Feng conclui em seu trabalho que a expressão de Cap1 estava positivamente correlacionada com a expressão de MDR1 em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, o que indica que a superexpressão de CAP1, em vez de MRR1, pode levar à superexpressão de MDR1 e ao desenvolvimento de resistência ao fluconazol⁶.

Os níveis de mRNA dos genes CAP1 e MRR1 aumentaram nas cepas resistentes ao Itraconazol, mas não nas resistentes ao Voriconazol. No entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão das bombas de efluxo MDR1 entre as cepas resistentes e as sensíveis ao Itraconazol ou entre as cepas resistentes e sensíveis ao voriconazol. Isto sugere que a resistência do Itraconazol pode envolver a superexpressão de CAP1 e MRR1, mas não a superexpressão de MDR1. A resistência ao Voriconazol pode não estar associada ao CAP1, MRR1 ou MDR1; pode ser atribuída a outros mecanismos moleculares, como mutações em CAP1 e MRR1, e alterações na expressão de genes ERG ou mutações em ERG11. Os níveis de mRNA de CAP1 e MRR1 foram aumentados em cepas resistentes ao Itraconazol, mas não nas cepas resistentes ao Voriconazol. Estas observações indicaram que a superexpressão de MDR1 pode ser responsável pela resistência cruzada entre Fluconazol, Itraconazol e

Voriconazol, e pode não ser regulada pela superexpressão de CAP1 e MRR1, e sim por mutações em CAP1 e MRR1⁶.

Em outro estudo, uma paciente do sexo feminino com leucemia, apresentou infecção sistêmica persistente por *C.tropicalis*, sendo detectada uma cepa multirresistente. Os testes mostraram uma superexpressão do gene de multirresistência nas cepas, aos fármacos azólicos, utilizando-se de PCR em tempo real. A PCR mostrou superexpressão significativa do gene MDR1 em comparação com as duas cepas suscetíveis¹².

CONCLUSÃO

Como apontam diversos estudos, o gene MDR, associado a outros, como o ERG11, CAP1 e MRR1, está diretamente ou indiretamente ligado aos mecanismos de multirresistência e resistência cruzada às drogas utilizadas em tratamentos para Cândida.

Sendo assim, o gene MDR1 se mostra um fator constante no desenvolvimento de multirresistência a fármacos azólicos para tratamento da Candidíase, portanto, um alvo potencial para estudos de novos tratamentos, novos fármacos ou iteração de fármacos e compostos desenvolvidos para silenciar o gene e reduzir a resistência da cepa

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela saúde e proteção todos os dias, a toda a minha família, em especial a minha mãe, que é um exemplo de dedicação e amor e que é todo o meu suporte nessa vida. Agradeço também aos professores Dr. Benedito Neto, Msc. Rodrigo Santos e Msc. Aline Helena, por todo conhecimento e experiência passados a mim, por toda atenção e paciência, e que me serviram de inspiração durante esses anos. Não posso esquecer também de todos os amigos e colegas dessa turma excepcional, que levarei para sempre comigo, e que me ajudaram a encerrar mais este ciclo em minha vida.

REFERÊNCIAS

Asadzadeh M *et al.* Epidemiology and Molecular Basis of Resistance. *Microbial drug resistance*. 00, 2017, Vol. 00.

Barceló S *et al.* Interactions of a prenylated Bavonoid from *Dalea elegans* with Buconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 2017.

Brinkmann U. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *The Pharmacogenomics Journal*. 1, 4 de Junho de 2001, pp. 59-64.

Centers for Disease Control and Prevention. CDC – Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. [ed.] CDC. U.S. Department of Health & Human Services. 2013, pp. 63-64.

Demers EG *et al.* Evolution of drug resistance in an antifungal-naive chronic *Candida lusitanae* infection. *PNAS*. 2018, pp. 1-6.

Feng W *et al.* Research of Mrr1, Cap1 and MDR1 in *Candida albicans* resistant to azole medications. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 15, 2018, pp. 1217-1224.

Hampe I. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. [ed.] Boston Children's Hospital, United States Julia Ruth Koehler. *PLOS Pathogens*. 27 de Setembro de 2017, pp. 1-26.

Hani U *et al.* Candidiasis: A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in. *Infectious Disorders – Drug Targets*. 1, 16 de Fevereiro de 2015, Vol. 15, pp. 42-52.

Hodges LM *et al.* Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 21, Março de 2011, Vol. 3, pp. 152-161.

Lohberger A *et al.* Distinct Roles of *Candida albicans* Drug Resistance Transcription Factors TAC1, MRR1, and UPC2 in Virulence. *Eukaryotic Cell*. 1, 2014, Vol. 13, pp. 127-142.

Willaert RG. Adhesins of Yeasts: Protein Structure and Interactions. *Jornal of Fungi*. 4, 27 de Outubro de 2018, Vol. 11, pp. 1-28.

You L *et al.* ERG11 Gene Mutations and MDR1 Upregulation Confer Pan-Azole Resistance in *Candida tropicalis* Causing Disseminated Candidiasis in an Acute Lymphoblastic Leukemia Patient on Posaconazole Prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7, Julho de 2017, Vol. 61, pp. 1-5.

EVALUATION OF PLASMA MIRNAS FOR EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

Alexis Germán Murillo Carrasco

Centro de Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres
Lima-Perú.

Stefano Giannoni Luza

Centro de Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres
Lima-Perú.

Oscar Acosta Conchucos

Centro de Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres
Lima-Perú.

José Manuel Cotrina Concha

Departamento de cirugía de mamas, Instituto nacional de Enfermedades Neoplásicas – INEN
Lima-Perú.

Alfredo Aguilar Cartagena

Unidad de Investigación Básica y Traslacional, Oncosalud-AUNA,
Lima-Perú.

Lia Pamela Rebaza Vásquez

Unidad de la Mama, Oncosalud-AUNA
Lima-Perú.

Ricardo Miguel Fujita Alarcón

Centro de Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres
Lima-Perú

José Luis Buleje Sono

Centro de Genética y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres
Lima-Perú

RESUMO: Os microRNAs (miRNAs, miRs) são pequenos fragmentos de RNA com potencial atividade no bloqueio da transcrição e podem ser oncogênicos ou supressores tumorais, dependendo a função dos genes alvejados por eles. Este capítulo de livro tem o intuito de explicar como uma análise de expressão de miRNAs poderia dar luzes sobre o processo oncológico, devido a sequências associadas a tipos de câncer específicos. Além disso, os miRNAs tornam-se bons marcadores para a detecção precoce e o monitoramento do câncer através de biopsias líquidas porque apresentam um resultado de múltiplas interações envolvidas nas neoplasias. Para isso, avaliamos a expressão de miRNAs comparando amostras de plasma de 30 pacientes com câncer de mama e 30 mulheres sanas. Os miRNAs foram extraídos com o kit miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Germany), convertidos a cDNA y quantificados por PCR digital (dPCR), usando a plataforma QuantStudio 3D (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA). Analisamos a expressão de miR-10b, miR-21, miR-145 e miR-202; nossos resultados indicam uma

tendência à superexpressão do miR-10b ($p=0.334$) e miR-21 ($p=0.741$) nas pacientes, aliás, achamos uma diminuição na expressão do miR-145 ($p=0.0064$) e no miR-202 ($p=0.394$). Os nossos achados concordam com informações da literatura para estudos feitos em biopsias solidas. Finalmente, nós apresentamos características nos miRNAs de plasma que abrem portas para a inclusão deles como alvos em futuros estudos com biopsias líquidas no câncer de mama.

PALAVRAS-CHAVE: miRNA, biopsia líquida, câncer de mama, PCR digital

ABSTRACT: microRNAs (miRNAs, miRs) are small RNA regions with potential anti-transcriptional activity; each miRNA has several targets and they were classify according to its function. Recently, it was propose as a useful tool for cancer analysis and sequences with altered expression could define some cancer types. Additionally, these sequences are an interesting target in liquid biopsy studies because they represent a pool of genetic interactions, associated with neoplastic development. This book chapter aims to explain how the miRNAs expression may offer an idea about the oncologic process through silencing their targets; after that, the miRNA detection in plasma as liquid biopsy could support new possibilities to early diagnosis and monitoring of cancer. We obtained plasma from 30 breast cancer patients and 30 healthy women and miRNAs were extracted with the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Germany), converted to cDNA and quantified by digital PCR through QuantStudio 3D platform (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA). We analyzed regions of miR-10b, miR-21, miR-145 and miR-202. Our results show a trend on the overexpression of miR-10b ($p=0.334$) and miR-21 ($p=0.741$). In addition, we found a statistical-support for the sub-expression of miR-145 ($p=0.0064$) and a slight sub-expression of miR-202 ($p=0.394$), which is in agreement with the literature. In conclusion, we characterize the liquid biopsy as a potential early-diagnosis tool for breast cancer through miRNA analysis.

KEYWORDS: miRNA, liquid biopsy, breast cancer, digital PCR

1 | INTRODUCTION

The cancer generates a non-controlled proliferation and several modifications occurs in the cellular environment. Some of this modifications may not be heritable (epigenetic variations) and it produces effects on genetic expression (You & Jones 2012). Epigenetics mainly comprises studies of DNA methylation, histone modification and levels of microRNAs (miRNAs), considered new mechanisms of regulation of gene expression. The miRNAs are a class of non-coding RNAs, that is, those that do not code for proteins that regulate post-transcriptional gene expression (Li & Rana 2014).

In 1993, the first miRNA was discovered during a study on the Lin-4 gene of *C. elegans* that regulates its development and did not code for protein. However, Lin-4 produced two RNAs of short sequence, one of 22 nt and another of 61 nt in length. These RNAs showed antisense zones complementary to multiple sites of the 5'UTR

region of the Lin-14 gene. This was evidenced by a decrease in the amount of protein without affecting miRNA levels (Chuang & Jones 2007).

The apparition of these miRNAs results mainly of cell lysis; however, recently studies affirm the mobilization of microvesicles, like exosomes, carrying little sequences of RNA with anti-transcriptional activity (Turchinovich et al., 2012) and we need to know more about the miRNA resistance to degradation factors like enzymes and other factors regulating their specificity (Pritchard et al., 2012). Currently, the regulatory role of miRNAs is accepted in different biological processes carried out in multicellular organisms, such as differentiation, proliferation and apoptosis or cell death. They are expressed in serum, plasma and other body fluids in stable form allowing their use as a potential biomarker due their deregulation has been linked to some diseases (Ambros 2004; Ma et al., 2012), such as breast cancer. Also, we know almost 1000 human miRNAs (hsa-miRs) and each one might be regulated by different pathways (Ma et al., 2012) and seventy-nine of them has been described like biomarkers in fluids for breast, lung, prostate and other cancer kinds (Pritchard et al., 2012) . Many efforts builds prediction databases for sequences and targets of these miRNAs (You & Jones 2012). In several cancer types, some miRNAs were signed as subexpressed or overexpressed depending their distribution and effect in the disease.

On the other hand, the most popular cancer markers in fluids are proteins such prostate specific antigen (PSA) or carbohydrate antigen 125 (CA125); however, the main problem with them is a low sensitivity and discrimination powerful (Ma et al., 2012) generating issues to early stages identification, and subsequently, problems on treatment of these individuals. So, the discovery of miRNAs like potential fluid biomarkers for early diagnosis and monitoring is promissory, starting in the distinctive and non-invasive features of miRNAs for their utilization on liquid biopsies (Ma et al., 2012). In this book chapter, we show a pilot study with breast cancer patients, analyze their miRNA levels and discuss how some of them can drive the oncologic process.

2 | MATERIALS AND METHODS

We collected peripheral blood of 30 breast cancer patients from the Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) and 30 healthy controls from Oncosalud (AUNA) and Universidad de San Martín de Porres (USMP), all institutions from Lima, Perú. Patients and controls were asked to sign an Informed Consent approved by the USMP Ethics committee (IRB00003251-FWA0015320). The plasma was separated by double centrifugation at 4 °C, then total miRNA was extracted with the “miRNeasy Serum/Plasma Kit” (Qiagen, Germany) and converted to cDNA (TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis, ThermoFisher Scientific, Boston, MA, USA). Digital PCR (dPCR/ QuantStudio 3D platform with chips (20KChips) of 20,000 independent dots for analysis, ThermoFisher Scientific, Boston, MA, USA) was performed to quantify four

human miRNAs: hsa-miR-10b (ID: 478494_mir), miR-21 (ID: 477975_mir), miR-145 (ID: 477916_mir) and miR-202 (ID: 478417_mir). The number copies was calibrated with an exogenous control (cel-miR-39) from *Caenorhabditis elegans*, included in the miRNA extraction process. The quantity of miRNA was obtained by the use of QuantStudio3D Analysis Suite v.3.1.3 Cloud Software (ThermoFisher Scientific, Boston, MA, USA) to analyze the call (dye fluorescence) and quality (0-100% qualification) for each well or dot. In this study, we used a minimal threshold above 10% due low concentration and fragility of the sample. The statistical tests was performed with the Prism 5 software (Graphpad software Inc., La Jolla, CA, USA).

3 | RESULTS

Our experimental groups showed a similar age: 56.23 ± 11.29 in patients and 47.26 ± 14.70 years in controls. To obtain the quantification values, we took the figures generated by QuantStudio 3D Analysis Suite and established thresholds.

Each chip was charged using just one fluorophore (VIC for this assay), so we took 300 chips to analyze the fluorescence thresholds. This analysis determines 1200 RFU (Relative Fluorescence Units) as frontier between non amplified and amplified dots, as showed in the figure 1.

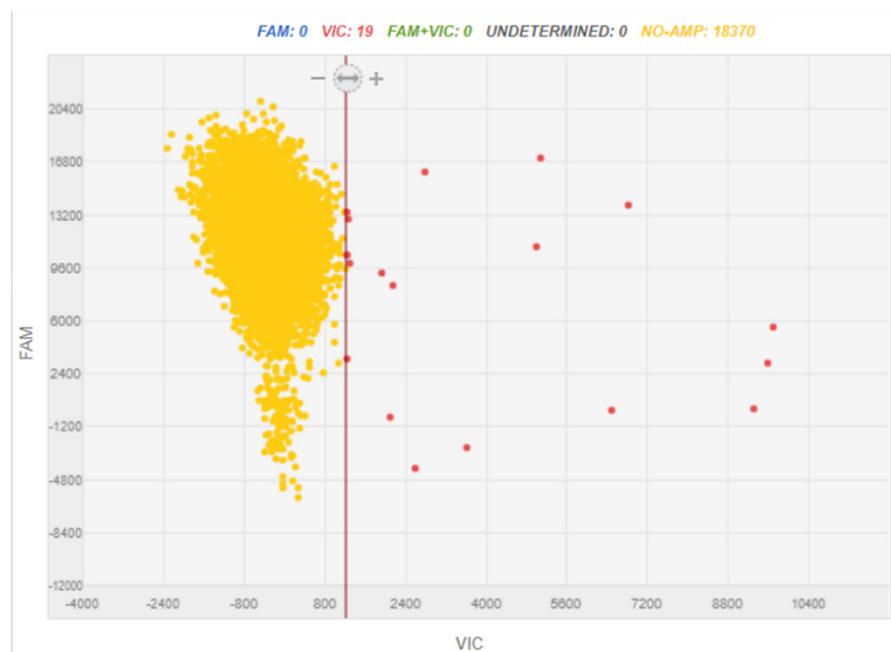


Figure 1. Establishment of threshold for digital quantification. All points located at right of threshold (red points) would be considered as positive amplification and yellow points are estimated like empty wells (without amplification).

So, for each sample, the number of red points of control marker (cel-miR-39) was used to calibrate all the quantifications with the standard quantity of exogenous copies (added at the sample in the miRNA extraction). Since it doesn't exist differences among patient and control in exogenous marker level ($p=0.8360$), we can certify the

next comparisons.

In a comparison among patients and controls, just one marker showed a statistical difference (miR-145, $p=0.03$); however, all other miRNAs showed a trend to increase or decrease their expression depend the individual condition, as presented in the Figure 2.

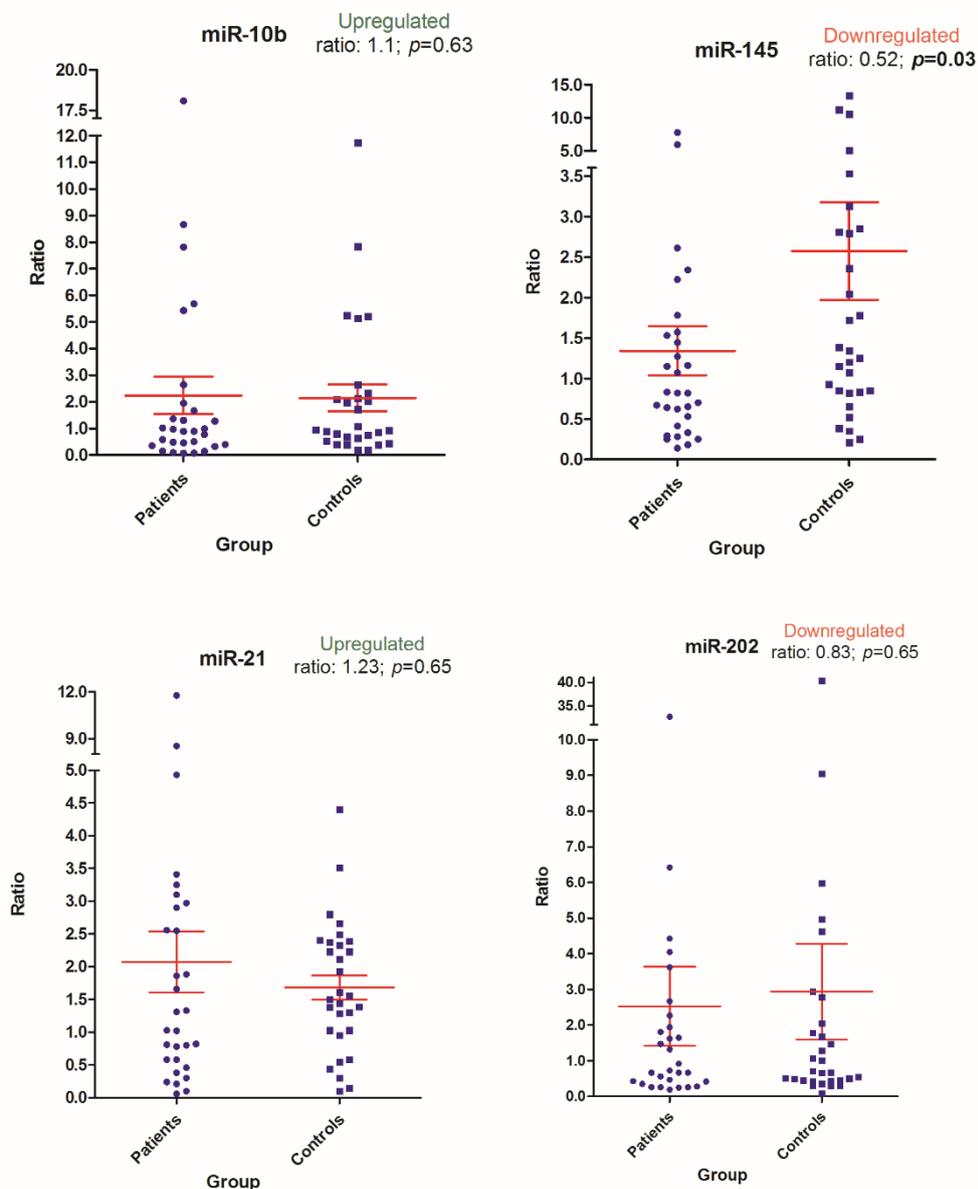


Figure 2. Comparison among breast cancer patients and controls using plasma miRNAs. Each quadrant represents a miRNA type, miR10b and miR-21 showed a trend to overexpression in patients (right half); in contrast to has seen in miR-145 and miR-202 (left half).

Then, we compare miRNA levels correlated with neoadjuvant administration, and immunopathological characteristics: Expression of HER2, progesterone (PR) or estrogen (ER) receptors. Thus we found a significant overexpression of miR-10b in patients without neoadjuvant scheme. Besides there were statistical differences in the overexpression of miR-145 and miR-202 in HER2 positive patients, also in the down regulation of miR-202 in estrogen positive patients. Our extended results are showed

in the Figure 3.

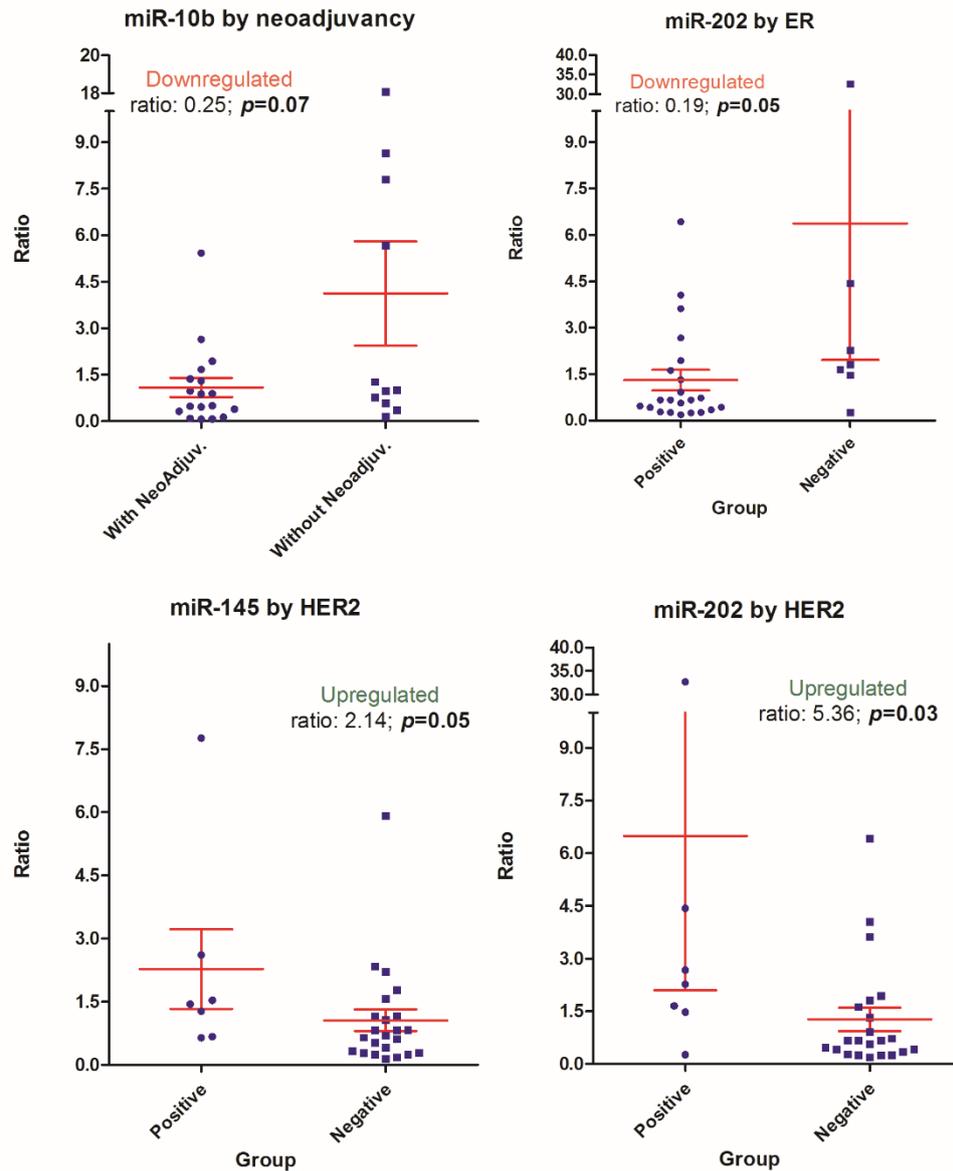


Figure 3. miRNA levels in breast cancer patients according clinical characteristics. For each miRNA and condition represented are included statistical p value (through Mann-Whitney test) and the mean ratio among positive and negative conditions.

4 | DISCUSSION

In this book chapter, we show results about miRNA levels in plasma of breast cancer patients and healthy controls; and our aim is to explain why these miRNAs could be used as markers and its significance at the physiological level.

So, a critical criteria for start this study are the sample conditions; in our case, all participants are women and all of them was classified by an oncologist how cancer positive (patients) or negative (controls). The mean age among both groups showed some differences, but, it doesn't affect our results due a population factor, where major part of old-age women don't assist to clinical consultation if don't show a clear suspicion

of cancer.

According with the information purposed by Pritchard et al., 2012, Turchinovich et al., 2012 and Ma et al., 2012, the circulating miRNA could have different origins and physiological responses. For example there is overexpression in hemolysis of red blood cells and on the other hand there is an overpopulation of some particular cell lines, more related with cancer types. But there are not reported variations related to age; but rather clinical characteristics can increase or decrease the miRNA levels in a sort of cause-effect cycle which deserves a specific analysis.

In the literature there are several studies involving miRNAs using different methods for data analysis (Li et al., 2014; Hoss et al., 2015; Conte et al., 2015). In our case, we used the digital PCR, this system able to analyze twenty thousand wells of amplification reaction and quantify them (Figure 1) (Conte et al., 2015). Other improvement for this analysis is represented by the normalization with a spike-in control, this offer an additional checkpoint to sample processing and reliability of the results as well has been described (Conte et al., 2015; Kobayashi et al., 2018; Tangtanatakul et al., 2018).

Clearly, different values of miRNA levels are expected depending of the selected miR (Figure 2). For instance, we select 4 miRNA markers and all have distinct behavior in different cancer kinds as shown in the figure 4.

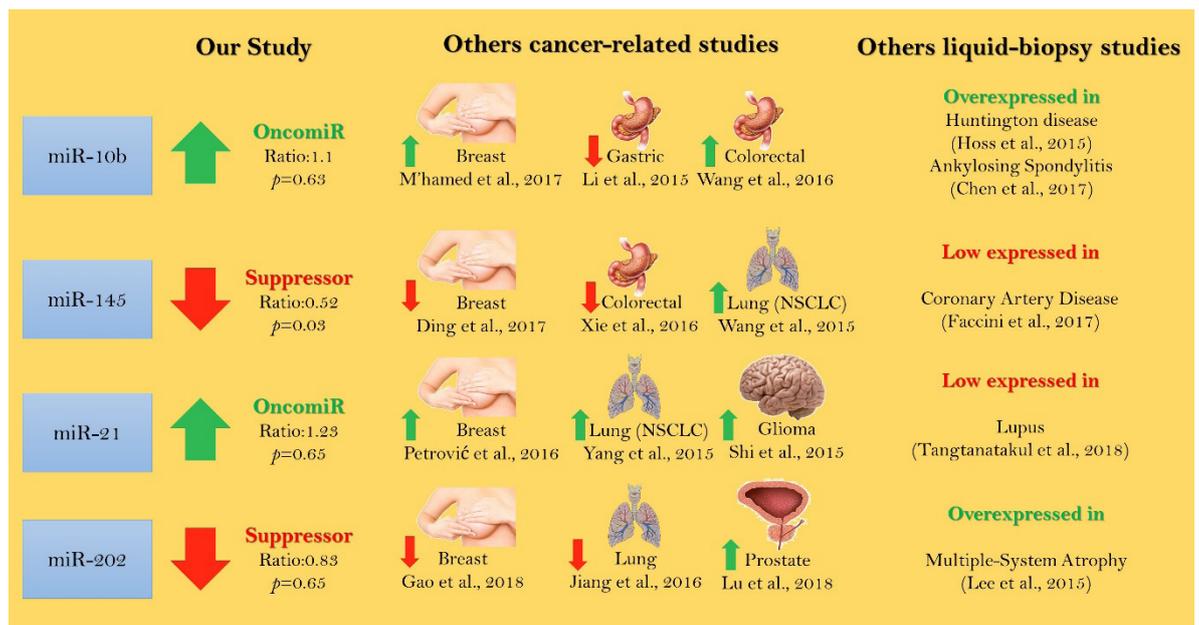


Figure 4. Results and current literature about miRNAs studied. Some miRNAs could be increased or decreased depending the cancer kind or related to other diseases, a relative variability of this results may be considerate as a barrier of this study field.

Currently, the classification of miRNAs as oncomiR or miRNA tumor suppressor is one of the more difficult challenges for cancer research. Some miRNA have been detected in high quantities in some cancer types and very low in other conditions. One example for this is the miR-21, characterized like oncomiR in breast cancer (Petrović 2016), non-small cells lung cancer (Yang et al., 2015) and glioma (Shi et al., 2015), but is decreased in diseases like lupus (Tangtanatakul et al., 2018). This is confirmed

through a fast search of gene targets of miR-21, for this, we can use the miRTarBase (Chou et al., 2017) and GOrilla (Eden et al., 2009) softwares. The miR-21 targets are grouped in 4 major categories: regulation of molecular function, response to chemical, negative regulation of biological process, and positive regulation of cellular process.

Thanks to bioinformatic tools we can support and explain an experimental result; however it could more complex because the miRNA behavior is highly susceptible. Other example, the miR-10b was characterized for a deep controversy about their function (Ahmad et al., 2015; Hagraas et al., 2015; M'hamed et al., 2017). We found it like oncomir for the breast cancer, in a similar condition was reported for colorectal cancer (Wang et al., 2016) and oral cancers (Tian et al., 2015). However, miR-10b could not recognized totally as oncomiR because it was found as tumor suppressor in a gastric cancer study (Li et al., 2015). To add more confusion miR-10b is increased in non-cancer diseases as Huntington's disease (Hoss et al., 2015) or Ankylosing spondylitis (Chen et al., 2017). A bioinformatic prediction of miR-10b shows as targets: positive regulation of biological processes, negative regulation of cell adhesion, animal organ development. Some of them are oncogenic and others act as suppressor, so the miRNA behavior could depend of the independent expression of these targets according tissue and age of the individual.

The other miRNAs analyzed in this study were decreased in breast cancer patients, concordant with the literature (Ding et al., 2017; Gao et al., 2018), but it was the opposite for other cancer types like lung (Wang et al., 2015; Jiang et al., 2016), Colorectal (Xie et al., 2016) or prostate (Lu et al., 2018). Other difference between miR-145 and miR-202 is the capacity to distinguish cancer from other diseases, miR-145 also decreased in coronary artery disorder (Faccini et al., 2017); in contrast with miR-202 who increased their levels in Multiple-system atrophy (Lee et al., 2015).

In consequence, we can view the target categories for each one of these miRNAs; for the miR-145, their categories are associated with: positive regulation of macromolecules and nitrogen compound process, developmental process and positive regulation of cellular metabolic process. Meanwhile, the miR-202 targets are related with: lung development, morphogenesis of a branching structure and epithelial tube. Notably, the miR-202 targets have a nearest relationship with formation and development of lung and airways, explaining why their decreased levels may be a marker to lung cancer (Jiang et al., 2016).

In this manner, we have different conditions to be analyzed before select a miRNA. As we show lines above, there are miRNAs with increased or decreased levels depending their functions; however, there are also some conditions that can change the level of these miRNAs.

According to our results, a neoadjuvant treatment generates an increase of all miRNAs evaluated, on the opposite side HER2 or estrogen receptors generates a decrease of the miRNAS (Figure 3).

At this point, the literature has a slight controversy, some authors indicate that

miRNA levels are down-expressed after neoadjuvant treatment (Preis et al., 2011) and others affirm that this effect depends on the particular miRNA and their basal concentration (Drebber et al., 2011; Gezer et al., 2014). Especially, the study of Drebber et al., 2011 indicates a reversal relationship among miR-21 and miR-145 after adjuvant treatment; miR-21 is the higher initially, but their levels decrease after therapy, in contrast with miR-145. This cannot be verified nor rejected in our results because we just show independent samples without a monitoring before or after treatment.

These characteristics are extended for immunopathological features, where the triple negative breast cancer (TNBC) turned an interesting model to be studied. Some studies (Radojicic et al., 2011; Fang et al., 2017) report that miR-21 are overexpressed in TNBC. In comparison with our results mostly with non TNBC (28 out of 30 negative for estrogen receptors or HER2 amplification), miR-21 decreased as well as other miRNAs. However, the increase of certain miRNA could be an exclusive for TNBC and not for HER2, ER or PR separately. The last hypothesis cannot be tested in our work due to low number of TNBC cases (2 of 30), but this response will open new doors to pursue this research.

Finally, we have high expectancies for future studies in liquid biopsies, studying higher number of samples, improving the technologies of extraction and the selection of targets. For example, miRNA from exosomes or platelets and other tools will increase our knowledge about the molecular biology of cancer and how it can be detected, and also to design appropriate treatments.

5 | ACKNOWLEDGES

The authors want to thank all women participating on the study and the funding agencies: Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad – Innóvate Perú (Grant Number: 138-PNICP-PIAP-2015), Universidad de San Martín de Porres (Project E1001-2016038) and Oncosalud-AUNA.

REFERENCES

- AHMAD, A.; GINNEBAUGH, K. R.; YIN, S. et al. Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down-regulation of HDAC4. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, 2015.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- CHEN, L.; AL-MOSSAWI, M.; HRIDLEY, A et al. miR-10b-5p is a novel Th17 regulator present in Th17 cells from ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 3, p. 620-625, 2016.
- CHOU, C.; SHRESTHA, S.; YANG, C. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, p. D296-D302, 2017.
- CHUANG, J. C.; JONES, P.A. Epigenetics and microRNAs. *Pediatric Research*, v. 5, n. 2, p. 24-29, 2007.

- CONTE, D.; VERRI, C.; BORZI, C. et al. Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, 2015.
- DREBBER, U.; LAY, M.; WEDEMEYER, I. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy. *International Journal of Oncology*, 2011.
- DING, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, J. et al. miR-145 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by directly or indirectly regulating TGF- β 1 expression. *International Journal of Oncology*, v. 50, n. 5, p. 1701-1710, 2017.
- EDEN, E.; NAVON, R.; STEINFELD, I. et al. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 1, 2009.
- FACCINI, J.; RUIDAVETS, J.; CORDELIER, P. et al. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 2017.
- FANG, H.; Xie, J.; Zhang, M. et al. miRNA-21 promotes proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells through targeting PTEN. *American Journal of Translational Research*, v. 9, n. 3, p. 953-961, 2017.
- GAO, S.; CAO, C.; DAI, Q. et al. miR202 acts as a potential tumor suppressor in breast cancer. *Oncology Letters*, 2018.
- GEZER, U.; KESKIN, S.; İĞCI, A. et al. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy. *Oncology Letters*, v. 8, n. 2, p. 845-848, 2014.
- HAGRASS, H. A.; SHARAF, S.; PASHA, H. F. Circulating microRNAs - a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes & Cancer*, p. 281, 2015.
- HOSS, A. G.; LABADORF, A.; LATOURELLE, J. C. et al. miR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement. *BMC Medical Genomics*, v. 8, n. 1, 2015.
- KOBAYASHI, M.; SAWADA, K.; NAKAMURA, K. et al. Exosomal miR-1290 is a potential biomarker of high-grade serous ovarian carcinoma and can discriminate patients from those with malignancies of other histological types. *Journal of Ovarian Research*, v. 11, n. 1, 2018.
- LEE, S.; CHU, K.; JUNG, K. et al. Altered Expression of miR-202 in Cerebellum of Multiple-System Atrophy. *Molecular Neurobiology*, v. 51, n. 1, p. 180-186, 2014.
- LI, Z.; LEI, H.; LUO, M. et al. DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer. *Gastric Cancer*, v. 18, n. 1, p. 43-54, 2014.
- LI, Z.; RANA, T. Therapeutic targeting of miRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 8, p. 622-638, 2014.
- LU, Q.; LI, Y.; LI, Z. et al. miR-202 promoted cell proliferation of prostate cancer by targeting SOX7. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 11, n. 2, p.1324-1330, 2018.
- M'HAMED, I.; PRIVAT, M.; TRIMECHE, M. et al. miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 Expression in Triple Negative Vs Non Triple Negative Breast Cancer: Potential Biomarkers. *Pathology & Oncology Research*, v. 23, n. 4, p. 815-827, 2017.
- MA, R.; JIANG, T.; XIXIONG, K. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 31, n. 1, p. 38, 2012.

- PETROVIĆ, N. miR-21 Might be Involved in Breast Cancer Promotion and Invasion Rather than in Initial Events of Breast Cancer Development. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 20, n. 2, p. 97-110, 2016.
- PREIS, M.; GARDNER, T. B.; GORDON, S. R. et al. MicroRNA-10b Expression Correlates with Response to Neoadjuvant Therapy and Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 17, p. 5812-5821, 2011.
- PRITCHARD, C. C.; KROH, E; WOOD, B. et al. Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prevention Research*, v. 5, n. 3, p. 492-497, 2011.
- RADOJICIC, J.; ZARAVINOS, A.; VREKOUSSIS, T. et al. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle*, v. 10, n. 3, p. 507-517, 2011.
- SHI, R.; WANG, P.; LI, X. et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget*, v. 6, n. 29, 2015.
- TANGTANATAKUL, P.; KLINCHANHOM, S.; SODSAI, P. et al. Down-regulation of let-7a and miR-21 in urine exosomes from lupus nephritis patients during disease flare. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2018.
- TIAN, X.; CHEN, Z.; SHI, S. et al. Clinical Diagnostic Implications of Body Fluid MiRNA in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medicine*, v. 94, n. 37, p. e1324, 2015.
- TURCHINOVICH, A.; WEIZ, L.; BURWINKEL, B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 37, n. 11, p. 460-465, 2012.
- WANG, R. J.; ZHENG, Y. H.; WANG, P. et al. Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* vol. 8,1 765-771. 1 Jan. 2015
- WANG, Y.; LI, Z.; ZHAO, X. et al. miR-10b promotes invasion by targeting HOXD10 in colorectal cancer. *Oncology Letters*, v. 12, n. 1, p. 488-494, 2016.
- XIE, H.; REN, X.; XIN, S. et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 18, 2016.
- YANG, J.; LI, B.; LU, H. et al. Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening. *Tumor Biology*, v. 36, n. 4, p. 3035-3042, 2015.
- YOU, J. S., JONES, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2012.

POLIMORFISMO DO GENE GOLADR.B.2 EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS

Luciana Florêncio Vilaça Lopes

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Zootecnia
Recife – PE

Elizabete Cristina da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Zootecnia
Recife – PE

Elizabete Rodrigues da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Garanhuns
Garanhuns – PE

Severino Benone Paes Barbosa

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Zootecnia
Recife – PE

Ângela Maria Vieira Batista

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Zootecnia
Recife – PE

Kleber Régis Santoro

Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Garanhuns
Garanhuns – PE

RESUMO: A mastite é a doença de maior prevalência em rebanhos leiteiros e considerada a mais importante causa de perdas econômicas, sendo o rápido diagnóstico desta enfermidade um fator determinante para

a redução dos impactos causados. O Antígeno Leucocitário Caprino (GoLA) é uma região do genoma caprino que tem recebido atenção por desempenhar um papel na resposta imunológica e nas características de produção e qualidade do leite. Diante da necessidade de novas informações, este capítulo tem como objetivo levantar o estado da arte da resistência a doenças, destacando o papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade e, particularmente, do gene candidato GoLA-DRB.2 em caprinos.

PALAVRAS-CHAVE: Complexo Principal de Histocompatibilidade; GoLA-DRB.2; Mastite; MHC.

ABSTRACT: Mastitis is the most prevalent disease in dairy herds and considered the most important cause of economic losses, and its rapid diagnosis is a determining factor for the reduction of the impacts caused. Goat Leukocyte Antigen (GoLA) is a region of the goat genome that has received attention because it plays an important role in the immune response, milk production and quality characteristics. In view of the need for new information, this chapter aims to raise the state of the art of disease resistance, highlighting the role of the Major Histocompatibility Complex and particularly the candidate GoLA-DRB.2 gene in goats.

KEYWORDS: Principal Histocompatibility

1 | INTRODUÇÃO

A mastite é a doença endêmica de maior prevalência em rebanhos leiteiros e considerada a mais importante causa de perdas econômicas, tanto para o produtor, quanto para a indústria leiteira. Pode ser definida como sendo uma inflamação da glândula mamária caracterizada por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, e por distúrbios patológicos do tecido glandular (GERMANO & GERMANO, 1995; DIAS, 2007; PEIXOTO et al., 2013).

É importante destacar a importância da mastite para a saúde pública, uma vez que leite e derivados provenientes de animais com esta enfermidade poderão veicular bactérias altamente patogênicas e resíduos de antibióticos (CORRALES et al., 1995; CARDOSO et al., 2000). Os patógenos usualmente relacionados com esta enfermidade em cabras pertencem aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Mycoplasma* (LANGONI et al., 2006; MOTA, 2008; DAL POZZO et al., 2011).

O diagnóstico precoce e a diminuição dos impactos causados pela mastite são uma busca constante de todos os setores envolvidos na cadeia produtiva, não somente pelo aspecto econômico, mas também porque os animais que apresentam maior resistência a essa enfermidade fornecerão produtos de melhor qualidade e maior tempo de prateleira. Com esse intuito, esforços têm sido direcionados para a identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência a doenças, de modo a selecionar concomitantemente animais produtivos e resistentes (MOTA, 2003).

Uma região do genoma caprino que está associada à mastite é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), formado por um grupo de genes que desempenham importante papel no sistema imunológico dos animais e que na espécie caprina foi denominado de região GoLA (*Goat Lymphocyte Antigen*) (BAGHIZADEH et al., 2009; ZHAO et al., 2011). Esta região apresenta um elevado polimorfismo e tem recebido destaque nos estudos sobre a resposta imunológica dos indivíduos aos agentes infecciosos (AMILLS et al., 1996; SCHASCHL et al., 2004; BAGHIZADEH et al., 2009; PARACHA et al., 2015). No entanto, ao contrário do observado nos estudos com vacas, a pesquisa sobre a genética da resistência em cabras leiteiras ainda é incipiente e pouco se sabe sobre a associação entre os alelos do gene GoLA-DRB.2 com a resistência às doenças e características de produção em cabras.

Torna-se indiscutível a necessidade de busca por novas informações para alavancar a atividade pecuária atual. Assim, esta revisão de literatura tem como objetivo levantar o estado da arte da resistência a doenças, destacando o papel do Complexo Principal de Histocompatibilidade e, particularmente, do gene candidato

2 | RESISTÊNCIA GENÉTICAS ÀS DOENÇAS

A resistência genética a doenças pode ser utilizada como uma ferramenta benéfica para a pecuária. Numa escala global, a resistência poderia ser definida como a capacidade de evitar a doença ou promover a rápida recuperação após um processo infeccioso (RUPP & BOICHARD, 2003).

O sistema imunológico é um mecanismo específico que atua limitando a evolução de doenças infecciosas, sendo fundamental para a sobrevivência do animal, desde que atue de forma eficaz (JARDIM et al., 2014). Com o intuito de prevenir o estabelecimento de doenças, através da elaboração de respostas imunológicas, os mecanismos de defesa da glândula mamária são classificados em imunidade natural ou inespecífica e em imunidade específica ou adaptativa (FONSECA & SANTOS, 2000; CARNEIRO et al., 2009). A imunidade natural é predominante no início da infecção, sendo ativada rapidamente por numerosos estímulos e não aumentam de intensidade pela exposição repetida ao mesmo microrganismo (FONSECA & SANTOS, 2000; RAINARD & RIOLLET, 2006). Por outro lado, a imunidade específica é ativada quando a infecção progride e não foi eliminada, sendo um processo de aprendizagem do sistema imune, voltado ao combate de um agente patogênico único (FONSECA & SANTOS, 2000; JARDIM et al., 2014). Conjuntamente, a imunidade natural e a específica participam de um processo eficaz de defesa do hospedeiro, garantindo que os animais apresentem resistência às enfermidades (TIZARD, 2008).

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra as infecções (ABBAS et al., 2008) e, conseqüentemente, apresenta grande influência na susceptibilidade à doença. Com relação à glândula mamária, as células epiteliais que recobrem a superfície interna do órgão desempenham papel crucial nas primeiras interações entre o patógeno e o hospedeiro, contribuindo como barreira efetiva entre o ambiente externo e o interior da glândula (KORHONEN et al., 2000). No entanto, a sobrevivência e a patogenicidade dos microrganismos causadores de infecção são influenciadas pela capacidade destes de resistir aos mecanismos efetores de imunidade (ABBAS et al., 2008).

Os genes envolvidos na resposta imune têm sido indicados como fortes candidatos na determinação de resistência às doenças nos animais domésticos (FONSECA et al., 2009). Com o advento da biotecnologia, a maioria dos estudos têm sido voltados para a busca por associação de genes candidatos com características de defesa do hospedeiro. Informações sobre a imunidade da glândula mamária em bovinos têm avançado significativamente (CARNEIRO et al., 2009), enquanto que trabalhos com esse objetivo em cabras leiteiras ainda são escassos. Desta forma, a investigação dos polimorfismos gênicos associados com a resposta imunitária e resistência à doença

em caprinos vêm ganhando ênfase por permitir a seleção de animais superiores, a sua incorporação nos rebanhos regionais e a obtenção de produtos de melhor qualidade.

A conservação da diversidade genética é hoje universalmente aceita como vital para o desenvolvimento sustentável e gestão dos recursos genéticos animais (AJMONE-MARSAN, 2010; SALLES et al., 2011). Doenças economicamente importantes em animais domésticos representam um problema e a busca pela identificação de genes ou regiões cromossômicas associadas a uma maior resistência do hospedeiro aos patógenos vem sendo apontada como uma necessidade para prevenção de doenças.

2.1 Resistência à mastite

A mastite caracteriza-se por ser uma das enfermidades que acarreta grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite, e até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária, sendo considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo (RIBEIRO et al., 2007).

As perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade são resultantes da redução da quantidade e qualidade do leite e produtos lácteos, morte precoce dos animais, custos com drogas, serviço veterinário e necessidade de aumento da mão-de-obra (CUNHA et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007). Deve-se levar em consideração ainda os riscos à saúde pública pela comercialização de leite com resíduos de antibióticos, além do impacto social, principalmente no que se refere à criação caprina, uma vez que esta é geralmente desenvolvida em pequenas propriedades e gerida por famílias de agricultores, tendo importante contribuição no desenvolvimento socioeconômico do país (MARTIN, 2011; NOGUEIRA et al., 2008).

Mastite é uma doença desafiadora e onerosa para a indústria de laticínios e para os pecuaristas, sendo a seleção de animais mais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos uma alternativa para redução dos problemas causados pela enfermidade (FONSECA et al., 2009). No entanto, verifica-se que a seleção tem sido voltada, ao longo do tempo, ao aumento da quantidade de leite produzido, enquanto características relacionadas à resistência a mastite e à composição do leite têm sido pouco consideradas em programas de melhoramento genético (NASCIMENTO et al., 2006).

A resistência à mastite é uma função complexa e envolve diversos caminhos biológicos, moleculares e celulares, onde numerosos genes candidatos podem estar envolvidos (RUPP & BOICHARD, 2003). Trata-se de uma resposta imunológica que pode ser desencadeada por mais de um fator etiológico e também com resposta em múltiplos componentes (ASHWELL et al., 1997; PEREIRA et al., 2000).

2.2 Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major*

Histocompatibility Complex) é uma região do genoma com um denso agrupamento de genes, apresentando fundamental importância no sistema imunológico e exercendo um importante papel na resposta do hospedeiro a patógenos (MAGALHÃES et al., 2004; KELLEY et al., 2005). Os genes que compõem o MHC são altamente polimórficos e responsáveis por iniciar a resposta imune adaptativa, codificando proteínas e apresentando antígenos derivados de patógenos para as células T (PARACHA et al., 2015). Embora o MHC seja considerado como uma região associada a resistência a doenças (YADAV et al., 2016), a caracterização completa dos genes que a compõem é difícil devido ao seu grande tamanho. Dessa forma, estudos têm sido realizados em fragmentos, de acordo com a importância de diferentes regiões (SHRIVASTAVA et al., 2015).

O MHC caracteriza-se como alvo potencial na identificação de genes candidatos nos estudos da variação molecular, devido a sua influência sobre as características produtivas e às relacionadas à saúde animal, uma vez que apresenta ação direta sobre as funções imunológicas, podendo ainda apresentar efeito indireto sobre as características de produção, onde indivíduos que apresentem melhores condições gerais de saúde podem ser mais produtivos (MACHADO et al., 2005). Segundo estes autores, quando identificado e verificado o efeito de um gene candidato, ele pode ser imediatamente utilizado na seleção assistida por marcadores, com resultados satisfatórios.

A região MHC possui uma estrutura relativamente conservada entre as espécies de mamíferos, estando localizada no cromossomo 20 em ovinos e no cromossomo 23 em bovinos e caprinos (AMILLS et al., 1998; DE GOTARI et al., 1998; BAGHIZADEH et al., 2009; ILHAN et al., 2016). A porção mais polimórfica desta região designa e diferencia a denominação em cada espécie, sendo o MHC bovino denominado de região BoLA – *Bovine Lymphocyte Antigen* (MOSAFER et al., 2011), o de ovino como Ovar (“Ovar” representa *Ovis aries*) (Ilhan et al., 2016) e na espécie caprina denominado de região CLA – *Caprine Lymphocyte Antigen* ou GoLA – *Goat Lymphocyte Antigen* (ZHAO et al., 2011).

Em mamíferos os produtos dos genes localizados nessa região estão divididos em três classes, com base em diferenças nas suas funções: Classe I, Classe II e Classe III. As Classes I e II apresentam maior diversidade polimórfica (BAGHIZADEH et al., 2009, ZHAO et al., 2011; PARACHA et al., 2015), sendo que os produtos dos genes da Classe I são encontrados na superfície das células do organismo, enquanto que os da Classe II são expressos em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos (AHMED & OTHMAN, 2006; ZHAO et al., 2011). A Classe III apresenta vários genes com funções gerais, sendo que apenas alguns estão envolvidos na resposta imunológica (GUILLEMOT et al., 1988).

O MHC em caprinos, ovinos e bovinos apresenta-se de forma semelhante, possuindo dois antígenos da Classe II funcionalmente expressos, o DQ e o DR, sendo estes extensamente caracterizados em ovinos e bovinos, enquanto que em cabras

apenas quatro genes foram identificados: GoLA-DRA, GoLA-DRB, GoLA-DYA e GoLA-DIB (AMILLS et al., 2004; YADAV et al., 2016).

DRB é o gene da Classe II mais polimórfico, sendo os alelos dos genes BoLA-DRB em bovinos amplamente estudados e associados com a ocorrência de doenças e características de produção (SHARIF et al., 1998; TRUJILLO-BRAVO et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2006; VILAÇA et al., 2016). No entanto, ao contrário dos avanços observados nos estudos com vacas leiteiras, pouca informação ainda existe acerca da região MHC e de suas possíveis associações em ovinos e caprinos (CHARON, 2004; PETLANE et al., 2012).

2.2.1 Gene GoLA (*Goat Lymphocyte Antigen*)

Em cabras leiteiras os genes DR da Classe II foram os mais bem caracterizados e o segundo éxon do gene DRB (GoLA-DRB.2) é a região mais estudada devido ao seu elevado polimorfismo, além de ser considerado responsável pelas diferenças na resposta imunológica dos indivíduos aos agentes infecciosos (BAGHIZADEH et al., 2009; PARACHA et al., 2015).

Amills et al. (2004) relataram a existência de 22 alelos diferentes do locus DRB em cabras. No entanto, a pesquisa sobre a genética da resistência às doenças em cabras ainda é insipiente e pouco se sabe sobre a frequência alélica desse gene e as possíveis associações entre os seus alelos (PETLANE et al., 2012; SHRIVASTAVA et al., 2015). Além disso, esse gene tem sido relacionado com uma ampla variedade de características de produção, segurança e qualidade de produtos em animais domésticos (PARACHA et al., 2015).

A Tabela 1 apresenta a evolução das pesquisas voltadas ao estudo do gene GoLA em cabras leiteiras.

REFERÊNCIA	ESPÉCIE	PAÍS	OBJETIVO
Amills et al. (1996)	Caprino	Espanha	Descrição da técnica NESTED-PCR associada ao RFLP para amplificação do segundo éxon da Classe II do MHC caprino em cabras e em outras espécies
Dongxiao & Yuan (2004)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Ahmed & Othman (2006)	Caprino	Egito	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Li et al. (2006)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB3.2 por PCR-RFLP
Baghizadeh et al. (2009)	Caprino	Irã	Identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB3 por PCR-RFLP
Zhao et al. (2011)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene CLA-DRB3 por PCR-RFLP
Singh et al. (2012)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP

Petlane et al. (2012)	Caprino	Indonésia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Yakubu et al. (2013)	Caprino	Nigéria	Diversidade filogenética do gene MHC-DBQ1
Shrivastava et al. (2015)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB1 por PCR-RFLP e sequenciamento
Yadav et al. (2016)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene CLA-DRB3 por PCR-RFLP e associação com resistência aos nematoides gastrointestinais

Tabela 1. Evolução dos estudos voltados à identificação de polimorfismos do gene GoLA em caprinos.

Um dos primeiros estudos sobre o éxon 2 da região GoLA-DRB em caprinos foi realizado por Amills et al. (1995), que desenvolveram uma PCR nested para amplificação de um segmento gênico de 285 pares de base (pb). Os mesmos autores no ano seguinte publicaram um novo artigo mais completo (Amills et al., 1996) com um acréscimo de um novo passo após amplificação, onde foi realizada a digestão do produto amplificado com enzimas de restrição (PCR-RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo esta a metodologia mais amplamente utilizada nos estudos sobre a identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB.2.

O estudo mundial sobre o polimorfismo genético do gene GoLA-DRB.2 em caprinos tem sido focado na identificação das frequências alélicas e genotípicas através da utilização de enzimas de restrição (AMILLS et al., 1996; DONGXIAO & YUAN, 2004; BAGHIZADEH et al., 2009; ZHAO et al., 2011; SINGH et al., 2012; PETLANE et al., 2012; YADAV et al. 2016).

A figura 1 apresenta a eletroforese do gene GoLA-DRB3, utilizada por Yadav et al. (2016) para amplificação do fragmento de 285 pb e após digestão com a enzima de restrição *Pst*I.

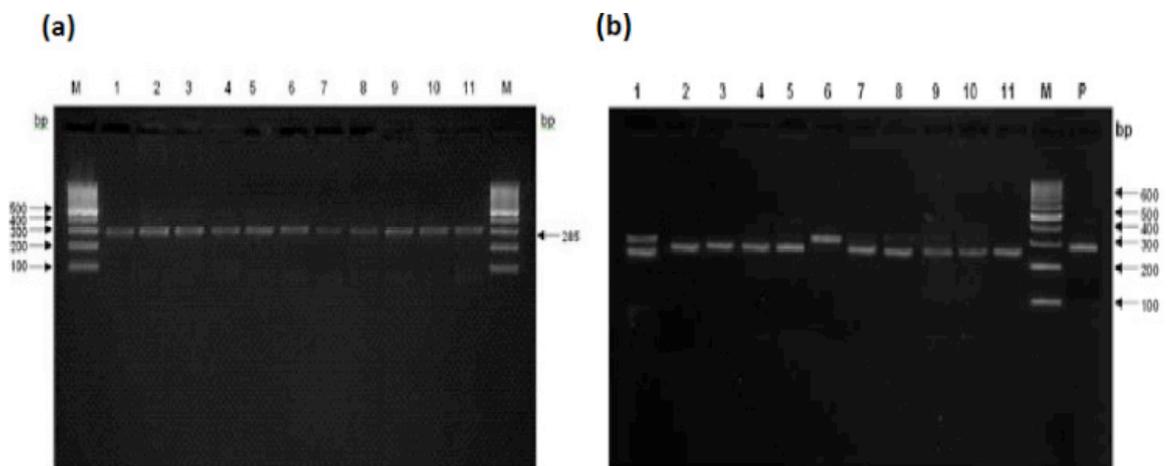


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2%. (a) Produtos de PCR do gene GoLA-DRB3 (285 pb); (b) Mesmas amostras após digestão com a enzima de restrição *Pst*I. Fonte: Yadav et al. (2016).

Em estudo realizado por Petlane et al. (2012) e ao observar os polimorfismos genéticos do GoLA-DRB.2 em caprinos leiteiros, constataram que o locus avaliado foi polimórfico podendo ser explorado com propósito de seleção. Resultados semelhantes foram relatados por Zhao et al. (2011) ao investigarem as variações genéticas do gene GoLA-DRB.2 em dez raças caprinas. Por outro lado, Yadav et al. (2016), buscando associação de variantes polimórficas do gene GoLA-DRB, concluíram que este locus não pode ser utilizado para seleção de cabras para resistência a nematoides no rebanho avaliado.

Uma vez que o gene GoLA-DRB.2 está envolvido com o sistema imunológico, se faz necessária pesquisa que busque a associação deste com os parâmetros de qualidade do leite e maior resistência a mastite (PETLANE et al., 2012). Em bovinos, Nascimento et al. (2006) em estudo do gene DRB em vacas pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da raça Gir, observaram associação desse gene com a produção de proteína, gordura e contagem de células somáticas (CCS). Associação do gene DBR.2 com CCS em bovinos também foi relatada por outros autores (LEDWIGE et al., 2001; RUPP et al., 2007). É importante destacar que no Brasil ainda não existem trabalhos que busquem associar os polimorfismos do gene GoLA-DRB.2 com características de CCS e resistência a mastite em caprinos.

Muito ainda está para ser conhecido sobre a interpretação biológica e relevância fenotípica de características relacionadas à resistência à mastite. Estudos adicionais ainda são necessários para a confirmação das associações dos alelos do GoLA-DRB.2 aos fenótipos e a resistência às doenças, visando utilizar os resultados para a melhoria genética de animais de produção.

Apesar do aumento nos últimos anos de informações sobre a caracterização genética em caprinos, não existem dados relacionados aos polimorfismos genéticos do gene GoLA-DRB.2 nem sobre sua associação com características de interesse econômico em rebanhos caprinos nacionais.

O estudo do polimorfismo genético do gene GoLA-DRB.2 e a identificação de variações alélicas específicas podem contribuir para o desenvolvimento de marcadores genéticos que possam ser utilizados para a identificação e incorporação nos rebanhos de características de resistência a doenças que representam um impacto econômico na produção animal, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de criação de cabras leiteiras (PARACHA et al., 2015; SHRIVASTAVA et al., 2015).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

AJMONE-MARSAN, P. The Globaldiv Consortium: a global view of livestock biodiversity and conservation. **Animal Genetics**, v. 41, p. 1-5, 2010.

- AHMED, S.; OTHMAN, O. E. A PCR-RFLP method for the analysis of Egyptian goat MHC Classe II DRB Gene. **Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 58-61, 2006.
- AMILLS, M.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A. Nested PCR allows the characterization of *TaqI* and *PstI* RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 313-321, 1995.
- AMILLS, M.; SULAS, C.; SANCHEZ, A.; BERTONI, G.; ZANONI, R.; OBEXER-RUFF, G. Structural characterization of the caprine major histocompatibility complex class II DQB1 (Cahi-DQB1) gene. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 843-846, 2004.
- AMILLS, M.; FRANCINO, O.; SÀNCHEZ, A. A PCR-RFLP typing method for the caprine MHC classe II DRB gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 255-260, 1996.
- AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; LEWIN, H. A. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.
- ASHWELL, M. S.; REXROAD Jr., C. E.; MILLER, R. H.; Van RADEN, P. M.; DA, Y. Detection of loci affecting Milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 28, p. 216-222, 1997.
- BAGHIZADEH, A.; BAHAAADDINI, M.; MOHAMADABADI, M. R.; ASKARI, N. Allelic variations in exon 2 of Caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.6, n. 4, p. 454-459, 2009.
- CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n.6, p. 1934-1943, 2009.
- CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p.7-10, 2000.
- CHARON, K. Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. **Animal Sciences papers and reports**, v. 22, n. 1, p. 135-139, 2004.
- CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; MARCO, J. C. Sensibilidade antibiótica *in vitro* de *estafilococos* y corine bacterias aisladas de mastitis subclínicas caprinas. **Medicina Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 16-24, 1995.
- CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. A.; SILVA, K. P. C.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo Instituto de Biologia, São Paulo**, v.73, n.1, p.17-21, 2006.
- DAL POZZO, M.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATO, L.; SOARES, I. S.; ALVES, S. H.; COSTA, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência rural**, v.41, p.667-672, 2011.
- DE GOTARI, M. J.; FREKING, B. A.; CUTHBERTSON, R. P.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; LEVYMASTER, K. A.; DODDS, K. G.; CRAWFORD, A. M.; BEATTIE, C. W. A second generation linkage map of the sheep genome. **Mammalian genome**, v. 9, p. 204-209, 1998.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.
- DONGXIAO, S.; YUAN, Z. Polymorphisms of the Second Exon of MHC-DRB Gene in Chinese Local

Sheep and Goat. **Biochemical Genetics**, v. 42, p. 385-390, 2004.

FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; WELLER, M. M.; DEL CAMBRE, A.; SOUSA, K. R. S.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, J. D.; GUIMARÃES, S. E. F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 776-781, 2009.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 17- 26, 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.

GUILLEMOT, F.; FRÉCHIN, N; BILLAULT, A.; CHAUSSÉA, M.; ZOORO, R.; AUFRAY, C. Isolation of chicken Major Histocompatibility Complex class II (B-L) beta chain sequences: comparison with mammalian beta chains and expression in lymphoid organs. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 4, p. 103-109, 1998.

ILHAN, F.; KESKIN, I.; TOZLUCA, A. Identification of genetic variation in the major histocompatibility complex gene region in Turkish sheep breeds. **South African Society for Animal Science**, v. 46, n.4, 2016.

JARDIM, J. G.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; LIMA, G. R. S. Melhoramento genético visando à resistência a mastite em bovinos leiteiros. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, p. 199-219, 2014.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. **Immunogenetics**, v. 56, p. 683-695, 2005.

KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 75–80, 2000.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LEDWIGE, S. A.; MALLARD, B. A.; GIBSON, J. P.; JANSEN, G.B.; JIANG, Z.H. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. **Animal Genetics**, v. 32, p. 219-221, 2001.

LI, M. H.; LI, K.; KANTANEN, J.; FENG, Z.; FAN, B.; ZHAO, S. H. Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Chinese indigenous goats. **Small Ruminant Research**, v. 66, p. 236-243, 2006.

MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; CAMPOS, A. L.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; GUIMARÃES, S. E. F. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, v. 3, p. 380-389, 2005.

MAGALHÃES, P. S. C.; BÖHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. **Revista Medicina UCPEL**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2004.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E.; RUSSELL, G.; SULIMOVA, G. E. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-6, 2011.

- MOTA, A. F. **Descobrendo genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina.** (Tese de doutorado). 170p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
- MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 57-61, 2008.
- NASCIMENTO, C. S.; MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. B.; GUIMARÃES, M. F. M.; CAMPOS, A. L.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; OLIVEIRA, D. A. A. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 641-647, 2006.
- NOGUEIRA, D. M.; CHAPAVAL, L.; NEVES, A. L. A.; COSTA, M. M. **Passos para obtenção do leite de cabra com qualidade.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 6p. (Comunicado Técnico, 135).
- PARACHA, H.; HUSSAIN, T.; TAHIR, M. Z.; YASMEEN, A.; PERVEZ, M. T.; SHEIKH, A. A.; HAIDER, A.; ALI, R.; KHAN, W. A. Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene, as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review. **Journal of Infection and Molecular Biology**, v. 3, p. 19-23, 2015.
- PEIXOTO, R. M.; PEIXOTO, R. M.; LIDANI, K. C. F.; COSTA, M. M. Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p. 322-325, 2013.
- PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÉS, G. A. Mecanismos de defesa da glândula mamária de bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 3, n. 3, p. 176-190, 2000.
- PETLANE, M.; NOOR, R. R.; MAHESWARI, R. R. A. The Genetic Diversity of TLR4 MHC-DRB Genes in Dairy Goats Using PCR-RFLP Technique. **Media Peternakan**, v. 35, n. 2, p. 91-95, 2012.
- PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A. Enfermidades Infeciosas de Pequenos Ruminantes: Epidemiologia, Impactos Econômicos, Prevenção e Controle: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.1, p. 44 – 66, 2007.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v.37, n.3, p.369- 400, 2006.
- RIBEIRO, M. G.; LARA, G. H. B.; BICUDO, S. D.; SOUZA, A. V. G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A. K.; GERALDO, J. S. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 810-812, 2007.
- RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 671-688, 2003.
- RUPP, R.; HERNÁNDEZ, A.; MALLARD, B. A. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1029-1038, 2007.
- SALLES, P. A.; SANTOS, S. C.; RONDINA, D.; WELLER, M. Genetic variability of six indigenous goat breeds using major histocompatibility complex-associated microsatellite markers. **Journal Veterinary Science**, v. 12, p. 127-132, 2011.
- SCHASCHL, H.; GOODMAN, S. J.; SUCHENTRUNK, F. Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 265–277, 2004.

SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; DEKKERS, J. C. M.; LESLIE, K. E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.185-193, 1998.

SHRIVASTAVA, K.; KUMAR, P.; SAHOO, N. R.; KUMAR, A.; KHAN, M. F.; KUMAR, A.; PRASAD, A.; PATEL, B. H. M.; NASIR, A.; BHUSHAN, B.; SHARMA, D. Genotyping of major histocompatibility complex Class II DRB gene in Rohilkhandi goats by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing. **Veterinary World**, v. 8, n. 10, p. 1183-1188, 2015.

SINGH, P. K.; SINGH, M. K.; SAXENA, V. K.; SINGH, A. V.; SOHAL, J. S. Genetic analysis of MHC Class II DRB gene in an endangered Jamunapari breed of goat. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 220-223, 2012.

TIZARD, I.R. 2008. **Veterinary Immunology an Introduction**, Eighth Ed. Saunders, New York.

TRUJILLO-BRAVO, E.; RODRÍGUEZ-Y, P. A.; CERON-MUÑOZ, M. Caracterización y análisis de asociación de BoLA-DRB3 con El conteo de células somáticas, em La raza Holstein en Antioquia, Colombia. **Actual Biol**, v. 27, n.83, p.171-178, 2005.

VILAÇA, L. F.; DINIZ, W. J. S.; MELO, T. F.; OLIVEIRA, J. C. V.; GUIDO, S. I.; BRITO, C. E. V. L.; COSTA, N. A.; SANTORO, K. R. Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no estado de Pernambuco. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 65, p. 249, p. 7-11. 2016.

YADAV, A. K.; TOMAR, S. S.; KUMAR, A.; THAKUR, M. S. Association of caprine lymphocyte antigen-DRB3 gene with gastrointestinal nematode resistance in Sirohi and Barbari breeds of goat. **Indian Journal of Animal Research**, v. 50, n. 6, p. 958-963, 2016.

YAKUBU, A.; SALAKO, A. E.; DONATO, M.; TAKEET, M. I.; PETERS, S. O.; ADEFENWA, M. A.; OKPEKU, M.; WHETO, M.; AGAVIEZOR, B. O.; SANNI, T. M.; AJAYI, O. O.; ONASANYA, G. O.; EKUNDAYO, O. J.; ILORI, B. M.; AMUSAN, S. A.; IMUMORIN, I. G. Genetic diversity in Exon 2 of the Major Histocompatibility Complex Class II DRB3 Locus in Nigerian Goat. **Biochemical Genetics**, v. 51, p. 954-966, 2013.

ZHAO, Y.; XU, H.; SHI, L.; ZHANG, J. Polymorphisms in Exon 2 of MHC Class II DRB3 Gene of 10 Domestic Goats in Southwest China. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 6, p. 752-756, 2011.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PEIXES DA APA DO INHAMUM, LESTE MARANHENSE, BRASIL

Renato Corrêia Lima;

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

Marcelo Silva de Almeida;

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

Maria Claudene Barros;

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

Elmary da Costa Fraga;

Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), Departamento de Química e Biologia, Caxias-MA.

RESUMO: O DNA *barcode* vem sendo utilizado como método auxiliar na identificação de espécies. Além do gene COI, o gene mitocondrial rRNA16S, também tem se revelado como um bom marcador na diferenciação de peixes. Neste trabalho, objetivou-se realizar a identificação e caracterização genética das espécies de peixes da Área de Proteção Ambiental (APA) Municipal do Inhamum, a partir de sequências dos genes COI e rRNA 16S. Para a coleta foram utilizados vários apetrechos de pesca e os espécimes coletados foram identificados com auxílio de literatura específica e confirmados por especialista. O DNA dos espécimes foi extraído

usando o kit da Promega e os fragmentos dos genes mitocondriais COI e rRNA 16S foram amplificados através da técnica de PCR. Os produtos das PCRs foram purificados e sequenciados em sequenciador automático de DNA. Foram coletados 440 espécimes dos quais obteve-se 72 sequências do gene COI e 74 do gene rRNA 16S identificadas em seis ordens, 10 famílias e 15 espécies. Dentre essas espécies, *Megalechis thoracata* caracteriza um novo registro para a bacia do rio Itapecuru. A árvore filogenética para o gene COI evidenciou 16 clados coespecíficos fortemente suportados com 100% de *bootstrap*. A reconstrução filogenética gerada a partir do gene rRNA 16S, evidenciou a ocorrência de 15 clados. A maioria dos clados correspondem a uma única espécie, entretanto, as sequências de *Gymnotus carapo* e *Hemigrammus guyanensis* formaram cada uma, dois clados fortemente agrupados com 99% de *bootstrap*. Portanto, esse trabalho representa, além da caracterização genética dos peixes dessa APA, uma extensão a extensão de distribuição de *M. thoracata*, pois agora sabe-se de sua ocorrência na bacia do rio Itapecuru.

PALAVRAS – CHAVE: DNA mitocondrial, COI, rRNA 16S, *Megalechis thoracata*

ABSTRACT: DNA barcode has been used as an auxiliary method to identify species. In

addition to the COI gene, the mitochondrial gene rRNA16S, has also been shown to be a good marker in fish differentiation. The objective of this work was to identify and characterize the fish species of the Inhamum Municipal Environmental Protection Area (APA), based on sequences of the COI and 16S rRNA genes. For the collection, several fishing tools were used and the specimens collected were identified with the aid of specific literature and confirmed by specialists. The DNA of the specimens was extracted using the Promega kit and the fragments of the mitochondrial genes COI and 16S rRNA were amplified by the PCR technique. PCR products were purified and sequenced in an automated DNA sequencer. A total of 440 specimens were collected from which 72 sequences of the COI gene and 74 of the 16S rRNA gene were identified in six orders, 10 families and 15 species. Among these species, *Megalechis thoracata* characterizes a new record for the Itapecuru river basin. The phylogenetic tree for the COI gene evidenced 16 heavily supported co-specific clades with 100% bootstrap. The phylogenetic reconstruction generated from the 16S rRNA gene, evidenced the occurrence of 15 clades. Most clades correspond to a single species, however, the sequences of *G. carapo* and *Hemigrammus guyanensis* formed each, two clades strongly grouped with 99% bootstrap. Therefore, this work represents, in addition to the genetic characterization of the fish in this APA, an extension of the distribution of *M. thoracata*, since it is now known to occur in the Itapecuru river basin.

KEYWORDS: Mitochondrial DNA, COI, rRNA 16S, *Megalechis thoracata*

1 | INTRODUÇÃO

A identificação correta de espécies constitui uma etapa primordial para o êxito de qualquer programa de manejo e conservação quando se leva em conta que as espécies constituem a unidade básica de comparação na biologia, desde estudos de anatomia, até aqueles de comportamento, desenvolvimento, ecologia, evolução, genética, biologia molecular, paleontologia, fisiologia, sistemática, entre outros (DE QUEIROZ, 2005).

No intuito de realizar identificação de espécies, genes do DNA mitocondrial têm sido constantemente utilizados como ferramentas auxiliares à taxonomia clássica na resolução de problemas de identificação. Dentre esses genes, o que obteve maior destaque na identificação de espécies animais na última década foi o Citocromo Oxidase subunidade I (COI ou Cox1), cujo um curto fragmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' fora eleito como o código de barras de DNA (DNA *barcode*) (HEBERT et al., 2003a; 2003b). Este se baseia na suposição que a variação interespecífica é maior que a variação intraespecífica (“DNA *barcoding gap*”) (MEYER e PAULAY, 2005).

Paralelamente, em meio a grande exploração do DNA mitocondrial em estudos taxonômicos de peixes, o gene mitocondrial rRNA 16S também se revelou um bom marcador na diferenciação para esse grupo, como estudos com o objetivo de elucidar relações filogenéticas entre Mugiliformes (FRAGA et al., 2007).

Os peixes de água doce da região neotropical estão compreendidos em mais de 5.600 espécies catalogadas, estima-se, no entanto, que o total exceda 7.000 (CARVALHO e ALBERT, 2011). Uma parte substancial da biodiversidade neotropical permanece desconhecida, isso é considerado um problema para a conservação biológica, pois entende-se que seja um impedimento taxonômico. Propostas para amenizar esse problema inclui abordagens como a taxonomia integrativa (DAYRAT, 2005) e “turbo-taxonômico” (RIEDEL et al., 2013) nas quais a identificação baseada no DNA atrela-se à descrição morfológica e imagens de alta resolução (PUGEDO et al., 2016).

O presente estudo contribui na identificação da ictiofauna da bacia do rio Itapecuru, tendo em vista que foca em riachos tributários dessa bacia e, sobretudo pela adição de um novo registro, *Megalechis thoracata* (VALENCIENNES, 1840). Dessa forma, agrega conhecimento ao trabalho de Nascimento et al. (2016), os quais identificaram a fauna de peixe do curso principal desse rio via DNA *barcode*.

Portanto, o reconhecimento preciso das espécies de peixes da APA do Inhamum é de importância impar para a preservação de sua ictiofauna, pois, produz informações que poderão futuramente servir como um subsídio indispensável. E para isso objetivou-se identificar e caracterizar geneticamente, por meio de sequências de COI (DNA *barcoding*) e rRNA 16S, a ictiofauna da APA do Inhamum e gerar dados que contribuam para futuros programas de manejo e preservação.

2 | AMOSTRAGEM

A APA do Inhamum está localizada à margem esquerda da BR-316, no sentido de Caxias/MA à São Luís/MA, aproximadamente 2 km do perímetro urbano de Caxias/MA, entre as coordenadas 04° 53' 30" de latitude S e 43° 24' 53" de longitude W (FERNANDES et al., 2007) (Figura 1).

A área do Inhamum faz parte do patrimônio municipal que, pela Lei nº 1.464/2001, foi modificada em Área de Proteção Ambiental detentora de cerca de 3500 hectares. Essa região apresenta dois tipos de vegetações: uma vegetação graminosa em área plana, característica de cerradões ou chapadas e outra vegetação de árvores e arbustos e uma depressão com árvores de grande porte e buritizais agregado ao curso de água, designando o que se chama brejo (ALBUQUERQUE, 2012).

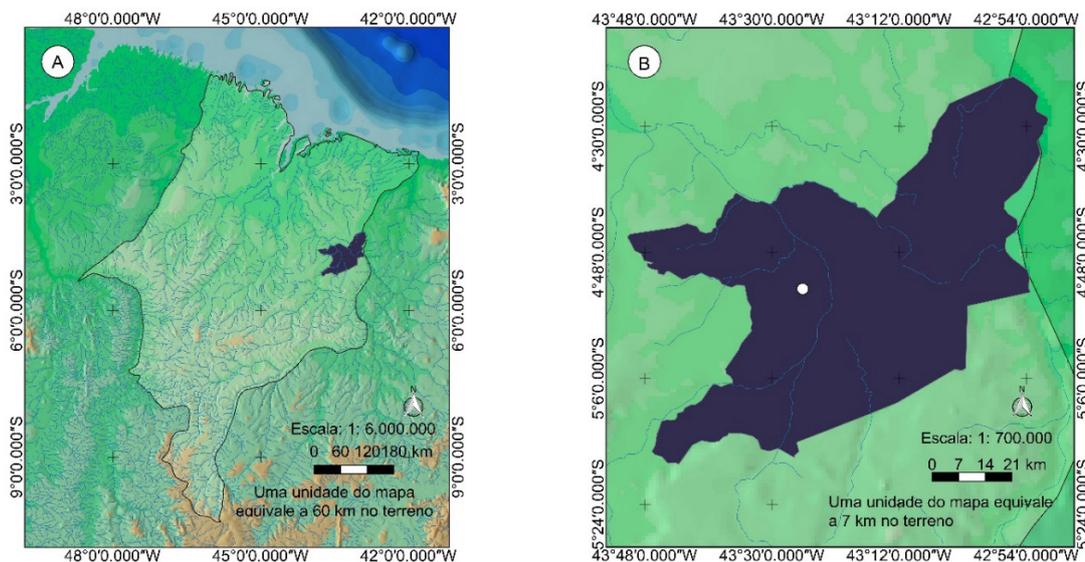


Figura 1. Mapa do Maranhão evidenciando em azul escuro o município de Caxias/MA (A). Mapa de Caxias evidenciando com um ponto branco a localização aproximada da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (B).

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o programa Quantum Gis 2.8.7.

As coletas foram realizadas de 2011 a 2017 na APA do Inhamum. Para tanto, foram utilizados apetrechos de pesca como puçás, peneira redondas de arame e redes de armação de cano PVC (*Policloreto de polivinila*) (OYAKAWA et al., 2006). Foram escolhidos principalmente três igarapés da APA do Inhamum chamados de Igarapé Soledade, Igarapé Inhamum e Igarapé Sumidouro do Padre (Tabela 1 e Figura 2). Esses três igarapés foram escolhidos por apresentarem condições mais adequadas de captura de peixes, além de nos fornecerem uma boa representatividade da ictiofauna da APA do Inhamum.

Ponto de amostragem	Coordenadas	Figura
Igarapé Soledade (Ponte Inhamum)	4°53'27.1" S, 43°24'54.1" W	3A
Igarapé Soledade	4°53'26.9" S, 43°25'10.0" W	3B
Igarapé Inhamum	4°53'47.0" S, 43°25'23.0" W	3C
Igarapé Sumidouro do Padre	4°53'28.6" S, 43°25'37.8" W	3D

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos coleta de peixes na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum relacionadas às suas respectivas figuras.

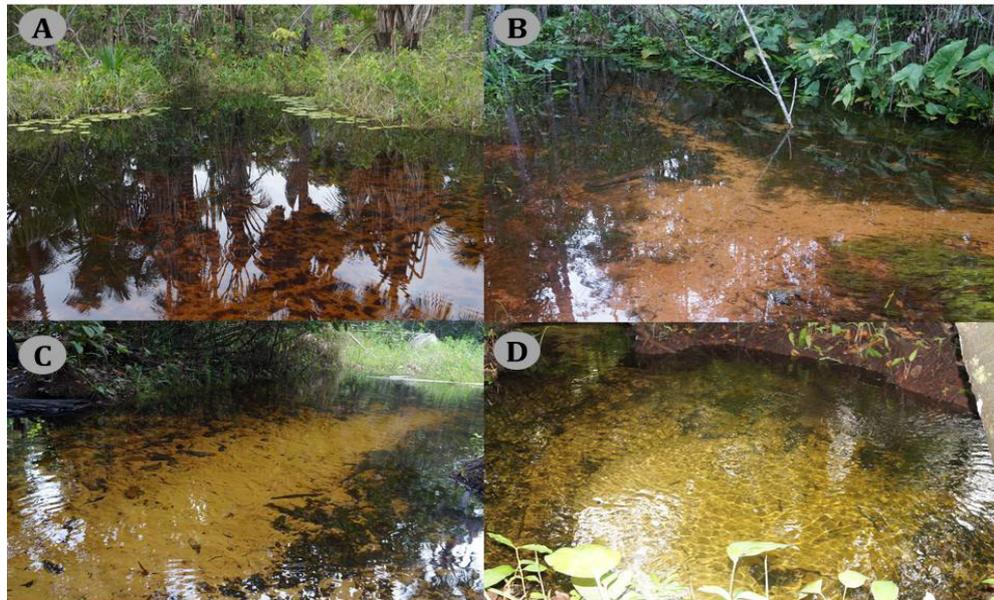


Figura 2. Igarapés onde foram coletados os peixes na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum em Caxias, Maranhão: (A/B) Igarapé Soledade, (C) Igarapé Inhamum, (D) Igarapé Sumidouro do Padre.

As amostras foram levadas para o laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) no Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão (CESC/UEMA), onde foi realizada a identificação taxonômica com o auxílio de literatura específica (BRITSKI et al., 1999; SOARES, 2005; OYAKAWA et al., 2006) e, posteriormente, foi confirmada por especialista. A conservação dos exemplares foi feita em via úmida, colocando-os em formalina por 48 horas e depois transferindo-os para álcool à 70%. Pelo menos cinco espécimes de cada um dos táxons identificados e seus testemunhos foram depositados na coleção Zoológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo/MZUSP e Museu de Zoologia da Universidade de Londrina/MUZEL (*vouchers* determinados) e o restante dos espécimes foram depositados no GENBIMOL. As coletas das amostras biológicas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA) através da licença de número 02012.004159/2006.

2.1 Análise Genética

O DNA total foi extraído pelo manuseio do kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e amplificação das regiões genômicas mitocondriais (COI e rRNA 16S), a partir do DNA total, foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual foi utilizada a combinação de *primers* e condições específicas em Ward et al. (2005) para o gene COI e em Palumbi et al. (2002) para o gene rRNA 16S. As amostras de PCR foram submetidas à visualização em gel de agarose a 1%, corado com Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain, através de luz ultravioleta (UV), para observação da amplificação

dos fragmentos dos genes analisados. Os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSAP-IT conforme recomendações do fabricante e submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger et al. (1977).

As reações de sequenciamento foram realizadas nos termocicladores da Life Technologies, applied biosystems, 2720 Thermal Cycler e Veriti 96 Well Thermal Cycler com o seguinte programa: uma desnaturação inicial de 96°C por 60 segundos, 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos. Após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas para retirada do excesso de reagentes não incorporados. As sequências, tanto do gene COI como do gene rRNA 16S, foram alinhadas pelo método Clustal W do programa Bioedit (HALL, 1999). O programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016) foi utilizado para gerar as árvores filogenéticas e matrizes de distâncias genéticas por meio do método de agrupamento de vizinhos (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) e o modelo de distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) (FELSENSTEIN, 1985).

A identificação molecular (gene COI) foi realizada por comparação das sequências do presente estudo e sequências depositadas na plataforma bioinformática BOLD Systems v4 (BOLD) (<http://v4.boldsystems.org/>) (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007). Plataforma na qual foram depositas as sequências do gene COI obtidas no presente trabalho sob os códigos RENA001-16 até RENA070-16.

3 | RESULTADOS

3.2 Amostras obtidas

Foram coletados 440 espécimes dos quais obteve-se 72 sequências do gene COI e 74 do gene rRNA 16S identificadas em seis ordens, 10 famílias e 15 espécies (Tabela 2). Dentre essas espécies, *M. thoracata* caracteriza um novo registro para a bacia do rio Itapecuru.

Ordem	Família	Voucher	Espécie	COI	16S
Characiformes	Erythrinidae	MZUEL 10444	<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	8	5
	Characidae	MZUSP 110829	<i>Bryconops</i> sp.	6	7
		MZUEL 10449	<i>Hemigrammus guyanensis</i> Géry, 1959	3	20
	Lebiasinidae	MZUEL 10441	<i>Nannostomus beckfordi</i> Günther, 1872	7	7
Siluriformes	Heptapteridae	MZUSP 110827	<i>Pimelodella</i> sp.	7	5
	Callichthyidae	MZUEL 10448	<i>Callichthys callichthys</i> (Linnaeus, 1758)	1	1
		MZUEL 15410	<i>Megalechis thoracata</i> (Valenciennes, 1840)	1	-
Gymnotiformes	Gymnotidae	MZUEL 10443	<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus, 1758	7	7

	Sternopygidae	MZUSP 104554	<i>Sternopygus macrurus</i> (Bloch & Schneider, 1801)	5	2
Perciformes	Cichlidae	MZUSP 110828	<i>Apistogramma</i> sp.	8	6
		MZUEL 10445	<i>Aequidens tetramerus</i> (Heckel, 1840)	3	2
		MZUSP 110826	<i>Crenicichla menezesi</i> Ploeg, 1991	6	6
		MZUEL 15411	<i>Cichlasoma orientale</i> Kullander, 1983	3	-
Cyprinodontiformes	Rivulidae	MZUEL 10442	<i>Rivulus</i> sp.	6	5
Synbranchiformes	Synbranchiidae	MZUSP 10825	<i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch, 1795	1	1
6	10		15	72	74

Tabela 2. Número de sequências dos genes COI e rRNA 16S de cada táxon geradas a partir das amostras de peixes da APA do Inhamum, e os números dos vouchers determinados

3.3 Novo registro de *M. thoracata* (Siluriformes, Callichthyidae) para a bacia do rio Itapecuru

Megalechis é distinto de outros gêneros de Callichthyinae por reunir características exclusivas: ossos infraorbitais expostos (vs. coberto por camada espessa de pele), nadadeira caudal truncada ou convexa (vs. bifurcada ou côncava) e presença de dois raios não ramificados na nadadeira dorsal (vs. um) (REIS et al., 2005).

O gênero *Megalechis* atualmente inclui duas espécies válidas, *Megalechis picta* (Müller e Troschel, 1849), das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Essequibo, e também de rios costeiros do nordeste brasileiro, e *Megalechis thoracata* (Valenciennes, 1840), da bacia dos rios Amazonas e Orinoco, além de drenagens costeiras das Guianas e nordeste do Brasil (REIS et al., 2005). *M. thoracata* pode ser distinguido de *M. picta* pelo menor espinho na nadadeira dorsal, geralmente maior número de raios na nadadeira anal (seis, raramente cinco vs. cinco, raramente quatro) e principalmente pelo padrão de coloração da nadadeira (REIS et al., 2005).

M. thoracata apresenta uma banda esbranquiçada na base da nadadeira caudal e a parte restante é escura ou com manchas pretas, enquanto que *M. picta* apresenta a base da nadadeira caudal enegrecida, com notáveis barras escuras nas bordas medias e distais também enegrecidas, as regiões entre as bandas enegrecidas são visivelmente amarelas claras (TENCATT et al., 2013).

O diagnóstico morfológico do espécime de *M. thoracata* coletado no presente estudo (Figura 3) foi confirmado por dados moleculares ao se depositar sequência do gene COI de *M. thoracata* na plataforma BOLD (RENA002-16) a qual mostrou similaridade de 99.06% com outras sequências de *M. thoracata*. Esse percentual de similaridade está dentro do limite coespecífico (HEBERT et al., 2003a). Por meio da análise de um único espécime coletado na APA do Inhamum, em um igarapé tributário da bacia do Rio Itapecuru, estendeu-se a distribuição dessa espécie para a bacia do



Figura 3. *Megalechis thoracata* (MZUEL 15410, barra de escala = 2 cm).

3.4 Análises genéticas de sequências do gene COI

O valor médio de distância genética intraespecífica encontrada no presente trabalho é de 0,55%, com a grande maioria das espécies apresentando valores inferiores a 1% (84,6%) (Tabela 3). Não foi possível obter valores de distância dentro de gênero no presente trabalho, porque nenhum desses gêneros possui mais que uma espécie. O valor médio de divergência dentro das famílias foi de 16,7% (Tabela 3).

A matriz de médias de divergências genéticas obtidas a partir de sequências do gene COI mostrou que as espécies mais proximamente relacionadas foram *Cichlasoma orientale* e *Aequidens tetramerus*, pertencentes à mesma família (Cichlidae) as quais tiveram 13,1% de divergência genética. Por outro lado, as espécies mais distantemente relacionadas foram *Crenicichla menezesi* e *Callichthys callichthys*, estas tiveram 33,7% de divergência genética (Tabela 4). Essa tabela mostra também que *Gymnotus carapo* apresentou maior índice de divergência genética intraespecífica com 3,6%.

Nível	N	Taxón	Min Dist(%)	Média Dist(%)	Max Dist(%)
Dentro de espécie	64	12	0,00	0,55	3,6
Dentro de família	29	3	11,7	16,7	19,9

Tabela 3. Médias de distâncias genéticas K2P coespecíficas e dentro das famílias dos peixes da APA do Inhamum a partir de sequências do gene COI.

Min Dist = distância mínima; Média Dist = distância média; Max Dist = distância máxima.

Táxons	Médias de divergência genética (%)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 - <i>Callichthys callichthys</i>	n/c														

2 - <i>Me-galechis thoracata</i>	18,7	n/c													
3 - <i>Ster-nopygus macrurus</i>	24,8	26,3	0,2												
4 - <i>Ci-chlasoma orientale</i>	23,0	24,7	24,4	0,0											
5 - <i>Apis-togramma</i> sp.	27,3	27,5	27,9	27,1	0,2										
6 - <i>Ae-quadens tetramerus</i>	23,4	24,3	23,0	13,1	24,6	0,2									
7 - <i>Pimelo-della</i> sp.	26,7	24,9	23,0	24,7	26,0	25,4	0,1								
8 - <i>Hemi-grammus guyanensis</i>	24,0	23,6	24,0	25,5	27,5	23,9	23,8	0,0							
9 - <i>Hoplías malabari-cus</i>	24,1	27,5	23,3	23,6	29,8	25,5	22,0	21,1	0,1						
10 - <i>Gym-notus carapo</i>	24,1	24,0	21,3	22,4	25,7	25,4	24,9	22,4	24,2	3,6					
11 - <i>Bryco-nops</i> sp.	23,7	26,0	26,4	22,8	24,8	22,0	25,6	23,3	23,5	22,5	0,1				
12 - <i>Nan-nostomus beckfordi</i>	26,8	24,1	25,9	25,2	29,6	24,3	23,7	25,9	26,2	25,2	23,6	0,9			
13 - <i>Cre-nicichla menezesi</i>	33,7	33,1	32,4	27,3	29,4	28,3	29,1	32,4	30,7	30,9	28,5	31,7	0,0		
14 - <i>Synbran-chus mar-moratus</i>	27,9	26,6	31,2	28,2	29,3	27,0	26,7	27,7	27,7	26,8	27,0	29,7	29,4	n/c	
15 - <i>Rivu-lus</i> sp.	26,9	26,6	26,3	27,2	29,1	24,9	26,0	27,2	27,6	26,5	26,9	24,6	32,3	28,4	0,2

Tabela 4. Matriz de médias de divergência genética K2P interespecíficas e intraespecíficas de peixes da APA do Inhamum partir de sequências do gene COI. N/C = não calculado.

A árvore filogenética (Figura 4) evidenciou 16 clados coespecíficos fortemente suportados com 100% de *bootstrap*. O número de clados excede o número de espécies identificadas, isso porque *G. carapo* está formando dois clados coespecíficos.

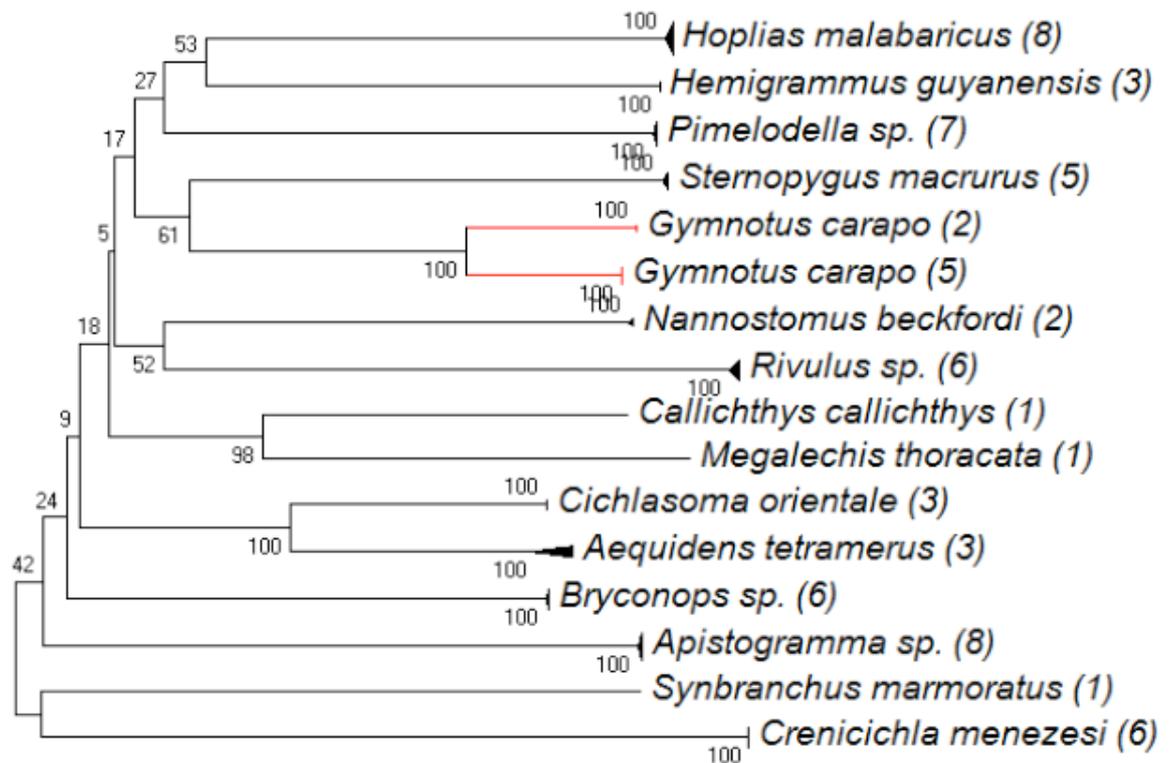


Figura 4. Árvore filogenética resumida utilizando sequências do gene COI, algoritmo K2P e método de agrupamento de vizinho (NJ) dos peixes da APA do Inhamum. Os números entre parênteses representam o número de sequências obtidas de cada espécie. Em vermelho, está destacado um problema de identificação.

3.5 Identificação Molecular Realizada na Plataforma BOLD

As porcentagens de similaridade consideradas neste item foram aquelas oriundas de comparações entre sequências de trabalhos de outros autores com as sequências obtidas no presente trabalho, pois, logicamente, as comparações entre somente as sequências da APA do Inhamum sempre resultam em similaridades de 100%. Além disso, apenas as similaridades iguais ou acima de 97% foram expostas, porque indicam tratar-se de uma unidade genética. As espécies que não são mencionadas não obtiveram similaridades iguais ou superiores a 97% em relação as sequencias depositadas na plataforma BOLD.

Diante das comparações entre as sequências do presente trabalho e as sequências depositadas na plataforma BOLD por outros autores, observou-se que a identificação molecular corrobora com a identificação morfológica para as espécies *Hoplias malabaricus*, *Gymnotus carapo*, *Aequidens tetramerus*, *Callichthys callichthys* e *M. thoracata* com similaridades genéticas de 97,64%, 99,37%, 98,41%, 99,50% e 99,06%, respectivamente (Tabela 5). O DNA *barcode* indicou os epítetos específicos de *Bryconops affinis* e *Pimelodella vittata* com percentuais de similaridade genética de 99,21 e 99,37, respectivamente. Nas análises morfológicas, essas duas espécies tinham sido identificadas somente até gênero. As amostras de *G. carapo* demonstraram similaridade acima de 97% com *Gymnotus chaviro*, *Gymnotus pantanal* e *G. carapo* (Tabela 5).

Morfológica	Molecular	Similaridade (%)	RN
<i>H. malabaricus</i>	<i>H. malabaricus</i>	97,64	*
<i>G. carapo</i>	<i>G. carapo/ G. chaviro/ G. pantanal</i>	99,37/97,83/ 97,8	**
<i>A. tetramerus</i>	<i>A. tetramerus</i>	98,41	BOLD: AAD8366
<i>C. callichthys</i>	<i>C. callichthys</i>	99,50	BOLD: ACR8860
<i>M. thoracata</i>	<i>M. thoracata</i>	99,06	*
<i>Bryconops</i> sp	<i>B. affinis</i>	99,21	BOLD: AAF6579
<i>Pimelodella</i> sp	<i>P. vittata</i>	99,37	BOLD: AAD0882

Tabela 5. Identificação molecular das amostras de peixes da APA do Inhamum realizada através de comparações das sequências do presente estudo com sequências disponíveis na plataforma BOLD systems para o gene COI, e seus respectivos registros numéricos (RN) index barcode para o BOLD.

Obs. * Tem status de saída antecipada e por isso não possui registro numérico no BOLD. ** *G. carapo*: BOLD:AAB6212, *G. pantanal*: BOLD:AAE3544. *G. chaviro* não possui registro numérico na plataforma.

3.6 Análises genéticas de sequências do gene rRNA 16S

O valor médio de distância genética intraespecífica das sequências de rRNA 16S foi de 0,54% e o valor médio de distância genética dentro das famílias foi de 9,0%. Ademais, foram encontrados altos índices distância genética dentro do gênero *Gymnotus* (1,5%) e *Hemigrammus* (3,8%) (Tabela 6 e Tabela 7). A matriz de médias de distâncias genéticas intra e interespecífica (Tabela 7) mostrou que as espécies mais proximamente relacionadas foram *Sternopygus macrurus* e *G. carapo* com 9,8% de divergência. Em contrapartida, as espécies mais distantemente relacionadas foram *Synbranchus marmoratus* e *C. callichthys*, com 26,2% de divergência genética.

Nível	N	Taxón	Min Dist(%)	Média Dist(%)	Max Dist(%)
Dentro de espécie	72	11	0,00	0,54	3,8
Dentro de Família	42	2	8,5	9,0	9,4

Tabela 6. Médias de distâncias genéticas K2P mostrando a distribuição das médias coespecíficas e dentro das famílias na APA do Inhamum utilizando o gene rRNA 16S.

Taxóns	Médias de divergência genética (%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 - <i>Pimelodella</i> sp.	0,0												
2 - <i>C. callichthys</i>	13,5	n/c											
3 - <i>G. carapo</i>	13,4	15,0	1,5										

4 - <i>S. macrurus</i>	10,0	16,2	9,8	0,0									
5 - <i>Apistogramma</i> sp.	19,6	21,4	19,0	17,3	0,1								
6 - <i>A. tetramerus</i>	17,0	20,4	17,4	14,5	11,2	0,0							
7 - <i>Bryconops</i> sp.	13,0	17,2	10,9	11,7	19,9	16,7	0,1						
8 - <i>H. malabaricus</i>	12,6	16,0	13,8	11,9	18,9	17,5	10,7	0,0					
9 - <i>C. menezesi</i>	19,4	20,7	17,3	16,3	13,6	11,9	17,3	19,0	0,3				
10 - <i>H. guyanensis</i>	17,4	19,3	16,8	13,6	19,3	18,5	14,4	11,4	19,5	3,8			
11 - <i>N. beckfordi</i>	15,8	18,9	16,3	13,3	17,3	16,5	15,1	14,1	17,6	15,4	0,0		
12 - <i>S. marmoratus</i>	25,0	26,2	23,1	21,5	19,7	22,1	22,8	23,2	22,6	21,3	24,9	n/c	
13 - <i>Rivulus</i> sp.	23,1	24,4	21,6	22,7	18,2	18,9	22,1	21,9	22,7	21,6	24,3	20,4	0,2

Tabela 7. Matriz de médias de divergência genética K2P interespecíficas de peixes da APA do Inhamum a partir de sequências do gene rRNA 16S.

A reconstrução filogenética gerada a partir do método de agrupamento de vizinhos e o algoritmo K2P utilizando sequências do gene rRNA 16S, evidenciou a ocorrência de 15 clados. A maioria dos clados correspondem a uma única espécie, entretanto, as sequências de *G. carapo* e *Hemigrammus guyanensis* formaram cada uma, dois clados fortemente agrupados com 99% de *bootstrap*. (Figura 5).

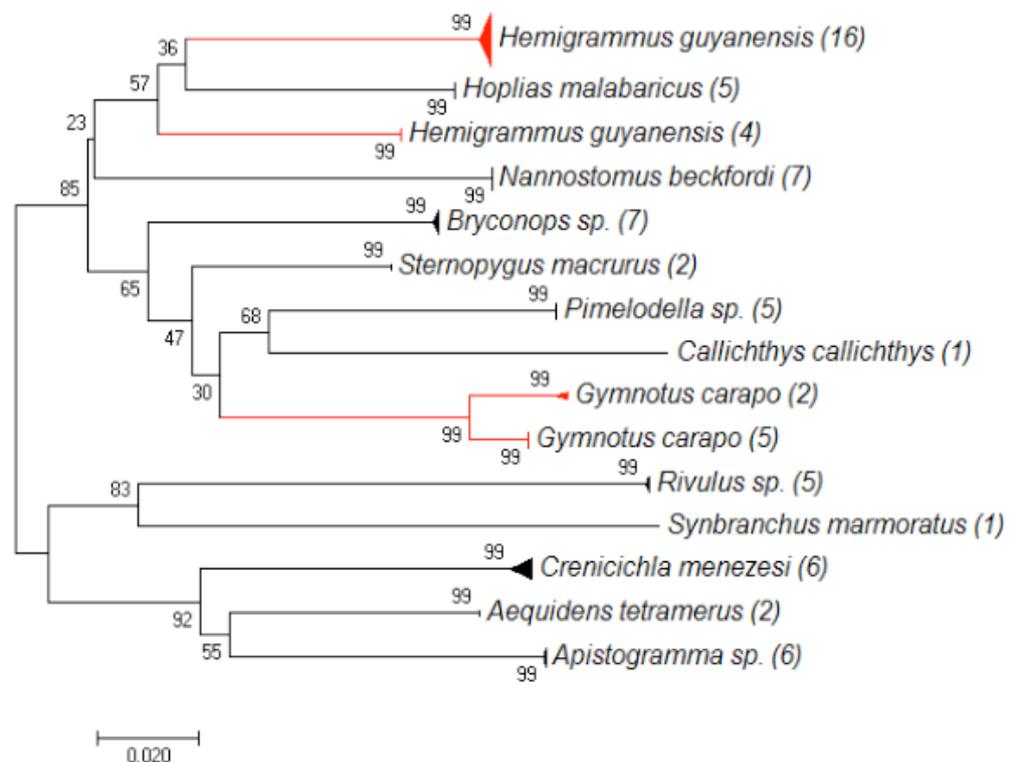


Figura 5. Árvore filogenética resumida utilizando sequências do gene rRNA 16S, algoritmo K2P e método de agrupamento de vizinho (NJ) dos peixes da APA do Inhamum. Os números entre parênteses representam o número de sequência para cada espécie. Em vermelho estão destacados contrapontos de identificação.

4 | DISCUSSÃO

4.1 Novo registro de *Megalechis thoracata* para a bacia do rio Itapecuru

Em coletas na APA do Inhamum, Fraga et al. (2012) e Lima et al. (2015) não haviam registrado a ocorrência de *M. thoracata*, assim como em estudos que objetivaram a identificação de toda a bacia do rio Itapecuru (BARROS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016). Somente em setembro de 2015 um espécime de *M. thoracata* espécie foi capturado.

Entre os estudos realizados nas bacias hidrográficas do Nordeste: Carvalho et al. (2011b) (bacia do rio São Francisco), Ramos et al. (2014) (bacia do rio Parnaíba) e Matavelli et al. (2015) (bacias dos rios Munim e Parnaíba), *M. thoracata* só foi registrado por Soares (2005), na bacia do rio Mearim. Portanto, esse resultado representa uma extensão do conhecimento da distribuição da espécie, pois agora sabe-se de sua ocorrência na bacia do rio Itapecuru. Tencatt et al. (2013; 2015) cogitaram que a introdução de *M. picta* na bacia do alto rio Paraná ocorreu provavelmente devido ao seu uso como uma isca viva. Essa hipótese também pode ser considerada para a introdução de *M. thoracata* na bacia do rio Itapecuru, levando em conta que a diferenciação entre *M. picta* e *M. thoracata* é dificultosa por não especialistas, então podem ser facilmente misturadas e vendidas como uma única espécie por vendedores de iscas vivas ou em lojas de aquário.

Ainda é precipitado afirmar que *M. thoracata* é capaz de se fixar na bacia ou causar impactos sobre as espécies nativas do rio Itapecuru. Percebe-se, todavia, que é preciso preocupar-se com a introdução e/ou transportação de espécies entre bacias, de forma intencional ou não, que se torna cada vez mais corriqueiro e que quase sempre tem efeito nocivo sobre as espécies nativas. Recomenda-se, dessa forma, que atitudes como essa sejam suprimidas de forma rigorosa.

4.2 Análises genéticas de sequências do gene COI

Muitos trabalhos já foram realizados visando identificar, via DNA *barcode*, peixes de grandes bacias hidrográficas brasileiras (CARVALHO et al., 2011b; PEREIRA et al., 2013; DÍAZ et al., 2016). Esses trabalhos comumente mostram baixos valores de divergência intraespecífica, raramente ultrapassam o valor de 1,5%. No presente trabalho não foi diferente, o valor médio de distância intraespecífica foi de 0,55% (Tabela 3).

Carvalho et al. (2011b) ao estudar peixes de água doce provenientes da bacia do rio São Francisco, encontrou valor médio de divergência genética intraespecífico de 0,50%. Pereira et al. (2013) revelou percentual médio intraespecífico de 1,30 (mas esse valor decresce para 0,3 quando considerado cada subclado como uma unidade genética independente) na megadiversa fauna de peixes Neotropicais. Em consonância a esses baixos valores médios, Díaz et al. (2016), ao analisar os peixes do baixo rio Paraná, encontraram 0,53% de divergência intraespecífica.

O valor médio de divergência dentro das famílias encontrado no presente trabalho foi de 16,7% (Tabela 3), valor que está de acordo com outros valores observados na literatura. Nos trabalhos de Hubert et al. (2008), Carvalho et al. (2011b), Pereira et al. (2013) e Díaz et al. (2016) verificou-se valores percentuais médios dentro das famílias de 15,38, 21,01 e 20,1 e 19,61, respectivamente.

Foi detectado elevado valor de distância genética (3,6%) em *G. carapo* (Tabela 4), essa porcentagem supera o limite de divergência intraespecífica que delimita espécie de 3% estabelecido por Hebert et al. (2003a). Com base nisso, é possível tratar-se de duas espécies dentro do gênero *Gymnotus*, e não apenas de uma como propôs a identificação morfológica. Neste cenário, evidencia-se o potencial do gene COI em revelar a diversidade escondida. Similarmente, Benzaquem et al. (2015) mostrou diversidade críptica em peixes ornamentais da Amazônia brasileira.

Carvalho et al. (2011b) encontraram elevada divergência intraespecífica em amostras de *G. carapo* (5%) provenientes da bacia do rio São Francisco. Esses autores indicaram que essa elevada divergência pode estar relacionada a história filogeográfica ou estrutura geográfica, como é comum em peixes de água doce (WARD et al., 1994). *G. carapo* (holótipo do Suriname) foi descrito por Linneaus na primeira metade do século XVIII (ALBERT e CRAMPTON, 2003). Atualmente é definido como *G. carapo sensu stricto* e é conhecido como um complexo de espécies de morfologia similar ou espécie críptica, com uma larga área de distribuição (ALBERT e CRAMPTON, 2003). Estudos citogenéticos de amostras identificadas como *G. carapo* mostraram diferentes cariótipos: $2n = 54$ e $2n = 52$ do Sul do Brasil, $2n = 48$ em Amazonas, $2n = 42$ no Pará (MILHOMEM et al., 2007).

Outro estudo sobre o cariótipo de indivíduos morfologicamente indistinguíveis de cinco populações de *G. carapo sensu stricto* da Amazônia oriental do Brasil revelou dois citótipos, $2n = 42$ (30 M/SM + 12 ST/A) e $2n = 40$ (34M/SM + 6 ST/A). Os autores concluíram que as diferenças entre essas duas espécies crípticas se devem a inversões pericêntricas e uma fusão tandem. (MILHOMEM et al., 2008). Nagamachi et al. (2010) usaram mapeamento genômico comparativo através do FACS (Fluorescent Activated Chromosome Sortin), metodologia que permitiu verificar a alta reorganização genômica encontrada entre as duas populações citotípicas de *G. carapo sensu stricto* estudadas e confirmar a hipótese que elas são realmente diferentes espécies.

O fato de a morfologia externa, os dados merísticos e a pigmentação deles não permitirem a distinção de espécies (MILHOMEM et al., 2008), sugere que a especiação delas foi um evento recente no qual a reorganização cromossômica teve o papel principal (NAGAMACHI et al., 2010). Somado a isso, as elevadas divergências genéticas encontradas no presente trabalho e em Carvalho et al. (2011b) corroboram com essa informação. As amostras do presente estudo de *G. carapo* demonstraram similaridade acima de 97% com *Gymnotus chaviro*, *Gymnotus pantanal* e com *G. carapo* (Tabela 5) quando realizada a identificação molecular na plataforma BOLD. Isso novamente aponta para identificação errônea de espécimes, ou indica a presença

de espécie negligenciada no gênero *Gymnotus*.

4.3 Análises genéticas de sequências do gene rRNA 16S

A média de distância genética coespecífica do gene rRNA 16S (0,54%) equiparou-se ao valor de distância intraespecíficas revelado nas sequências do gene COI (0,55%), contrariando assim, Palumbi et al. (2002) quando este afirma que as sequências do gene rRNA 16S são mais conservadas, com taxa de mutações menores do que a média do genoma mitocondrial. Provavelmente, isso ocorreu porque *H. guyanensis* obteve elevada divergência genética (3,8%).

A média de distância genética K2P intrafamiliar foi mais baixa para o gene rRNA 16S (9%) em relação à média correspondente do gene COI (16,7%). Esse dado corrobora com Kochzius et al. (2010), trabalho no qual as distâncias genéticas verificadas em cada nível taxonômico analisado foram menos elevadas que suas correlatas no gene COI. Os valores de distância genética K2P coespecífico e intrafamiliar do presente estudo (0,54% e 9%, respectivamente) (Tabela 6) foram inferiores em relação aos seus equivalentes encontrados em peixes comerciais da África do Sul (CAWTHORN et al., 2012) (0.03% e 5.10%). Isso possivelmente ocorreu em reflexo ao melhor conhecimento taxonômico de espécies comercialmente importantes, de médio e grande porte, o que minimiza os problemas de identificação (CARVALHO et al., 2011b).

Diante dos resultados é possível concluir, portanto, que o DNA barcode demonstrou sua potencialidade em identificar espécie, pois esteve de acordo com a identificação morfológica na grande maioria das espécies (93,3%) e ainda apontou para problema de identificação em *G. carapo*, espécie na qual provavelmente existe negligência de identificação. Faz-se necessário, então, aprofundamento nos estudos genéticos e taxonômicos de *G. carapo* ocorrentes na APA do Inhamum, através de uma revisão taxonômica dos exemplares por um especialista no grupo.

O gene rRNA 16S indicou a presença de mais de uma espécie em *Hemigrammus*, de tal modo que se faz necessária a análise dessa indicação por meio de mais sequências do gene COI de amostras desse gênero.

Identificou-se a espécie *M. thoracata* na área de estudo, dessa forma sua distribuição foi estendida para a bacia do rio Itapecuru, o que contribui para o conhecimento da amplitude de ocorrência dessa espécie. Por meio da utilização do gene COI, foi possível indicar os epítetos específicos de *B. affinis* e *P. vittata*, essas espécies anteriormente haviam sido identificadas apenas em nível genérico.

REFERÊNCIAS

ALBERT, J. S. e CRAMPTON, W. G. R. **Seven new species of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes) with a redescription of *G. carapo* (Linnaeus)**. *Zootaxa*, 28: 1-54. 2003.

ALBUQUERQUE, A. B. **Riacho Ponte e Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum,**

- Caxias/MA.** in: BARROS, M. C. (org.). **Biodiversidade na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum.** São Luís: UEMA, cap. 6, p. 107 – 116. 2012.
- BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. e BIRINDELLI, J. L. O. **Fishes from the Itapecuru River basin, State of Maranhão, northeast Brazil Brazilian.** *Journal of Biology* 71(2): 375-380. 2011.
- BENZAQUEM, D. C.; OLIVEIRA, C.; DA SILVA BATISTA, J.; ZUANON, J.; PORTO, J. I. R. **DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon.** *PLOS ONE*, 10, e 0112217. 2015.
- BRITSKI, H. A.; KEVE, Z. S. S.; BALZAC, S. L. **Peixes do Pantanal. Manual de Identificação.** Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP, 184 p. 1999.
- CARVALHO, T. P. e ALBERT, J. S. The Amazon-Paraguay Divide. in: J.S. Albert and R.E. Reis (org.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes.** Los Angeles: University of California Press, pp. 193-202. 2011.
- CARVALHO, D. C. de; LEAL, C. G.; POMPEU, P. S.; MELO JUNIOR, J. V.; OLIVEIRA, D. A. A. **Aplicações da técnica de identificação genética - DNA Barcode - nos peixes da bacia do rio São Francisco.** *Sociedade Brasileira de Ictiologia*, São Paulo, v. 104, ISSN 1808-1436, set. 2011a.
- CARVALHO, D. C. de; OLIVEIRA, D. A. A.; POMPEU, P. S.; LEAL, C. G.; OLIVEIRA, C.; HANNER R. **Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin.** *Mitochondrial DNA*, v. 22, p. 80–86, out. 2011b.
- CAWTHORN, D.; STEINMAN, H. A.; WITTHUHN, R. C. **Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in South Africa.** *Gene*, v. 491, p. 40-48. 2012.
- DAYRAT, B. **Towards integrative taxonomy.** *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 85, p. 407–415. 2005.
- DE QUEIROZ, K. **Ernst Mayr and the modern concept of species.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102 Suplemento 1 p. 6600, 2005.
- DÍAZ, J.; VILLANOVA, G. V.; BRANCOLINI, F.; DEL PAZO, F.; POSNER, V. M.; GRIMBERG, A.; ARRANZ, S. E. **First DNA Barcode Reference Library for the Identification of South American Freshwater Fish from the Lower Paraná River.** *PLOS ONE*, v. 11. 2016.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution*, v. 39, p. 783-791. 1985.
- FERNANDES, R. S.; CONCEIÇÃO, G. M.; BRITO, E. S.; PAULA-ZÁRATE, E. L. **Diversidade Florística de Pteridófitas da Área de Preservação Ambiental do Inhamum, Caxias, Maranhão, Brasil.** *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 411-413, 2007.
- FRAGA, E.; SCHNEIDER, H.; NIRCHIO, M.; SANTA-BRIGIDA, E.; RODRIGUES-FILHO, L. F.; SAMPAIO, I. **Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes.** *Journal of Applied Ichthyology*, v. 23, p. 598-604. 2007.
- FRAGA, E. C.; BIRINDELLI, J. L. O.; AZEVEDO, C. A. S.; BARROS, M. C. **A Ictiofauna da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias/MA.** In: BARROS, M. C. (Org). **Biodiversidade na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum.** São Luís: UEMA, cap. 6, p. 107 – 116. 2012.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** In: *NUCLEIC ACIDS SYMPOSIUM*, 41., 1999, Raleigh. Oxford University

Press, p. 95-98. 1999.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; de WAARD, J. R. **Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences**, Guelph, v. 270, p. 313-322, jan. 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S. e de WARD, J. R. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society**. v. 270, p. 96- 99. 2003b.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L. **Identifying canadian freshwater fishes trough DNA barcodes. PLOS ONE**, v. 3, e. 2490, jun. 2008.

KOCHZIUS, M.; SEIDEL, C.; ANTONIOU, A.; BOTLA, S. K.; CAMPO, D.; et al. **Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. PLoS ONE**, v. 5, n. 9. 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G. e TAMURA, K. MEGA7: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution**, 33: 1870-1874. 2016.

LIMA, R. C.; NASCIMENTO, M. H. S.; FRAGA, E.C. e BARROS, M.C. **Identificação Molecular via DNA barcoding dos Peixes da APA do Inhamum, Caxias/MA**; in: CARVALHO NETA, R. F. (org.). *Áreas De Proteção Ambiental No Maranhão: situação atual e estratégias de Manejo*. São Luís: UEMA, p. 301-313. 2015.

LIMA, R. C.; NASCIMENTO, M. H. S.; BIRINDELLI, J. L. O.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. **Extension of the distribution of *Megalechis thoracata* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Callichthyidae) to the basin of the Itapecuru River, northeastern Brazil. Check List**, 13 (4): 327–330. <https://doi.org/10.15560/13.4.327>. 2017.

MALABARBA, L. R.; NETO, P. C. BERTACO. V. A.; CARVALHO, T. P.; SANTOS, J. F.; ARTIOLI, L.G. S. **Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí**, editora. Via Sapiens, Porto Alegre, 2013.

MATAVELLI, R.; CAMPOS, A. M.; VALE, J.; PIORSKI, N. M. e POMPEU, P. S. **Ichthyofauna sampled with tadpoles in northeastern Maranhão State, Brazil. Check List**, v. 11, n. 1, p. 1550. 2015.

MEYER, C. P. e PAULAY G. **DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. PLoS Biology**, v. 3. 2005.

MILHOMEM, S. S. R.; PIECZARKA, J. C.; CRAMPTON, W. G. R.; DE SOUZA, A. C. P.; CARVALHO JR, J. R. e NAGAMACHI, C. Y. **Differences in karyotype between two sympatric species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the eastern amazon of Brazil. Zootaxa**, 1397: 55–62. 2007.

MILHOMEM, S. S. R.; PIECZARKA, J. C.; CRAMPTON, W. G. R.; SILVA, D. S.; DE SOUZA, A. C. P.; CARVALHO JR, J. R. e NAGAMACHI C. Y.: **Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). BMC Genetics**, 9:75. 2008.

NASCIMENTO, M. H. S; ALMEIDA, M. S.; VIEIRA, M. N. S; LIMEIRA FILHO, D.; LIMA, R. C.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. **A barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. Genetic and Molecular Research**, v: 15. 2016.

NAGAMACHI, C. Y. PIECZARKA, J. C.; MILHOMEM, S. S. R.; O'BRIEN, P. C. M.; DE SOUZA, A. C. P. e FERGUSON-SMITH, M. A. **Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. BMC**

Genetics, 11:28. 2010.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. **Peixes de riacho da Mata Atlântica na Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo: Editora Neotropical, 2006.

PALUMBI, S.; MARTIN, A.; RAMANO, S.; MACMILLAN, W. O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. **The simple fool's guide to PCR ver. 2.0**. University of Hawaii Honolulu. 2002.

PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G.; HANNER, R.; FORESTI, F. OLIVEIRA, C. **Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?** **Bio med center Genetics**, v. 14, n. 20, 1471 – 2156, 2013.

PUGEDO, M. L.; DE ANDRADE NETO, F. R.; PESSALI, T. C.; BIRINDELLI, J. L. O. e CARVALHO D. C.; **Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin**. **Springer**, v. 144, p. 341–349, 2016.

RAMOS, T. P. A.; RAMOS, R. T. C. e RAMOS, S. A. Q. A. **Ichthyofauna of the Parnaíba river basin, Northeastern Brazil**. **Biota Neotropica** 14(1): 1-8. 2014.

RATNASINGHAM, S. e HEBERT, P. D. N. **BOLD: The Barcode of Life Data System** (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, vol. 7, p. 355 – 364. 2007.

REIS, R. E. 2003. **Family Callichthyidae (armored catfishes)**; pp. 291-309. In R.E. REIS, S.O.; KULLANDER, e FERRARIS, JR., C.J. (org.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs. 2003.

REIS, R. E.; LE BAIL, P.-Y.; MOL, J. H. A. e ARMBRUSTER, J. W. **New arrangement in the synonym of *Megalechis* Reis, 1997 (Siluriformes: Callichthyidae)**. **Copeia** v. 3, p. 678-682. 2005.

RIEDEL, A.; SAGATA, K.; SUHARDJONO, Y. R.; TÄNZLER, R., BALKE, M. **Integrative taxonomy on the fast track-towards more sustainability in biodiversity research**. **Frontiers in Zoology**, v.10, n. 15. 2013.

SAITOU, N. e NEI, M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**. **Molecular Biology and Evolution**, Houston, v. 4, p. 406-425. 1987.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors**. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Cambridge, v. 74, N. 12, p. 5463-5467, dec. 1977.

SOARES, E. C. **Peixes do Mearim**. São Luiz: Editora Instituto Geia, 2005.

TENCATT, L. F. C.; DA GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **First record of *Megalechis picta* (Müller and Troschel, 1849) (Siluriformes: Callichthyidae) in the upper Rio Paraná basin, Brazil**. **Check List**, v. 9, n. 5, p. 1081–1083. 2013.

TENCATT, L.F.; SEVERO-NETO e FROEHLICH, O. **First record of the camboatá *Megalechis picta* (Müller & Troschel, 1849) (Siluriformes: Callichthyidae) for the Pantanal, Brazil**. **Biota Neotropica**, v. 15, n. 1. 2015.

WARD, R. D.; WOODWARK, M.; SKIBINSKI, D. O. F. **A comparison of genetic diversity levels en marine, freshwater, and anadromous fishes**. **Journal Fish Biology**, v. 44, p. 213 – 232. 1994.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. **DNA barcoding Australia's fish species**. **Philosophical Transactions Royal Society B**, v. 360, p. 1847-1857, set. 2005.

MIRNAS: UMA CLASSE DE PEQUENOS RNAS REGULATÓRIOS

Juliana Santana de Curcio

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Kleber Santiago Freitas e Silva

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Replicon-Pontifícia Universidade Católica de Goiás-PUC-GO, Goiânia, Goiás.

Lívia do Carmo Silva

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Amanda Alves de Oliveira

Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública-IPTSP- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Thaynara Gonzaga Santos

Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública-IPTSP- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

Lucas Webá Soares

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

RESUMO: Pequenos RNAs denominados miRNAs regulam a expressão gênica por interferirem na tradução do RNA mensageiro por clivar essas moléculas ou bloquearem a

tradução do RNA mensageiro. Estas moléculas são descritas em vários organismos desde plantas até algas. A biogênese destas moléculas envolve proteínas dicers e argonautas e um complexo de indução do silenciamento mediado por pequenos RNAs. Em fungos essas moléculas parecem estar relacionadas a adaptação ao crescimento em diferentes condições de temperatura, ou ainda regularem genes específicos de seus estágios morfológicos. MiRNAs também são associados a progressão da doença, visto que em muitos casos eles podem favorecer o desenvolvimento da infecção por manipular as repostas do hospedeiro suprimindo genes da resposta imune.

PALAVRAS-CHAVE: miRNAs, fungos, dicers, argonautas, doença.

ABSTRACT: Small RNAs called miRNAs regulate gene expression by interfering with the translation of messenger RNA by cleaving these molecules or by blocking the translation of messenger RNA. These molecules are described in various organisms from this plants to algae. The biogenesis of these molecules involves dicers and argonauts proteins and a silencing induction complex mediated by small RNAs. In fungi, these molecules appear to be related to adaptation to growth under different temperature conditions, or to regulate genes

specific to their morphological stages. MiRNAs are also associated with disease progression, since in many cases they may favor the development of the infection by manipulating host responses by suppressing genes of the immune response.

KEYWORDS: miRNAs, fungi, dicers, argonauts, disease.

1 | INTRODUÇÃO

1.1 Características dos Micrornas e Biogênese

Pequenos RNAs de eucariotos com possível função regulatória são classificados em três tipos: microRNAs (microRNAs), RNAs de interferência (siRNA) e RNAs associados às proteínas Piwi (piRNAs). São moléculas sequência-específicas, sendo o mecanismo de silenciamento efetuado em resposta a um RNA dupla fita (dsRNA). A diferença entre as três classes de pequenos RNAs é devida ao seu mecanismo de biogênese, processamento e função dentro da célula. Pequenos RNAs já foram descritos em animais, plantas e fungos como moléculas efetoras do silenciamento gênico. (GROSSHANS; FILIPOWICZ, 2008).

MicroRNAs são derivados de RNAs de classe I, a qual inclui todos os RNAs que sofrem as primeiras etapas da expressão gênica, ou seja, a transcrição, frequentemente incluindo o processamento, mas nunca são traduzidos na maquinaria de síntese proteica nos ribossomos, podendo ser transcritos pela RNA polimerase I, II ou III. Possuem em torno de 20-25 nucleotídeos e atuam como silenciadores pós-transcricionais regulando vários processos biológicos por interferirem na tradução do RNA mensageiro (mRNA) (GROBHANS; FILIPOWICZ, 2008). Descrito pela primeira vez por (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993) creating a temporal decrease in LIN-14 protein starting in the first larval stage (L1, o microRNA *lin-4* demonstrou ser essencial nas primeiras etapas do desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans*, regulando a tradução do gene *lin-14* por um mecanismo antisenso entre o microRNA e a região não traduzida (3' UTR) do mRNA alvo. Em 2000 Reinhart e colaboradores, descreveram um segundo microRNA presente em *C. elegans* denominado *let-7*, sendo este pequeno RNA capaz de promover a regulação da expressão de outros genes incluindo *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* e *daf-12*.

Posteriormente, microRNAs foram identificados em organismos invertebrados como *Drosophila melanogaster* em órgãos de vertebrados. Embora, alguns microRNAs foram comuns a ambos animais e insetos, o perfil de expressão destes pequenos RNAs foi diretamente relacionado ao tipo de tecido e ao estágio de desenvolvimento analisado. Dessa maneira, foi demonstrado que microRNAs podem possuir um papel regulatório não apenas no tempo de desenvolvimento larval como visto em *C. elegans* mas também apresentar funções regulatórias em tecidos específicos (LAGOS-QUINTANA et al., 2001).

Genes de microRNAs são frequentemente localizados em regiões intergênicas

e transcritos similarmente a genes codificantes de proteínas (NOZAWA; MIURA; NEI, 2012) em alguns casos genes codificantes de microRNAs são localizados em regiões de íntrons ou éxons (YANG et al., 2013). A regulação da biogênese de microRNAs envolve fatores transcricionais e fatores acessórios. Trabalhos revelam que a abundância de um microRNA é controlada através da transcrição, estabilidade e processamento dos pri-microRNAs (XIE; ZHANG; YU, 2015). Proteínas acessórias DDX5 e DDX17, juntamente com Drosha e DGCR8 são envolvidas na formação do complexo microprocessador nuclear de pri-microRNAs. Essas proteínas acessórias atuam de duas formas: Primeiro estabilizando este complexo para o correto processamento do pri-microRNAs e também servem como mediadores de sinal que conectam a atividade do microprocessador nuclear com outras vias de sinalização sob várias circunstâncias, como em casos de dano ao DNA ou durante a formação de microRNAs com função de supressão tumoral, aumentando a atividade do complexo com intuito de inibir o crescimento do tumor. Além disto, a estabilidade e o processamento dos pri-microRNAs no núcleo são regulados pela edição desta molécula. Proteínas ADARs 1 e 2 editam moléculas de RNA trocando a adenosina pela inosina, esta mudança na estrutura do pri-microRNA, suprime a atividade de Drosha e reduz a estabilidade da molécula de pri-microRNA, favorecendo o reconhecimento e degradação desta molécula por nucleases. A concentração das proteínas envolvidas no processamento de microRNAs como argonautas também variam entre os diferentes tecidos e células, por exemplo em células tronco embrionários, a proteína argonauta 2 sofre ubiquitinação e degradação no proteossoma, tal evento bloqueia o silenciamento gênico pós-transcricional mediado por microRNAs (revisado por SHEN; HUNG, 2015).

A via de biogênese de microRNAs em plantas (VOINNET, 2009) e mamíferos é bem elucidada. Em plantas como *Arabidopsis thaliana* a produção de um microRNA envolve duas etapas de clivagem do microRNA primário e do pre-microRNA, no núcleo, pela enzima Dicer-1 (REINHART et al., 2002), posteriormente a esta etapa a enzima HEN1 adiciona um grupo metil à extremidade 3' do duplex microRNA/microRNA*, estabilizando a molécula. O duplex é então transportado do núcleo para o citoplasma através de HASTY (HST), uma proteína homologa à exportina 5 (PARK et al., 2005). Em *A. thaliana* a principal proteína efetora de silenciamento mediado por microRNAs é argonauta 1, a qual possui atividade de endonuclease e é capaz de suprimir a expressão de genes alvos por clivagem do RNA ou inibição da tradução (BAUMBERGER; BAULCOMBE, 2005). Estudos mostram que o crescimento normal da planta e suas funções fisiológicas requerem um controle rigoroso dos níveis e da atividade dos microRNAs (XIE; ZHANG; YU, 2015).

Sabe-se que em mamíferos microRNAs são originados de um precursor de RNA codificado no genoma (GROBHANS; FILIPOWICZ, 2008). A transcrição destas regiões pela RNA polimerase II (Pol II) (VOINNET, 2009) produz longas fitas simples de RNAs que, por complementariedade de bases, formam RNA dupla fita (dsRNA) com estrutura semelhante a grampos, chamados de microRNAs primários

(pri-microRNAs) (GROBHANS; FILIPOWICZ, 2008). No núcleo, a enzima do tipo ribonuclease III Drosha e seu cofator DGCR8 são responsáveis por processar os microRNAs (primários) e produzir estruturas em dupla fita, também em forma de grampo (hairpin) com aproximadamente 70 nucleotídeos denominados precursores de microRNAs (pre-microRNAs) (HE; HANNON, 2004). Tais moléculas são transportadas para o citoplasma através da exportina 5 (YI et al., 2005), onde são processados pela enzima Dicer. A clivagem por esta enzima gera os microRNAs maduros que variam entre 21 a 25 nucleotídeos, constituídos por moléculas de RNA dupla fita microRNA/microRNA* (HE; HANNON, 2004). Um das fitas do duplex, o microRNA*, é degradada, enquanto a outra é associada ao complexo de indução do silenciamento (RISC) (HE; HANNON, 2004). Membros da família das proteínas argonautas constituem o núcleo central do RISC e são associadas aos microRNAs antes e após o reconhecimento do mRNA alvo (BARTEL; LEE; FEINBAUM, 2004). Em muitos casos, os microRNAs ligam-se à região 3' UTR do mRNA por um mecanismo de complementaridade de bases imperfeita, causando repressão da tradução do mRNA, sem degradação de sua fita (HE; HANNON, 2004).

Já em fungos como *Neurospora crassa* o mecanismo de produção de microRNAs-like é parcialmente semelhante ao realizado por plantas e mamíferos. Quatro vias distintas para a produção de microRNAs-like neste fungo foram descritas por (LEE et al., 2010). O milR-1 é produzido através de um longo milRNA primário (pri-milRNA) onde proteínas dicers dcr1/dcr2p clivam o pri-milRNA formando um RNA dupla fita (dsRNA) denominado precursor de milRNAs. Após esta etapa o precursor de milRNAs, liga-se à argonauta qde-2p e esta proteína recruta a exonuclease QPIp para processamento do pré-microRNA e formação do microRNA maduro. Além disso, análises de linhagens mutantes para qde-1p (RNA-Polimerase-dependente de RNA) e qde-3p (RecQ helicase) revelaram que estas proteínas não são necessárias para a biossíntese de milR-1, o qual é processado por enzimas dicers e argonauta.

Ainda em *N. crassa*, o mecanismo para a produção de milR-3 requer a presença de dicers (dcr1p/dcr2p). Para a síntese de milR-4 o mecanismo é parcialmente dependente de dicers indicando possivelmente a presença de outra nuclease envolvida no processamento de milR-4. Ao contrário de milR-1 a produção do milR-3 e milR-4 não requer a presença de qde-2p evidenciando um mecanismo independente de qde-2p para síntese deste dois microRNAs. A biogênese de milR-2 é independente de dicers, embora a proteína argonauta qde-2p, com seu sítio catalítico, seja necessária para a produção de pre-milRNA e milR-2 maduro, entretanto para a síntese de milR-2 a proteína QPIp, não é empregada. Desta forma, o pri-milR (milR-2) é processado por uma nuclease desconhecida e o pre-milR associa-se com qde-2p, que através da sua atividade catalítica é envolvida na geração do microRNA-like maduro. Em *N. crassa* a proteína mitocondrial MRPL3p contendo um domínio de Ribonuclease III poderia atuar na biogênese de microRNAs-like que não são dependentes do processamento por dicers (LEE et al., 2010). Assim como em *N. crassa*, em *Mucor circinelloides*

diferentes vias para produção de pequenos RNAs são presentes, empregando proteínas dicers, argonautas e RNA polimerase dependente de RNA. Além disso, uma via não canônica, dependente de argonautas e RNA polimerase dependente de RNA, porém independente de dicers é presente neste fungo, sendo envolvida no processo de degradação de RNAs mensageiros endógenos (TRIEU et al., 2015).

MicroRNAs-like produzidos por fungos apresentam semelhanças com microRNAs de plantas e animais, tais quais, todos são processados a partir de um precursor de RNA em forma de braço e alça (stem-loop). Muitos microRNAs-like de fungos requerem proteínas dicers e argonauta durante as etapas de processamento (LEE et al., 2010) e atuam também como reguladores da expressão gênica. MicroRNAs-like produzidos por *N. crassa* (LEE et al., 2010) e *Cryptococcus neoformans* (JIANG et al., 2012) induzem o silenciamento de genes alvo e componentes centrais da via são conservados entre diferentes espécies de fungos (DRINNENBERG et al., 2009).

1.2 Descrição e Função de Micrornas em Fungos

Após a descoberta de microRNAs em *C. elegans* (LEE et al., 1993) pequenos RNAs foram identificados em animais, plantas e algas (GRIMSON et al., 2008), (ZHAO et al., 2007). Elementos essenciais da via de biogênese de pequenos RNAs de interferência como a proteína Argonauta e a enzima dicer foram descritos em vários fungos pertencentes a diferentes filos, entre eles *Aspergillus nidulans*, *N. crassa*, *C. neoformans*, *Schizosaccharomyces pombe* entre outros, demonstrando que representantes deste reino evolutivamente conservaram a maquinaria para regulação da expressão gênica pós-transcricional mediada por pequenos RNAs (DRINNENBERG et al., 2009).

Os primeiros microRNAs-like identificados em fungos foram descritos em *N. crassa* (LEE et al., 2010) e *C. neoformans* (JIANG et al., 2012). Posteriormente microRNAs-like foram identificados em outros fungos, em *Aspergillus flavus* microRNAs-like foram regulados em resposta à mudanças de temperatura (BAI et al., 2015). Em *Penicillium marneffei* microRNAs-like foram identificados nas fases de micélio e levedura, tais microRNAs-like foram mais abundantes na fase filamentosa deste fungo (LAU et al., 2013). Em *Metarhizium anisopliae* um perfil de expressão diferencial de microRNAs-like foi detectado nas fases de micélio e conídio, sugerindo um possível papel regulatório dos microRNAs-like nas diferentes fases de crescimento deste fungo (ZHOU et al., 2012)

No fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* miRNAs foram diferencialmente regulados entre as fases de micélio, transição 22h e levedura. Na fase de levedura que é a fase encontrada no hospedeiro, miRNAs potencialmente regulam o polímero presente na parede celular, pela repressão de genes envolvidos com degradação de quitina e síntese de beta glucana, além disso miRNAs durante a fase de micélio e transição dimórfica, potencialmente regulam as vias de

produção de energia mediadas por beta-oxidação (DE CURCIO et al., 2018). Mutações de genes envolvidos no fenômeno de RNA por interferência em *Mucor circinelloides* alteraram a função de vários processos biológicos incluindo esporulação, crescimento em diferentes variações de pH e autólise. Além disso, um conjunto extenso de genes foi regulado entre as linhagens mutantes e selvagens (NICOLÁS et al., 2015). Neste fungo a via de RNA por interferência também atua de forma não-canônica, promovendo mutações epigenéticas em determinadas linhagens e conferindo resistência a antifúngicos, favorecendo assim uma rápida adaptação do patógeno a condições de estresse (TRIEU et al., 2015).

Diferentes microRNAs-like foram identificados em *Penicillium chrysogenum*, análises *in silico* revelaram genes alvo silenciados por microRNAs-like produzidos por este fungo (DAHLMANN; KÜCK, 2015). MicroRNAs-like foram ainda descritos em *Fusarium oxysporum* (CHEN et al., 2014), *Trichoderma reesei* (KANG et al., 2013) *Sclerotinia sclerotiorum* (ZHOU et al., 2012), demonstrando assim a presença dessas moléculas em diferentes espécies de fungos. Análises do perfil de RNAs contidos em vesículas secretadas por *C. neoformans*, *P. brasiliensis* (Pb18), *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* identificaram a presença de mRNA, ncRNA incluindo pequenos RNAs com tamanhos de até 250 nt. A busca por homologia entre estas sequências de pequenos RNAs e microRNAs de outros organismos depositados no mirBASE permitiram a identificação de 145 sequências em *P. brasiliensis*, 344 em *C. neoformans*, 423 em *C. albicans* e 532 sequências em *S. cerevisiae* que apresentaram homologia com microRNAs de outros organismos (PERES DA SILVA et al., 2015). Assim como em células de mamíferos e plantas, a presença de microRNAs-like em fungos evidencia um mecanismo conservado entre diferentes eucariotos (KANG et al., 2013).

1.3 Micrornas e sua Relação na Interação entre Patógenos e Hospedeiro

Pequenos RNAs de interferência como os microRNAs, atuam em vários processos biológicos através de um mecanismo de regulação pós-transcricional, alterando a expressão de genes envolvidos em eventos de diferenciação e proliferação celular, tumorigênese, imunidade celular, atuando também durante o processo de interação patógeno-hospedeiro demonstraram que o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, durante a infecção em *Arabidopsis thaliana* e tomate produz pequenos RNAs capazes de silenciar genes do hospedeiro relacionados com a imunidade, desta forma favorecendo a infecção do patógeno em plantas (WEIBERG et al., 2013)

Em infecções sistêmicas a presença de um agente patogênico frequentemente induz uma significativa mudança no perfil de expressão de microRNAs circulantes do hospedeiro. Neste contexto SINGULANI e colaboradores 2017, analisaram o perfil de expressão de microRNAs produzidos por pacientes com Paracoccidioidomicose (PCM) e indivíduos saudáveis. Os dados do trabalho apontaram para uma indução da expressão de oito microRNAs entre os indivíduos com PCM. Apoptose, resposta

imune e adesão do fungo as células do hospedeiro são possíveis processos regulados pelos microRNAs diferencialmente expressos, demonstrando assim a influência destas moléculas no processo de interação patógeno-hospedeiro. Além disso, segundo os autores, a presença de microRNAs circulantes no soro de pacientes com PCM pode ser uma possível alternativa para a obtenção de biomarcadores da infecção. Em um modelo de infecção pulmonar por *P. brasiliensis*, microRNAs produzidos pelas células do pulmão do hospedeiro foram diferencialmente expressos em 28 e 56 dias após a infecção, sugerindo um papel putativo destes pequenos RNAs durante o curso da micose nos pulmões (MARIOTO et al., 2017).

A estratégia de uso de microRNAs produzidos pelo hospedeiro a favor do processo infeccioso também tem sido descrita em patógenos humanos. A bactéria intracelular *Mycobacterium avium*, após contato com macrófagos do hospedeiro induz a expressão de dois microRNAs produzidos por estas células, o microRNA let 7 e mir-29. Tais microRNAs possuem como alvos as proteínas Casp3 e Casp7 respectivamente, estas proteínas são membros da família BCL2, as quais são envolvidas na ativação da via de apoptose celular. Desta forma a indução destes dois microRNAs inibe a apoptose celular, mecanismo utilizado pelo hospedeiro para combater patógenos intracelulares, favorecendo assim a infecção por *M. avium* (SHARBATI et al., 2011). *Mycobacterium tuberculosis* outro patógeno intracelular, regula positivamente a expressão de miR-106b produzido por macrófagos esse microRNA possui como alvo a enzima lisossomal degradativa catepsina. A indução da expressão deste microRNA manipula as respostas do hospedeiro com o intuito de evitar a exposição da bactéria às enzimas degradativas produzidas por macrófagos (PIRES et al., 2017).

Estudos de interação entre macrófagos derivados de medula óssea e *Listeria monocytogenes* demonstram que esta bactéria é capaz de modular a expressão de inúmeros microRNAs contidos nos macrófagos, sugerindo que microRNAs podem fazer parte de uma resposta imune inata do hospedeiro contra a infecção por este patógeno (SCHNITGER et al., 2011). Análises do padrão de expressão de microRNAs produzidos por células dendríticas, após o contato com *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* revelaram uma resposta específica de microRNAs à infecção causada por estes fungos, sendo que alguns dos microRNAs induzidos após o contato com estes patógenos foram miR-212 e miR-132. Possivelmente a indução da expressão destes microRNAs é associada à resposta antifúngica medida por células dendríticas, visto que alvos destes pequenos RNAs são associados a genes envolvidos na resposta imune durante o processo de infecção no hospedeiro (DIX et al., 2017).

O parasita *Leishmania donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral, altera o perfil de expressão de microRNAs hepáticos envolvidos no metabolismo lipídico, através da clivagem da proteína dicer 1 do hospedeiro. Este processo desregula a homeostase lipídica, favorecendo a infecção, visto que pacientes com hipolipidemia são mais susceptíveis à doença causada por este parasita (GHOSH et al., 2013). Nos estágios iniciais da infecção por *Schistosoma* spp. a expressão de miR-351 é reduzida

nos tecidos hepáticos do hospedeiro, entretanto nos estágios mais tardios da infecção ocorre a indução da expressão de miR-351 e consequente aumento da fibrose hepática esquistossomótica. O uso de um antagonista de miR-351 promoveu a redução da fibrose hepática protegendo parcialmente o hospedeiro da esquistossomose letal (HE et al., 2018). Demonstrando assim, que a presença de miRNAs influencia diretamente o desenvolvimento de determinadas infecções.

REFERÊNCIAS

- BAI, Y. et al. **sRNA profiling in *Aspergillus flavus* reveals differentially expressed miRNA-like RNAs response to water activity and temperature.** Fungal genetics and biology: FG & B, v. 81, p. 113–119, ago. 2015.
- BARTEL, D. P.; LEE, R.; FEINBAUM, R. **MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function Genomics : The miRNA Genes.** v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAUMBERGER, N.; BAULCOMBE, D. C. ***Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 33, p. 11928–11933, 2005.
- CHEN, R. et al. **Exploring microRNA-like small RNAs in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*.** PloS one, v. 9, n. 8, p. e104956, 2014.
- DAHLMANN, T. A.; KÜCK, U. **Dicer-Dependent Biogenesis of Small RNAs and Evidence for MicroRNA-Like RNAs in the Penicillin Producing Fungus *Penicillium chrysogenum*.** PloS one, v. 10, n. 5, p. e0125989, 2015.
- DE CURCIO, J. S. et al. **Cell Wall Synthesis, Development of Hyphae and Metabolic Pathways Are Processes Potentially Regulated by MicroRNAs Produced Between the Morphological Stages of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 3057, 2018.
- DIX, A. et al. **Specific and novel microRNAs are regulated as response to fungal infection in human dendritic cells.** Frontiers in Microbiology, v. 8, n. FEB, 2017.
- DRINNENBERG, I. A. et al. **RNAi in budding yeast.** Science (New York, N.Y.), v. 326, n. 5952, p. 544–550, out. 2009.
- GHOSH, J. et al. ***Leishmania donovani* targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection.** Cell Host and Microbe, v. 13, n. 3, p. 277–288, 2013.
- GRIMSON, A. et al. **Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals.** Nature, v. 455, n. 7217, p. 1193–1197, out. 2008.
- GROSSHANS, H.; FILIPOWICZ, W. **Molecular biology: the expanding world of small RNAs.** Nature, v. 451, n. 7177, p. 414–416, 24 jan. 2008.
- HE, L.; HANNON, G. J. **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** Nature reviews. Genetics, v. 5, n. 7, p. 522–531, 2004.
- HE, X. et al. **MicroRNA-351 promotes schistosomiasis-induced hepatic fibrosis by targeting the vitamin D receptor.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 1, p. 201715965, 2018.

- JIANG, N. et al. **Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans***. PLoS one, v. 7, n. 12, p. e52734, 2012.
- KANG, K. et al. **Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing**. PLoS ONE, v. 8, n. 10, p. 1–7, out. 2013.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs**. Science (New York, N.Y.), v. 294, n. 5543, p. 853–858, 26 out. 2001.
- LAU, S. K. P. et al. **Identification of microRNA-like RNAs in mycelial and yeast phases of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei***. PLoS neglected tropical diseases, v. 7, n. 8, p. e2398, 2013.
- LEE, H.-C. C. et al. **Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi**. Molecular cell, v. 38, n. 6, p. 803–14, jun. 2010.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14***. Cell, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.
- MARIOTO, T.G.D. et al. **Study of differential expression of miRNAs in lung tissue of mice submitted to experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis***. Med Mycol, v.55, p- 774-784, 2017.
- NICOLÁS, F. E. et al. **The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides***. BMC Genomics, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2015.
- NOZAWA, M.; MIURA, S.; NEI, M. **Origins and evolution of microRNA genes in plant species**. Genome Biology and Evolution, v. 4, n. 3, p. 230–239, 2012.
- PARK, M. Y. et al. **Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis***. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 2005.
- PERES DA SILVA, R. et al. **Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA**. Scientific Reports, v. 5, n. 1, p. 7763, jul. 2015.
- PIRES, D. et al. ***Mycobacterium tuberculosis* Modulates miR-106b-5p to Control Cathepsin S Expression Resulting in Higher Pathogen Survival and Poor T-Cell Activation**. Frontiers in Immunology, v. 8, p. 1819, 2017.
- REINHART, B. J. et al. **The 21 nt nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *C. elegans***. Nature, v.403, n.6772, p.901-906, 2000.
- REINHART, B. J. et al. **MicroRNAs in plants**. Genes & Development, v. 16, n. 13, p. 1616–1626, 1 jul. 2002.
- SCHNITGER, A. K. D. et al. ***Listeria monocytogenes* infection in macrophages induces vacuolar-dependent host miRNA response**. PLoS ONE, v. 6, n. 11, p. e27435, 2011.
- SHARBATI, J. et al. **Integrated microrna-mrna-analysis of human monocyte derived macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection**. PLoS ONE, v. 6, n. 5, 2011.
- SHEN, J.; HUNG, M.-C. **Signaling-mediated regulation of MicroRNA processing**. Cancer Research, v. 75, n. 5, p. 783–791, 1 mar. 2015.
- SINGULANI, J. et al. **Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis**. Biomedical Reports, v. 6, n. 3, p. 353–357, jan. 2017.

- TRIEU, T. A. et al. **A Non-canonical RNA Silencing Pathway Promotes mRNA Degradation in Basal Fungi**. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 4, p. 1–32, 2015.
- VOINNET, O. **Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs**. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 669–687, 20 fev. 2009.
- WEIBERG, A. et al. **Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways**. *Science*, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 2013.
- XIE, M.; ZHANG, S.; YU, B. **microRNA biogenesis, degradation and activity in plants**. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 72, n. 1, p. 87–99, jan. 2015.
- YANG, Q. et al. **Transcription of the major *Neurospora crassa* microRNA-like small RNAs relies on RNA polymerase III**. *PLoS genetics*, v. 9, n. 1, p. e1003227, 2013.
- YI, R. et al. **Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs**. *RNA (New York, N.Y.)*, v. 11, n. 2, p. 220–226, 2005.
- ZHAO, T. et al. **A complex system of small RNAs in the unicellular green alga**. *Genes & Development*, p. 1190–1203, 2007.
- ZHOU, J. et al. **Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing**. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 287, n. 4, p. 275–282, 2012a.
- ZHOU, Q. et al. **Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development**. *Fungal Biology*, v. 116, n. 11, p. 1156–1162, nov. 2012b.

O CICLO CELULAR E SEUS MECANISMOS DE CONTROLE: UMA REVISÃO

Schirley Costalonga

Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos
Hídricos

Cariacica – Espírito Santo

Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Universidade Federal do Espírito Santo –

Departamento de Ciências Biológicas

Vitória – Espírito Santo

RESUMO: O desenvolvimento dos organismos está diretamente relacionado ao correto processo de divisão celular. Ao longo da evolução foram desenvolvidos diferentes mecanismos de checagem responsáveis por garantir a integridade de todas as etapas do ciclo celular mitótico, desde a descompactação e duplicação do material genético na fase de repouso até a citocinese. Para isso, diversos genes e proteínas atuam em uma série de cascatas de transdução de sinal. Qualquer falha nos mecanismos de reparo pode causar problemas como mutações gênicas ou cromossômicas, comprometendo, até mesmo, a sobrevivência do indivíduo. Este trabalho faz uma revisão sobre os principais pontos de controle da mitose celular, destacando as diferenças existentes entre animais e vegetais.

PALAVRAS-CHAVE: Mitose celular. Proteínas Cdks. Mecanismos de reparo. Mutação.

ABSTRACT: The development of organisms is directly related to the correct process of cell division. Along the evolution have been developed various mechanisms responsible for checking ensure the integrity of all stages of the mitotic cell cycle, from unpacking and duplication of genetic material on the resting phase until the cytokinesis. For this, several genes and proteins act in a series of signal transduction cascades. Any failure of repair mechanisms can cause problems such as gene or chromosomal mutations, compromising even the survival of the individual. This work makes a review on the main points of control of cellular mitosis, highlighting the differences between animals and plants.

KEYWORDS: Mitotic cell cycle. Cdks proteins. Repair mechanisms. Mutation.

1 | INTRODUÇÃO

A diversidade de formas de vida existentes no planeta é incomensurável; no entanto, há uma característica biológica comum à todas elas: desde as mais primitivas bactérias ao mais complexo organismo multicelular, o crescimento e desenvolvimento dos organismos depende diretamente do processo de divisão celular.

Esse é um mecanismo extremamente complexo e delicado, onde é imperativo que

toda a maquinaria celular funcione corretamente, pois qualquer erro pode levar à interrupção do processo e até mesmo à morte do organismo em casos severos. Portanto, todas as etapas da divisão celular – desde a correta duplicação do material genético até a separação das células-filhas – devem ser austeramente controladas, o que é feito por um aparato de checagem que garante a finalização do processo de forma correta.

Este artigo traz uma revisão acerca das etapas do ciclo mitótico, bem como dos mecanismos de controle que garantem a integridade das células-filhas geradas.

2 | O PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR

Segundo Alberts e outros (2010, p. 1053), “todos os organismos vivos, da bactéria unicelular ao mamífero multicelular, são produtos de repetidos ciclos de crescimento e divisão celular que remontam aos primórdios da vida na Terra, há mais de três bilhões de anos”. Portanto, o desenvolvimento e manutenção das formas de vida existentes dependem da constante renovação celular, bem como da interação entre os grupos celulares, mediada por proteínas sinalizadoras (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Para isso, as células precisam deixar a fase de repouso, conhecida como interfase, e entrar em processo de divisão a fim de garantir a sustentação da vida (figura 1). Cada etapa do ciclo celular é controlada por genes codificadores de moléculas que atuam no mecanismo de controle, visando garantir a estabilidade e integridade do processo; esses pontos de checagem determinam não só a ordem de ocorrência dos eventos, mas também envolvem os sistemas de reparo que exercem importante função durante a replicação do material genético (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997).

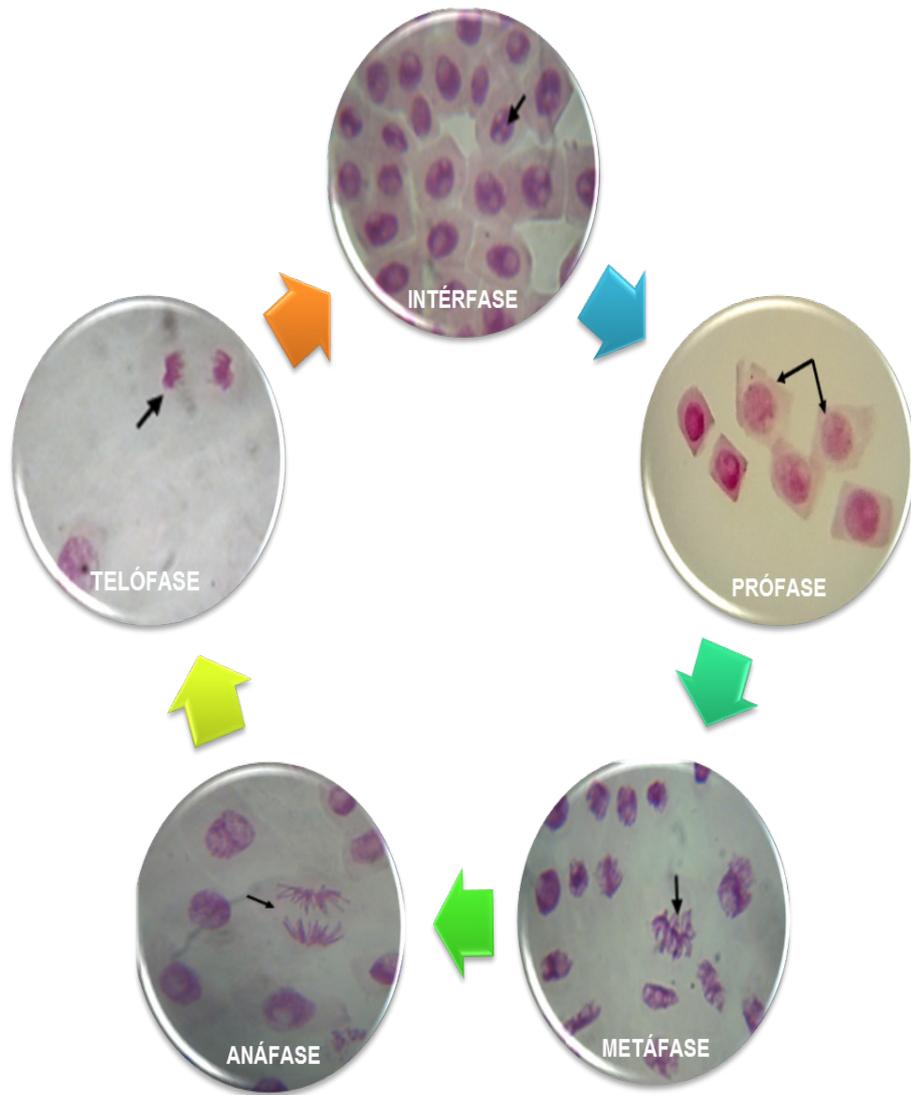


Figura 1 – Esquematização das etapas de um ciclo de divisão celular normal. Aumento: 400X.

O objetivo do ciclo celular mitótico é garantir a produção de nova geração de células contendo o mesmo conjunto gênico das progenitoras (ALBERTS et al., 2010); seus estágios são similares na maioria dos organismos e consiste basicamente de duas partes sequenciais (figura 2): a intérfase, formada pelos estágios G1, S e G2, e o estágio M, onde – por meio da mitose – ocorre a real divisão do material genético (previamente duplicado na fase S da intérfase) e a divisão da célula em duas pela citocinese, cada uma com um núcleo idêntico, (GRIFFITHS et al., 2006; ALBERTS et al., 2010).

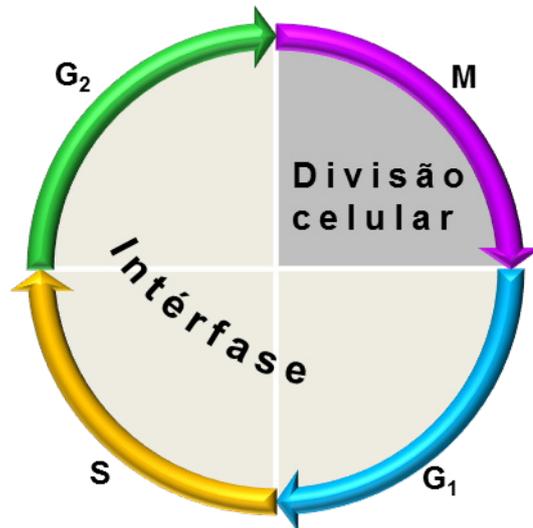


Figura 2 – Representação das quatro fases gerais do ciclo celular, onde a intérfase é caracterizada pelas fases G₁, S e G₂, enquanto a divisão celular de fato ocorre na fase M.

2.1 Intérfase

Em detrimento ao seu significado (repouso), a intérfase é a etapa em que a célula está mais ativa, visto que é o momento da replicação do material genético; consiste na maior e mais lenta fase do ciclo.

Os intervalos G₁ (fase em que a célula-filha recém-formada na mitose ainda não replicou o DNA para entrar em nova divisão) e G₂ (período no qual a célula já duplicou seu material genético na fase S, mas ainda não iniciou o processo de divisão) são muito mais do que um simples retardo temporal utilizado pela célula para seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013); também permitem que

[...] a célula monitore o ambiente interno e externo a fim de se assegurar de que as condições são adequadas e os preparativos estejam completos, antes que a célula se comprometa com as principais transformações da fase S e da mitose. Nesse sentido, a fase G₁ é especialmente importante. Sua duração pode variar imensamente, dependendo das condições externas e de sinais extracelulares de outras células. Se as condições são desfavoráveis [...], as células retardam a progressão a G₁ e podem entrar em um estado de repouso conhecido como G₀, no qual podem permanecer por semanas ou mesmo anos antes que a proliferação seja retomada [...]. Se as condições extracelulares são favoráveis e os sinais para crescer e se dividir estão presentes, as células [...] avançam até um ponto de comprometimento próximo ao fim de G₁, conhecido como ponto de restrição [...]. (ALBERTS, 2010, p. 1055).

Atingido esse ponto, a replicação do material genético é inevitável, mesmo que a sinalização extracelular seja removida.

Cabe ressaltar que, diferentemente das células animais, as dos vegetais possuem a capacidade de parar o ciclo durante as fases G₁ e G₂, fenômeno conhecido como endorreduplicação, podendo, portanto, se submeter a inúmeros ciclos adicionais de

replicação nuclear sem entrar em mitose (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A fase S, segundo Griffiths e outros (2006), é essencial para a propagação do genótipo às células descendentes, uma vez que é o momento no qual o DNA de cada cromossomo será replicado de forma semiconservativa.

Para Alberts e outros (2010, p. 1067),

Uma célula deve resolver dois problemas ao iniciar e concluir a replicação do DNA. Primeiro, a replicação deve ocorrer com extrema precisão, a fim de minimizar o risco de mutações na próxima geração de células. Segundo, cada nucleotídeo [...] deve ser copiado somente uma vez, a fim de evitar os efeitos danosos da amplificação gênica.

O processo de replicação inicia-se no início da fase G_1 , com o agrupamento do complexo pré-replicativo nas origens de replicação; no início da fase S, ocorre a formação do complexo pré-iniciação, que desenrola a dupla hélice e transporta a DNA-polimerase e as demais enzimas replicativas até as fitas de DNA (ALBERTS et al., 2010).

Ao final do processo, os cromossomos se dividem de forma longitudinal, gerando - cada um - um par de cromátides irmãs que permanecem unidas graças às proteínas de adesão denominadas Coesinas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2 Mitose

Griffiths e outros (2006) definem o processo de mitose como sendo a divisão assexuada das células, cuja finalidade é a reprodução direta do tipo celular, de modo a garantir a manutenção do conjunto de cromossomos ao longo das gerações.

Embora compreenda o menor segmento do ciclo celular (5-10%), envolve profundas modificações na arquitetura celular; sendo que primeiramente, o vacúolo central é dividido por “uma união de correntes transvacuolares citoplasmáticas que contém o núcleo; esta se torna a região onde a divisão ocorrerá” (TAIZ; ZEIGER, 2013, p. 26). Há um aumento da atividade da enzima M-Cdk que, juntamente com outras Cinases, fosforila uma série de proteínas para a constituição do fuso mitótico (estrutura bipolar de microtúbulos que se forma na região nuclear e que é fundamental para a segregação dos cromossomos na anáfase) e sua ligação aos pares de cromátides-irmãs, desencadeando as fases iniciais do processo (prófase e metáfase); durante a transição de metáfase à anáfase, além da inativação das Cdks, ocorre a ativação da enzima Separase, responsável pela clivagem da Coesina e consequente separação das cromátides-irmãs (GRIFFITHS et al., 2001; ALBERTS et al., 2010). A supracitada inativação das Cdks é um processo fundamental, pois garante os eventos necessários para o fim da mitose, ou seja, a desmontagem do fuso mitótico e a citocinese (ALBERTS et al., 2010).

A mitose pode ser dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase; alguns autores consideram a existência de etapa intermediária entre a prófase e a metáfase,

denominada prometáfase, que envolve a desintegração abrupta da carioteca, permitindo o acesso das fibras do fuso mitótico às cromátides.

2.2.1 Prófase

Os pares de cromátides-irmãs alteram seu estado organizacional e se condensam até atingirem uma forma mais curta e espessa, facilitando a movimentação durante o ciclo (GRIFFITHS et al., 2001). Conforme Alberts e outros, a condensação é vital, uma vez que, caso isso não ocorresse, qualquer tentativa de separação das cromátides, por menos força que empregasse, causaria sua ruptura; essa mudança na estrutura cromossômica envolve os seguintes processos:

[...] a *condensação dos cromossomos*, na qual as cromátides são dramaticamente compactadas; e a *resolução das cromátides-irmãs*, por meio da qual as duas irmãs são resolvidas em unidades separáveis distintas. A resolução resulta do desencadeamento dos DNAs-irmãos, acompanhado pela remoção parcial de moléculas de coesina ao longo dos braços cromossômicos [...] (ALBERTS et al., 2010, p. 1075).

Cada cromátide se concentra no centrômero, os nucléolos - grandes estruturas intranucleares - desaparecem neste estágio e a membrana nuclear começa a se desfazer. O nucleoplasma e o citoplasma se unem. Externamente ao núcleo, inicia-se a formação do fuso mitótico entre os centrossomos (ALBERTS et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2.2 Metáfase

O fuso nuclear recém-formado na prófase torna-se proeminente e os cromossomos se alinham no plano equatorial da célula, onde se ligarão aos microtúbulos do fuso de cada polo (GRIFFITHS et al., 2001; ALBERTS et al., 2010).

2.2.3 Anáfase

Nesta etapa, as cromátides-irmãs se separam e formam dois cromossomos filhos; começa a ocorrer o distanciamento dos polos do fuso simultaneamente ao encurtamento dos microtúbulos, fazendo com que os cromossomos se segreguem em dois grupos iguais nas extremidades opostas da célula (ALBERTS et al., 2010).

2.2.4 Telófase

É o último estágio da mitose, onde, com os conjuntos de cromossomos segregados em cada polo do fuso, ocorre a reconstituição da carioteca ao redor de cada núcleo filho (GRIFFITHS et al., 2001); a partir deste momento, “os complexos de poros bombeiam proteínas nucleares para o interior, o núcleo se expande e os cromossomos mitóticos condensados são reorganizados em seu estado interfásico, possibilitando a retomada da transcrição gênica” (ALBERTS et al., 2010, p. 1090). O

fuso se dispersa e ocorre o reaparecimento do nucléolo.

2.3 Citocinese

Consiste na divisão citoplasmática da célula que terminou o processo de divisão, por meio de um anel contrátil constituído por filamentos de actina e miosina; este irá comprimir a célula ao meio, originando duas células-filhas, cada uma com um núcleo e um conjunto cromossômico (ALBERTS et al., 2010).

Diferentemente das células animais, a citocinese nos vegetais superiores compreende a divisão do citoplasma de dentro para fora devido à construção da nova parede celular entre os dois núcleos-filhos; para isso, o plano de divisão é estabelecido antes da fase M e deverá – ainda – propiciar o estabelecimento da placa celular (precursora da nova parede celular) ao final da anáfase (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A formação da placa celular é orientada pelo fragmoplasto, por meio do qual serão transportadas para o centro da célula pequenas vesículas do aparelho de Golgi contendo os polissacarídeos e proteínas que constituirão a parede celular; ao chegarem ao equador da célula, essas vesículas se fundem e formam uma estrutura discoidal envolta por membrana, denominada placa celular inicial, que se expande à medida que mais vesículas se fundem umas às outras, até alcançar a membrana plasmática e a parede celular original, fundindo-se com elas e dividindo a célula em duas (ALBERTS et al., 2010, TAIZ; ZEIGER, 2013).

À medida que a placa celular se forma, ocorre a agregação de túbulos do [retículo endoplasmático] em canais revestidos de membrana que atravessam a placa, conetando as células filhas e estabelecendo os locais dos plasmodemas primários. [...] A distribuição do Complexo de Golgi e de outras organelas ocorre igualmente entre as duas metades da célula. O sistema de endomembranas e o citoesqueleto são amplamente rearranjados (TAIZ; ZEIGER, 2013, p. 26).

Substâncias com potencial citotóxico, dentre elas metabólitos secundários, podem interferir nas etapas de divisão impedindo seu início e, conseqüentemente cessando o crescimento do organismo, ou ainda, afetar o funcionamento do fuso mitótico, gerando anomalias nas fases do ciclo celular.

3 | MECANISMOS DE CONTROLE E REPARO DO CICLO CELULAR

Cada fase do ciclo celular possui eventos únicos e fundamentais, sem os quais não é possível atingir o objetivo final, ou seja, a divisão celular; destarte, de forma a garantir a estabilidade desses eventos, incluindo a fidelidade e integridade da replicação do material genético, os mecanismos de checagem e reparo, bem como as reações bioquímicas que controlam a transição de uma fase a outra do ciclo, se mantiveram conservados e extremamente precisos pela evolução (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997). É um processo “supervisionado por uma bateria de genes diversos cujo trabalho

é garantir que esta sequência seja realizada corretamente” (GRIFFITHS et al., 2001, p. 85), constituindo-se como a principal barreira protetora contra os danos ao DNA (RIBEIRO et al., 2003).

Os pontos de controle do ciclo são sistemas constituídos por vários componentes cuja atuação envolve uma série de cascatas de transdução de sinal e atuam diretamente sobre a transcrição, modificação pós-transcricional e degradação das unidades catalíticas denominadas cinase dependentes de ciclina (Cdks), responsáveis por controlar as transições entre as etapas do ciclo (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2003). A atuação das Cdks no ciclo celular é determinada pelo aumento ou diminuição na quantidade de quatro tipos de proteínas reguladoras, denominadas ciclinas:

1. As G_1/S -ciclinas ativam as Cdks ao final de G_1 e, com isso, ajudam a desencadear a progressão ao Início, resultando no comprometimento à entrada no ciclo celular. Seus níveis caem na fase S;
 2. As S-ciclinas se ligam a Cdks logo após a progressão ao Início e ajudam a estimular a duplicação dos cromossomos. Os níveis das S-ciclinas permanecem elevados até a mitose e essas ciclinas também contribuem ao controle de alguns eventos mitóticos iniciais;
 3. As M-ciclinas ativam as Cdks que estimulam a entrada na mitose no ponto de verificação G_2/M .
- [...] uma quarta classe de ciclinas, as G_1 -ciclinas, ajuda a regular as atividades das G_1/S -ciclinas, as quais controlam, no final da G_1 , a progressão ao Início (ALBERTS et al., 2010, p. 1062).

Nos vegetais, a Cdk predominante é a do tipo D, cuja performance, segundo Taiz e Zeiger (2013), é controlada pelos hormônios vegetais citocininas e brassinosteróides, especialmente durante o final da fase G_1 , onde agem aumentando a quantidade de ciclina D_3 , que sinaliza para a entrada em novo processo de divisão.

Assim, em resposta à passagem da célula pela divisão, a expressão das ciclinas aumenta e, conseqüentemente, se eleva o número de Cdks ativadas; isso permite a progressão da fase G_1 para a fase S (RIBEIRO et al., 2003). Entretanto, mesmo após a ligação da cinase ao sítio de ativação da Cdk, o complexo ciclina-Cdk ainda não está apto a induzir os eventos específicos do ciclo celular, necessitando que ocorra a fosforilação de um aminoácido ao redor do sítio de ativação; tal evento é realizado pela proteína cinase ativadora de Cdk – CAK (ALBERTS et al., 2010).

Os principais pontos de checagem localizam-se na transição da fase G_1 para a fase S, na transição entre G_2 e mitose e na transição de metáfase para anáfase (RIBEIRO et al., 2003; ALBERTS et al., 2010). Além disso, há o ponto de checagem do fuso que impede a progressão para a anáfase caso todos os microtúbulos não tenham interagido corretamente com o cinetócoro (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No ponto de checagem ao final de G_1 , danos no material genético causam a superexpressão da proteína p53, fundamental para a manutenção da integridade do genoma, culminando no estacionamento do ciclo celular em G_1 até que o reparo do

DNA seja efetuado; quando isso é feito, a p53 aumenta a transcrição da proteína MDM-2 para inibir a si mesma, permitindo que a célula avance para a fase S (RIBEIRO et al., 2003; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Por outro lado, caso os danos sejam irreparáveis, como injúrias provocadas por substâncias tóxicas ao DNA, a p53 estimula a transcrição da proteína BAX, que sinalizará para que a célula entre em morte celular programada, fenômeno conhecido como apoptose e pelo qual ocorre a eliminação de células danificadas (RIBEIRO et al., 2003). Mutações no gene que codifica a p53 geram uma anomalia no ponto de checagem de G_1 que permite à célula entrar na fase S sem reparar as lesões, culminando – posteriormente - em uma “mitose catastrófica [ou seja,] uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea” (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Para os autores, apesar de não ser uma forma direta de morte, erros desta magnitude na mitose compreendem uma sinalização irreversível para a morte.

Os pontos de controle do final de G_1 e na transição da G_2 para a mitose são fundamentais na proteção celular de agentes genotóxicos externos; a transição para a mitose é inibida se ocorrem erros ou alterações que comprometam aspectos como a replicação do DNA, a condensação cromossômica, a desintegração da carioteca e a montagem do fuso mitótico e esses pontos de controle são fundamentais para impedir a segregação dos cromossomos defeituosos (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997; ALBERTS et al., 2010). A ação da Aurora-cinase nesta etapa é fundamental para garantir a passagem da célula pelas diversas fases do ciclo, uma vez que é responsável por garantir a correta fixação dos microtúbulos na montagem do fuso, além de ter importante atuação na orientação dos cromossomos e na citocinese; a superexpressão desta cinase leva a uma entrada precoce na mitose devido à hiperatividade dos centrossomos, podendo resultar em instabilidade cromossômica (GOLLAPUDI; HASEGAWA; EASTMOND, 2014).

O terceiro ponto de verificação, localizado na transição entre metáfase e anáfase e regula a separação das cromátides-irmãs, garantindo que ela ocorra de forma correta para que a mitose se conclua perfeitamente e a citocinese aconteça. Diferentemente dos outros pontos de checagem, cujo acionamento se dá por ativação dos complexos ciclina-Cdks, a transição de metáfase à anáfase é dependente da destruição destes, conduzindo aos estágios finais da divisão celular (ALBERTS et al., 2010). Esta etapa é regulada pelo complexo promotor da anáfase (APC/C), cujas funções englobam a destruição da proteína que mantém as cromátides-irmãs unidas, permitindo – com isso - a entrada da célula em anáfase, e a destruição das S-ciclina e M-ciclina, causando, destarte, a inativação das Cdks e permitindo, conseqüentemente, a realização das etapas finais da mitose. “Quando as G_1 /S-Cdks são ativadas no final de G_1 , o APC/C é desligado, permitindo com isso o acúmulo de ciclina para o início do próximo ciclo celular” (ALBERTS et al., 2010, p.1064).

4 | MUTAÇÕES: CONSEQUÊNCIA DE FALHAS NOS MECANISMOS DE REPARO

Além de ser uma molécula estável, o DNA está exposto constantemente a produtos tóxicos oriundos do próprio metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio, e provenientes de fontes exógenas, como poluentes ambientais, metabólitos de outras plantas, etc. Visando garantir a estabilidade do genoma e, desta forma, a sobrevivência das espécies, ao longo do curso evolutivo, as células desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos capazes de reparar quase todas as lesões do material genético, fato pelo qual as mutações severas são eventos raros (RIBEIRO et al., 2003). Esses mecanismos de reparo agem utilizando como molde um filamento de DNA, o que só é possível graças à complementaridade do material genético (GRIFFITHS et al., 2006).

É fato que a sobrevivência em longo prazo de uma espécie depende de alterações genéticas estáveis e herdáveis - mutações - nos alelos (variações de um mesmo gene) que, por meio da Seleção Natural, selecionem os indivíduos mais aptos; estas modificações constituem o substrato para a evolução adaptativa (ALBERTS et al., 2010; SILVA et al., 2014) e podem ser incluídas em três grupos: as que trazem vantagens aos indivíduos que as possuem, sendo, por isso, mantidas pela evolução; aquelas que são deletérias, sendo eliminadas; e as neutras (FREIRE-MAIA, 2012). Todavia, é fato também que essa sobrevivência só se mantém se houver estabilidade genética, ou seja, se os mecanismos de reparo do DNA atuarem com toda a sua capacidade prodigiosa (FRIEDBERG, 2016); quando eles falham, as lesões no material genético podem modificá-lo permanentemente (RIBEIRO et al., 2003).

As mutações são definidas como alterações hereditárias do material genético, decorrentes de erros de replicação antes da divisão celular e não causadas por recombinação ou segregação; podem afetar qualitativa ou quantitativamente o gene e/ou cromossomo (GRIFFITHS et al., 2001; FONSECA; PEREIRA, 2004).

As alterações cromossômicas [estão] relacionadas à estrutura cromossômica, em consequência de deleções, duplicações, inversões e translocações maiores, ou ao número de cromossomos, em decorrência de falhas na citocinese, por não disjunção mitótica, etc. As mutações gênicas [por sua vez] são devidas à substituição de bases inserções, deleções e translocações (SILVA et al., 2014).

Conforme Griffiths e outros (2006), o material genético é constantemente submetido a um cabo de guerra entre processos químicos que o danificam, levando a novas mutações, e os mecanismos de reparo que monitoram o DNA de forma constante a fim de corrigir os danos gerados. Considerando o fato de que lesões no material genético podem ser causadas por agentes químicos de diversas classes (POHREN; COSTA; VARGAS, 2013), a vida moderna permite a coexposição a diversos mutágenos que, juntos, podem agravar as lesões infringidas ao DNA, impedindo que a maquinaria celular aja eficazmente (GIORGI et al., 2014).

Em populações bem adaptadas, as mutações que surgem são, frequentemente,

prejudiciais às células (FREIRE-MAIA, 2012) e resultam de modificações que ocorrem em curto prazo na estrutura do DNA; podem interferir em processos vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, além de serem as principais responsáveis pela ocorrência de processos cancerígenos e morte celular (MATIOLI, 2001; SILVA; MOURA; NETO, 2015). Ademais, “lesões persistentes no DNA acarretam um funcionamento celular incorreto e um aumento da mutagênese devido a uma maior probabilidade de ocorrerem erros quando da replicação de um molde alterado” (RIBEIRO et al., 2003).

Os mecanismos utilizados pelas substâncias capazes de infligir danos ao material genético são diversos, podendo atuar sobre o fuso mitótico, sobre proteínas específicas de reparo, sobre os cromossomos, etc; por isso, os agentes genotóxicos têm sido divididos em duas classes, conforme seu mecanismo de ação: aneugênicos, que afetam o aparato do fuso mitótico, levando à aneuploidias; e clastogênicos, cuja ação consiste em causar injúrias aos cromossomos (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

A análise de alterações cromossômicas consiste em um dos poucos métodos diretos para avaliação mutagênica e necessita de um organismo-teste que esteja em constante divisão mitótica, permitindo a observação de alterações ao longo de todo o ciclo celular e que se manifestam como inibição da divisão, interrupção em metáfases, surgimento de pontes e micronúcleos, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, dentre outros (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Portanto, o estudo de agentes potencialmente genotóxicos é extremamente importante, não só para a compreensão dos efeitos da mutação sobre o organismo, mas - também - por este agente oferecer perigo a qualquer tipo de células (animal, vegetal ou microrganismos), haja vista a universalidade do código genético.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a sua extrema importância para a manutenção da vida, a evolução garantiu que o processo de divisão mitótica mantivesse seus mecanismos de reparo e controle bem conservados; por esta razão erros como mutações são raros, porém gravíssimos, comprometendo o desenvolvimento e, em último caso a sobrevivência do organismo.

Longe de ser um processo simples, o ciclo de divisão celular depende diretamente da atuação de diversos genes e proteínas em etapas cruciais, especialmente no final de G_1 e na transição de G_2 para a mitose, garantindo, assim, a correta segregação cromossômica.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

- BAGATINI, M.D; SILVA, A.C.F; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- FONSECA, C.A; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**, n. 16, p. 7-8, 2004.
- FREIRE-MAIA, N. A evolução dos seres vivos. **Síntese: Revista de Filosofia**, v. 17, n. 51, p. 49-63, 2012.
- FRIEDBERG, E.C. A history of the DNA repair and mutagenesis field: The discovery of base excision repair. **DNA Repair**, v. 37, p. A35-A39, 2016.
- GIORGI, G. et al. An evaluation of genotoxicity in human neuronal-type cells subjected to oxidative stress under an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Mutat. Res.**, v. 775–776, p. 31-37, 2014.
- GOLLAPUDI, P; HASEGAWA, L.S; EASTMOND, D.A. A comparative study of the aneugenic and polyploidy-inducing effects of fisetin and two model Aurora kinase inhibitors. **Mutat. Res.**, v. 767, p. 37-43, 2014.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- LUZHNA, L; KATHIRIA, P; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 2013.
- MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.
- PERALTA-ZARAGOZA, O. et al. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. **Salud pública de México**, v. 39, n. 5, p. 451-462, 1997.
- POHREN, R.S; COSTA, T.C; VARGAS, V.M.F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, 2013.
- RIBEIRO, L.R., et al. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.
- SILVA, C.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. **Mutat. Res.**, v. 767, p. 8–12, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013.
- TEDESCO, S.B; LAUGHINGHOUSE, H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J. (Ed.). **Environmental Contamination**. InTech, 2012. p. 137-156.

OSTEOSSARCOMA PEDIÁTRICO

Natália Paiva do Nascimento

Centro Infantil Boldrini – Centro de Pesquisa;
Instituto de Biologia - Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP)
Campinas – SP

Thauanna Alves Meira

Centro Infantil Boldrini, Centro de Pesquisa;
Faculdade de Ciências Médicas – Universidade
Federal de São Carlos.
São Carlos – SP

Mariana Camargo Maschietto

Centro Infantil Boldrini, Centro de Pesquisa
Campinas – SP

RESUMO: Os tumores ósseos primários são responsáveis por 5-6% de todos os tumores da infância e adolescência, sendo o osteossarcoma o mais comum. O osteossarcoma é um tumor agressivo, caracterizado por uma destruição óssea e de tecidos adjacentes com altos índices de metástases. Diversas síndromes de câncer hereditário aumentam o risco para o desenvolvimento de osteossarcoma, sendo que auxiliaram na descoberta de genes associados com sua patogênese. *RB1* e *TP53* podem ser encontrados alterados na linhagem germinativa (associados com as síndromes de Li-Fraumeni e retinoblastoma hereditário, respectivamente) e somaticamente, sendo encontrados em 3% e 22% dos casos esporádicos, respectivamente.

Outras alterações mais frequentes incluem a amplificação de *MDM2* (3%) e a super-expressão de *ERBB2* (30%). Também apresentam cariótipos complexos com numerosas aberrações genômicas sendo as mais comuns, o ganho do cromossomo 1 e as perdas dos cromossomos 2, 6, 8, 9, 10, 13 e 17. Alterações epigenéticas incluindo desregulação da metilação de DNA, expressão de RNAs não codificantes e modificações de histonas também foram associadas com a patogênese dos osteossarcomas, indicando que o genoma destes tumores apresenta numerosas alterações genéticas com alta taxa de variação estrutural e molecular.

PALAVRAS-CHAVE: osteossarcoma, tumor pediátrico, alterações moleculares, genética, epigenética, *TP53*

PEDIATRIC OSTEOSARCOMA

ABSTRACT: Primary bone tumors account for 5-6% of all tumors in childhood and adolescence, with osteosarcoma being the most common tumor. Osteosarcoma is an aggressive tumor characterized by bone destruction and adjacent tissues, also presenting a high rate of metastasis. Several hereditary cancer syndromes increase the risk to develop osteosarcoma; they helped in the discovery of genes associated with osteosarcoma pathogenesis. *RB1* and *TP53*

can be altered either in the germinative lineage (associated with Li-Fraumeni and hereditary retinoblastoma syndromes, respectively) and somatically, being found in 3% and 22% of sporadic cases, respectively. Other more frequent alterations include the *MDM2* amplification (3%) and *ERBB2* overexpression (30%). They also present complex karyotypes with numerous genomic aberrations; the most common being the gain of chromosome 1 and the loss of chromosomes 2, 6, 8, 9, 10, 13 and 17. Epigenetic alterations including deregulation of DNA methylation, no-coding RNA expression and histone modifications have also been associated with the pathogenesis of osteosarcomas. Altogether, these alterations indicate that these tumors genome present a high rate of structural and molecular variation.

KEYWORDS: osteosarcoma, pediatric tumor, molecular alterations, genetics, epigenetics, *TP53*

INTRODUÇÃO

Os tumores ósseos primários representam 5-6% de todos os tumores da infância e adolescência (0-19 anos), sendo o osteossarcoma o câncer ósseo primário mais comum nesta faixa etária, apresentando uma distribuição bimodal de idade, sendo o primeiro pico observado na segunda década de vida (14-19 anos) e o segundo pico a partir da sexta década de vida (60 anos) (Unni et al, 1996; Mirabello, et al. 2009; Unni et al, 2009; Rosenberg et al, 2013; Raymond et al, 2015; Yan et al, 2016). Na adolescência (15-19 anos), a incidência pode chegar a 8-10 casos/milhão ao ano, representando de 10 a 15% dos tumores sólidos extracraniais nesta faixa etária (Mirabello, et al. 2009; Stiller, et al. 2006), mostrando-se ligeiramente mais prevalente no sexo masculino, acometendo-os 50% mais do que as mulheres. Em mulheres, o osteossarcoma normalmente é detectado em uma idade mais precoce do que os homens, provavelmente porque apresentam o pico de crescimento mais jovem (Harryson et al, 2018). No Brasil, a maior incidência deste tipo de tumor está registrada no estado de São Paulo (INCA, 2008), no qual são descritos 648 casos (~ 54 casos/ano) de osteossarcoma entre 2000 e junho de 2012, em pacientes de 0 a 18 anos (FOSP, 2012).

O osteossarcoma tem um curso clínico agressivo, caracterizado por destruição óssea e de tecidos moles locais assim como alta propensão a desenvolver metástases distantes em pulmão (80% dos casos), outros sítios ósseos, medula óssea e, raramente, em linfonodos, sendo esta a principal causa de morte em pacientes com osteossarcoma. Atinge frequentemente ossos longos, com destaque para terço proximal do úmero (15%) e da tíbia (15%) e terço distal do fêmur (30%) (Rosenberg et al, 2003). Entre 10% a 20% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico, o que infere um prognóstico muito ruim (Ren et al, 2015).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

O diagnóstico de osteossarcoma é baseado na presença de células mesenquimais osteoblásticas que produzem a sua própria matriz osteóide. O osteossarcoma se origina mais frequentemente na região metafisária dos ossos longos, no interior da cavidade medular e penetra o córtex ósseo, envolvendo e invadindo os tecidos moles adjacentes (Ragland, et al. 2002). Na classificação atual da Organização Mundial da Saúde, o osteossarcoma pode ser dividido em: convencional, telangectásico, de pequenas células, central de baixo grau, secundário, paraosteal, periosteal e de superfície de alto grau. O diagnóstico histológico classifica os osteossarcomas em três subtipos: osteoblástico, condroblástico e fibroblástico, dependendo do tipo predominante de matriz presente no tumor. Osteóide matriz mineralizada é a característica dominante apenas no subtipo osteoblástico (cerca de 60 % dos casos), os subtipos fibroblásticas e condroblásticas apresentam incidências semelhantes (Bacci, et al. 2005) seguido pelo diagnóstico de subtipos raros, como telangiectásico. O subtipo histológico não tem impacto no prognóstico embora o tamanho da coorte pode ser limitante para muitos dos subtipos (Weiss, et al. 2007).

TRATAMENTO DOS PACIENTES COM OSTEOSSARCOMA

Os pacientes com osteossarcoma localizados em extremidades são tratados com cirurgia, quimioterapia sistêmica e/ou radioterapia resultando em sobrevida livre de eventos em três anos de 60 a 70% (Bielack, et al. 2002). Aproximadamente, 15-20% dos pacientes com OS apresentam metástases ao diagnóstico, detectadas por exames radiológicos e, adicionalmente em torno de 40% evoluirão com metástase em fases posteriores durante o tratamento (Bielack, et al. 2002; Harting, et al. 2006). Os sítios metastáticos da doença comumente apresentam resistência ao tratamento, resultando em uma baixa taxa de sobrevida do paciente, em torno de 20% em cinco anos (Bacci, et al. 2008; Bielack, et al. 2002). O tratamento curativo para os pacientes com osteossarcoma metastático é idêntico ao tratamento da doença localizada, com utilização combinada de quimioterapia em altas doses, ressecção da lesão primária e de todos os sítios metastáticos da doença, geralmente por toracotomia exploratória com apalpação de todo pulmão.

Antes da inclusão da quimioterapia, o tratamento dependia majoritariamente da ressecção cirúrgica, com sobrevida menor de 20% em 5 anos (Friedman, Carter, 1972; Bacci et al, 1997; Marina et al, 2004). Nos anos de 1970, foram incluídos agentes quimioterápicos melhorando significativamente o prognóstico. Posteriormente também foram desenvolvidos quimioterápicos neo-adjuvantes e, no final da década de 80, houve uma melhora significativa na sobrevida graças à junção da quimioterapia à ressecção cirúrgica. Porém, deste momento até a atualidade, poucos avanços foram feitos (Miser et al, 1987; Saylor et al, 2001; Goorin et al, 2002; Van Winkle et al, 2005; Le Deley et al, 2006; Maki et al, 2007; Navid et al, 2008; Berger et al, 2009; Anderson

et al, 2014; Subbiah et al, 2014; Grignani et al, 2015). Como resultado desta baixa evolução dos tratamentos nas últimas três décadas, o prognóstico é insatisfatório em pacientes com a doença metastática, recorrente ou irresssecável (Miwa et al, 2019). Atualmente, baseia-se principalmente no uso de adriamicina, cisplatina (DDP), metotrexato (MTX), ifosfamida (IFO), epirrubicina (EPI), entre outras drogas. As taxas de sobrevida parecem ter se estabilizado mesmo com quimioterapia combinada devido às limitações impostas por complicações e toxicidade. Destaca-se, com alta toxicidade e grande variabilidade de reações de indivíduo para indivíduo, o MTX de alta dose (HD-MTX) (Zhang et al, 2018).

ALTERAÇÕES MOLECULARES NO OSTEOSSARCOMA

O genoma de osteossarcoma normalmente apresenta numerosas alterações genéticas com alta taxa de variação estrutural e molecular que podem estar associadas à sua patogênese. Pode-se considerar que o osteossarcoma se origina de um erro durante a diferenciação do osteoblasto uma vez que diversos genes regulatórios, envolvidos no controle da diferenciação destas células são silenciados ou têm sua expressão desregulada (Haydon et al, 2007), o que pode ser consequência de alterações genéticas e/ou epigenéticas que ocorrem nas células pluripotentes mesenquimais (Kresse et al, 2012). A descoberta dessas alterações veio de estudos em síndromes de predisposição genética, modelos animais de osteossarcoma, fatores etiológico-ambientais e a abordagem direta destes tipos de tumores (Marina, et al. 2004).

SÍNDROMES ASSOCIADOS COM O AUMENTO DE RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE OSTEOSSARCOMA

Diversas síndromes de câncer hereditário aumentam o risco para o desenvolvimento de osteossarcoma, como a síndrome de Li-Fraumeni, síndrome do retinoblastoma hereditário e síndrome de Rothmund-Thomson, que apresentam alterações em *TP53*, *RB1* e *RECQL4*, respectivamente. Outras condições mais raras incluem síndrome de Bloom, síndrome de Werner e a anemia de Diamond-Blackfan (Hameed, Mandelker, 2018).

A síndrome de Li-Fraumeni é ocasionada por mutações germinativas em *TP53* com padrão de herança autossômico dominante, que resultam em aumento à susceptibilidade dos indivíduos a desenvolverem diversos tipos de cânceres, incluindo osteossarcoma. No sul do Brasil, a mutação *TP53* R337H é encontrada em até 0,3% da população, sendo encontrada em 7% dos pacientes com osteossarcoma (Seindinger et al, 2011).

Mutações germinativas em *RB1* são associadas à síndrome do retinoblastoma hereditário, com padrão de herança autossômica dominante, resultando em risco

aumentado para o desenvolvimento de retinoblastoma além de sarcomas de osso e de tecidos moles (Kleinerman et al, 2012).

A síndrome de Werner é uma desordem autossômica recessiva também conhecida como progéria, associada com mutações em *WRN*. Os pacientes têm susceptibilidade aumentada para diversos cânceres, incluindo osteossarcoma (Hameed, Mandelker, 2018).

A síndrome de Rothmund-Thomson, uma síndrome autossômica recessiva, é resultante de mutações germinativas em *RECQL4*. É caracterizada clinicamente por uma erupção cutânea entre os 3 e 6 meses de idade e, além de alterações em pele, cabelo, dentes e esqueléticas, sendo que até 32% dos pacientes desenvolvem osteossarcoma. Até o momento, mutações em *RECQL4* não foram observados em casos esporádicos de osteossarcoma (Hameed, Mandelker, 2018).

A síndrome de Bloom também é uma desordem autossômica recessiva, caracterizada por estatura baixa, sensibilidade à exposição solar e pouca gordura subcutânea. Foi associada a mutações em *BLM*, que também aumenta o risco para outros tumores, além do osteossarcoma (Hameed, Mandelker, 2018).

ALTERAÇÕES GENÉTICAS SOMÁTICAS NO OSTEOSSARCOMA

Além de aumentarem a incidência de osteossarcoma em indivíduos que carregam alterações germinativas, *RB1* e *TP53* também são alterados apenas no tumor (mutações somáticas), sendo encontrados em 3% e 22% respectivamente, dos casos analisados (Perry et al,2014). Outras alterações mais frequentes incluem a amplificação de *MDM2* (3%) e a super-expressão de *ERBB2* (30%) (Valabrega, et al, 2003; Marina et al., 2004; Broadhead et al. 2011; Chen et al 2017). Mutações em *ATRX*, *DLG2*, *TWIST*, *MAPK7* e *MMP9* também são consideradas recorrentes nos osteossarcomas (**Tabela 1**) (Bjorlan et al, 2005; Entz-Werle et al, 2007; Tesser-Gamba et al, 2012; Perry et al,2014; Chen et al, 2014).

TP53 está localizado em 17p13.1 e codifica para uma proteína supressora de tumor (P53) com domínios de ativação transcricional, ligação ao DNA e oligomerização. *TP53* é expresso em resposta a diversos fatores de estresse celular, com a finalidade de regular genes que induzem a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou mudanças no metabolismo celular. Na ausência de estímulos de estresse celular, P53 é mantida inativada, essencialmente pela ação da ubiquitina ligase *MDM2*. A atividade da P53 é perdida na grande maioria dos cânceres humanos (~80%), devido a mutações, deleção do *locus* e pela perda da sinalização celular *downstream* ao gene (Toledo and Wahl, 2006; Bourdon, 2007; Vousden, Lane, 2007). Em osteossarcoma, a maioria das mutações em *TP53* são resultantes de rearranjos com quebra de DNA no primeiro íntron do gene (Ribi, et al. 2015), que é uma região particularmente instável e sensível a alterações estruturais resultando na inativação do gene (Chen, et al. 2014).

RB1, o primeiro gene supressor de tumor descrito, está localizado em 13q14.2 e codifica para a proteína RB1. É um regulador negativo do ciclo celular além de ter uma função relacionada com a estabilização da heterocromatina. *RB1* atua impedindo a transição da célula em fase G1 para a fase S do ciclo celular, reprimindo membros da família *E2F* de fatores de transcrição ligantes de DNA. Em seu estado hipofosforilado, *RB1* é capaz de formar um complexo com *E2F*, bloqueando seu domínio de ativação em regiões promotoras ou inibir ativante a transcrição de genes. Quando fosforilado, a função supressora de *RB1* é perdida (Giacinti, Giordano, 2006; Dick, Rubin, 2013).

MDM2, localizado em 12q15, é um proto-oncogene que codifica para uma ubiquitina E3, com função de marcar proteínas para degradação. *MDM2* interage com *P53* apresentando uma função regulatória de *feedback* negativo, ou seja, *P53* estimula a síntese de *MDM2* ao passo que *MDM2* inibe a transcrição de *P53*. Em osteossarcomas, e outros tipos de câncer, *MDM2* é superexpressa, resultando na degradação de *P53*, e portanto, permitindo o prosseguimento do ciclo celular (Katz et al, 2018).

ERBB2, localizado em 17q12, codifica para HER2, um receptor da família de tirosina quinases, que atua na ativação da via de sinalização celular fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K). Dentre outros tumores, *ERBB2* é encontrado super-expresso em 30% dos casos de osteossarcoma, o que abre a possibilidade de ser usado como alvo terapêutico, tornando-se, portanto, um marcador de bom prognóstico (Valabrega, et al, 2003).

GENE	FUNÇÃO	PREVALÊNCIA EM OSTEOSARCOMAS PRIMARIOS	TIPO DE ALTERAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>RB1</i>	Supressor de tumor, regulador negativo do ciclo celular	61%	DELEÇÃO	Perry et al, 2014.
<i>TP53</i>	Supressor de tumor, induz a parada do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA	22%	MUTAÇÃO PONTUAL	Perry et al, 2014.
<i>ATRX</i>	Remodelação da cromatina	29%	MUTAÇÃO PONTUAL	Chen et al, 2014.
<i>DLG2</i>	Receptor de membrana que age nos sítios pós sinápticos	52%	MUTAÇÃO PONTUAL	Chen et al, 2014.
<i>TWIST</i>	Supressor de tumor, codifica um fator de transcrição envolvido com a determinação da linhagem e diferenciação celulares	36,50%	DELEÇÃO	Entz-Werle et al, 2007.
<i>MDM2</i>	Oncogene, ubiquitina E3, que marca outras proteínas para degradação	3%	AMPLIFICAÇÃO	Chen et al, 2014.
<i>MAPK7</i>	Regulador positivo da proliferação celular	86%	SUPER-EXPRESSÃO	Tesser-Gamba et al, 2012.

<i>MMP9</i>	Metaloprotease envolvida na quebra da matriz celular, possibilitando remodelação tecidual	25%	SUPER-EXPRESSION	Bjorlan et al, 2005.
-------------	---	-----	------------------	----------------------

Tabela 1 – Alterações recorrentes em osteossarcoma

Os osteossarcomas apresentam cariótipos complexos com numerosas aberrações genômicas sendo as mais comuns, o ganho do cromossomo 1 e as perdas dos cromossomos 2, 6, 8, 9, 10, 13 e 17 (Bridge and Neff 1997; Squire, et al. 003) além de rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos 1, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 17, 19 e 22 (Baruffi, et al. 2003; Kresse, et al. 2010; Smida, et al. 2010; Yen, et al. 2009). Esses dados sugerem que a instabilidade genômica é frequente e importante para o desenvolvimento do OS e que provavelmente envolve vias associadas com a manutenção da integridade do genoma. Entretanto, estas alterações podem estar mais associadas com a progressão e aquisição de resistência aos tratamentos do que com a transformação das células.

Adicionalmente, um estudo de sequenciamento do genoma completo identificou a ocorrência do mecanismo conhecido como *chromotripsis* em 33% dos casos de OS comparado a uma taxa de 2-3% no desenvolvimento em outras neoplasias. Neste cenário, um ou mais cromossomos ou regiões cromossômicas se quebram em dezenas ou centenas de fragmentos. Alguns destes fragmentos são ligados novamente pela maquinaria de reparo de DNA (via NHEJ) de forma aparentemente randômica, gerando numerosos rearranjos cromossômicos, incluindo como ampliações e deleções, resultando em uma estrutura genômica complexa (Stephens, et al. 2011).

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM OSTEOSSARCOMAS

Muitos estudos têm explorado alterações na metilação do DNA como biomarcadores para detecção precoce de doenças, ferramentas alternativas para classificação tumoral, biomarcadores preditivos da resposta ao tratamento ou alvos na terapias anti-câncer. A detecção de genes aberrantemente metilados ao longo do genoma pode auxiliar a entender a biologia envolvida com a transformação celular além de indicar possíveis candidatos a marcadores prognósticos ou terapêuticos. A EuroBoneT (*European Network of Excellence on bone tumours*) avaliou as alterações genômicas e o perfil de metilação de 19 linhagens celulares de osteossarcoma, normalmente usadas para estudos desses tumores. Ganho de 6p, 8q e 17 e perda de 13q foram as alterações mais frequentes (>50% das linhagens) assim como um maior número de genes hiper-metilados em relação aos hipo-metilados, comparados a osteoblastos normais (Kresse et al 2012), similar a outros tumores.

Embora as alterações mais prevalentes ocorram por mecanismos genéticos, alguns estudos já mostraram que intermediários das vias com as quais *TP53* e do *RB1* estão envolvidos têm alterações de metilação nos promotores. Um exemplo é o

locus ARF/INK4a, que codifica para *P14* e *P16*. *P14* inibe MDM2, permitindo que *P53* atue interrompendo o ciclo celular em G1 e G2. Já *P16* inibe a fosforilação de *RB1* interrompendo o ciclo celular em G0 e G1 (Park et al, 2002).

Outro tipo de alteração epigenética são as modificações de histonas, relacionadas com a manutenção da estrutura do DNA. Um exemplo deste tipo de alteração é a remoção do grupo acetila do resíduo lisina da porção N-terminal das histonas pelas enzimas desacetilases, o que reduz a afinidade da ligação com o DNA, permitindo o acesso de fatores de transcrição para ativar a expressão gênica (West, Johnstone, 2014). Em osteossarcoma, o aumento de expressão da desacetilase de lisina 1 (*LSD1*) foi proposta como alvo para tratamento com um inibidor deste gene (Shi, 2007; Tsai, 2008; Calo, et al, 2010; Bennani-Baiti et al, 2012)

A expressão de RNAs não codificantes (ncRNA, *non-coding RNA*) também foram descritas como alteradas em osteossarcomas, podendo estar relacionada com o prognóstico. Os ncRNAs longos (lncRNAs) são normalmente transcritos pela RNA polimerase II seguido por poliadenilação, resultando em um fragmento maior que 200 nucleotídeos. Formam complexos com os ribossomos, participando assim de tradução de outros genes (revisado por Sun, Kraus et al 2015). *LOC285194* foi apontado recentemente como um lncRNA com função de supressor de tumor em osteossarcoma, apesar de a sua função ainda não ter sido esclarecida (LI et al, 2016). A expressão elevada de *HULK* nos tumores, associado com invasão celular e formação de metástases, foi associada a um pior prognóstico dos pacientes (Uzan et al. 2016)

De forma geral, podemos concluir que os osteossarcomas são tumores que apresentam um grande número de alterações, que podem estar relacionadas com a variação da resposta destes tumores aos tratamentos. A busca de novas abordagens terapêuticas deve levar em considerações a complexidade das alterações moleculares dos osteossarcomas, direcionando o tratamento dos pacientes para uma medicina mais personalizada.

REFERÊNCIAS

ANDERSON P. M. SUBBIAH V. ROHREN E. **Bone-seeking radiopharmaceuticals as targeted agents of osteosarcoma**: Samarium-153-EDTMP and radium-223. *Adv Exp Med Biol*. 2014;804:291–304.

BACCI G. et al. **Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation**. Results of treatment of 23 patients with chemotherapy followed by simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *Cancer*. 1997;79:245–254.

BARUFFI M. R. et al. **Chromosomal imbalances detected in primary bone tumors by comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization**. *Genetics and Molecular Biology*. 2003 26(2) 107-113.

BENNANI-BAITI I.M. et al. Lysine-specific demethylase 1 (*LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110*) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*. 2012;43(8):1300–7.

- BERGER M. et al. **Phase 2 trial of two courses of cyclophosphamide and etoposide for relapsed high-risk osteosarcoma patients.** *Cancer*. 2009;115:2980–2987.
- BIELACK S. S., KEMPF-BIELACK B., DELLING G. **Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols.** *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(3):776–790. doi: 10.1200/JCO.20.3.776.
- Bourdon JC. **p53 and its isoforms in cancer.** *Br J Cancer*. 2007 Aug 6;97(3):277-82.
- BRIDGE J.A. et al. **Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature.** *Cancer Genet Cytogenet*. 1997 May;95(1):74-87.
- BROADHEAD M.L. **The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review.** *Sarcoma*. 2011 Apr 2011: 959248.
- CALO E. et al. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature*. 2010;466(7310):1110–4.
- CHEN X. et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep*. 2014 Apr 10;7(1):104-12.
- DICK F.A. RUBIN S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14 : 297- 306.
- FRIEDMAN JM, JONES PA. **MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease.** *Swiss Med Wkly*. 2009; 139: 466-72.
- FRIEDMAN M. A. CARTER S. K. **The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future.** *J Surg Oncol*. 1972; 4(5):482-510.
- GIACINTI C. GIORDANO A. **RB and cell cycle progression.** *Oncogene*. 2006; 25 : 5220-5227.
- GOORIN A.M. et al. **Phase II/III trial of etoposide and high-dose ifosfamide in newly diagnosed metastatic osteosarcoma: A pediatric oncology group trial.** *J Clin Oncol*. 2002;20:426–433.
- GRIGNANI G. et al. **Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progression after standard treatment: A non-randomised phase 2 clinical trial.** *Lancet Oncol*. 2015;16:90–107.
- UNNI K.K. **Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 11,087 cases. 5. Philadelphia:** Lippincott-Raven; 1996. pp. 143–183.
- GRIMSON A. et al. **MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.** *Cell Mol*. 2007; 27 : 91–105.
- HAMEED M, MANDELKER D. **Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma.** *Adv Anat Pathol*. 2018 Jul;25(4):217-222
- HARRISON, D.J. et al., 2017. **Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma.** *Expert Review of Anticancer Therapy*. 18(1), p.39–50.
- HAYDON RC, LUU HH, HE TC. **Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis.** *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Jan; 454: 237-46.
- HUANG K. L. et al. **Clinical outcomes and prognostic factors of Ewing sarcoma: a clinical analysis of 12 patients in Taiwan.** *J Chin Med Assoc*. 2012 Jan; 75(1):16-20.
- ISAKOFF M.S. et al. **Current treatment and a collaborative pathway to success.** *J Clin Oncol*. 2015;33:3029–3035.
- JO V. Y., FLETCHER C. D. M. **WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition.** *Pathology*. 2014;46(2):95–104.

- KATZ C. et al. **Wild-type and cancer-related p53 proteins are preferentially degraded by MDM2 as dimers rather than tetramers.** *Genes Dev.* 2018 Mar 1; 32(5-6): 430–447.
- KLEINERMAN R. A. et al. Sarcomas in hereditary retinoblastoma. *Clin Sarcoma Res.* 2012 Oct 4; 2: 15.
- KRESSE S.H. et al. **Integrative analysis reveals relationships of genetic and epigenetic alterations in osteosarcoma.** *PLoS One.* 2012;7(11):e48262
- LE DELEY M.C. et al. **SFOP OS94: A randomized trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients.** *Eur J Cancer.* 2007;43:752–761.
- LI Z, YU X, SHEN J. **Long non-coding RNAs: emerging players in osteosarcoma.** *Tumour Biol.* 2016 Mar;37(3):2811-6.
- MAKI R.G. et al. **Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcoma: Results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002.** *J Clin Oncol.* 2007;25:2755–2763.
- MARINA N. et al. **Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma.** *Oncologist.* 2004;9:422–441.
- MISER J.S. et al. **Ifosfomide with mesna uroprotection and etoposide: An effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults.** *J Clin Oncol.* 1987;5:1191–1198.
- MIWA, S. et al., 2019. **Current and Emerging Targets in Immunotherapy for Osteosarcoma.** *Journal of Oncology*, 2019, pp.1–8.
- MOHSENY, A.B. et al. **Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2.** *J Pathol.* 2009 Nov; 219(3):294-305.
- NAVID F. et al. **Combination of gemcitabine and docetaxel in the treatment of children and young adults with refractory bone sarcoma.** *Cancer.* 2008;113:419–425.
- OTOUKESH, B. et al., 2018. **Novel molecular insights and new therapeutic strategies in osteosarcoma.** *Cancer Cell International*, 18(1).
- PARK Y.B. **Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines.** *Cancer Genet Cytogenet.* 2002 Mar;133(2):105-11.
- PERRY J.A. et al. Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 23;111(51):E5564-73
- RAYMOND A.K. **Conventional OS.** Lyon: IARC Press; 2002.
- REN L. et al. **Characterization of the metastatic phenotype of a panel of established osteosarcoma cells.** *Oncotarget.* 2015 Oct 6; 6(30):29469-81.
- RIBI S. et al. **TP53 intron 1 hotspot rearrangements are specific to sporadic osteosarcoma and can cause Li-Fraumeni syndrome.** *Oncotarget.* 2015 Apr 10;6(10):7727-40.
- ROSENBERG, A.E. et al. **WHO classification of tumours of soft tissue and bone.** 4. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013. pp. 282–288.
- SAYLORS R. L. **Pediatric Oncology Group Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: A pediatric oncology group phase II study.** *J Clin oncol.* 2001;19:3463–3469.
- SEIDINGER, A.L. et al. **Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil.** *Cancer.* 2011 May 15;117(10):2228-35.

- SHI Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2007;8(11):829–33.
- SMIDA J. et al. Genomic Alterations and Allelic Imbalances Are Strong Prognostic Predictors in Osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2010 Jul 16(16):4256-4267.
- SQUIRE J.A. et al. **High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays.** *Genes Chromosomes & Cancer.* 2003; 38(3):215-225.
- STEPHENS P.J. et al. **Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development.** *Cell.* 2011 Jan 7;144(1):27-40.
- SUBBIAH V. et al. **Phase 1 dose escalation trial of intravenous radium 223 dichloride alpha-particle therapy in osteosarcoma.** *J Clin Oncol.* 2014;32(15-Suppl) Abstract TPS 10600.
- TANG N. et al. **Osteosarcoma development and stem cell differentiation.** *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Sep; 466(9):2114-30
- TSAI W.W. et al. p53-targeted LSD1 functions in repression of chromatin structure and transcription in vivo. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5139–46.
- UZAN V.R. **High Expression of HULC Is Associated with Poor Prognosis in Osteosarcoma Patients.** *PLoS One.* 2016 Jun 2;11(6):e0156774.
- VALABREGA G. **ErbB2 and bone sialoprotein as markers for metastatic osteosarcoma cells.** *Br J Cancer.* 2003 Feb 10; 88(3): 396–400.
- VAN WINKLE P. et al. **Ifosfamide, carboplatin, and etoposide (ICE) reinduction chemotherapy in a large cohort of children and adolescents with recurrent/refractory sarcoma: The children's cancer group (CCG) experience.** *Pediatr Blood Cancer.* 2005;44:338–347.
- WEST AC, JOHNSTONE RW. **New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment.** *J Clin Invest.* 2014 Jan;124(1):30-9.
- YAN G.N., LV Y.F., GUO Q.N. **Advances in OS stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets.** *Cancer Lett.* 2016;370(2):268–274.
- ZHANG, Y. et al., 2018. **Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma (Review).** *Oncology Letters.*

PHYLOGENETIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF A CELLULASE PRODUCING BACILLUS SP. STRAIN BY 16S RRNA SEQUENCING

Yago Queiroz dos Santos

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Anderson Felipe Jácome de França

Multicampi School of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil.

Bruno Oliveira de Veras

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Gabriella Silva Campos Carelli

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Geovanna Maria Medeiros Moura

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Joelton Igor Oliveira da Cruz

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Fernanda Granja da Silva Oliveira

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

João Ricardhis Saturnino de Oliveira

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Luciclaudio Cassimiro de Amorim

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Elizeu Antunes dos Santos

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

ABSTRACT: The microorganisms belonging to genus *Bacillus* include a wide spectra and ubiquitous group of bacteria that can be found from the forest soil, to marine ecosystems occurring in association with a variety of aquatic organisms such as scleractinian corals present in the intertidal boulders. Therefore, these microorganisms are exposed to various abiotic stresses that cause ecological selection for a physiologically adapted microbiota to such extremes of temperature and salinity. In this work, we isolated and characterized a cellulase from a marine bacterial strain and indentified its specie by 16S rRNA sequencing followed by a BLAST analysis. The cellulolytic strain called SR22 showed to be a gram-positive spore-forming bacilli, facultative anaerobe, and catalase positive, as well as negative for indole, H₂S production, and citrate utilization; those findings led us to consider the isolate

belonging to the genus *Bacillus*, which was confirmed by the phylogenetic analysis, which revealed that the SR22 strain formed a clade with *Bacillus subtilis*. Its nucleotide sequence was deposited in GenBank as Accession No. MH119099 and the degree of sequence similarity of strain SR22 to *Bacillus* sp. was 99%. Taken together, the present data indicate the present cellulase-positive identified strain as a potential and useful candidate for industrial applications that employs cellulase degrading processes like second-generation bioethanol and paper industries being still necessary further studies to complete characterize this microorganism secretome.

KEYWORDS: Endoglucanase, Marine bacteria, rRNA

INTRODUCTION

Microorganisms are present in the most diverse ecosystems, from the terrestrial to the aquatic, besides performing terminal functions on biogeochemical cycles underneath and above the surface of mineral and living beings. The main way of bacterial interaction with the environment involves the production of chemical substances like enzymes, which act mainly as biological barriers against the growth of other microorganisms (Kazeem *et al.*, 2017).

According to Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 2007) the marine environment includes a mega diversity of microorganisms that constitute a complex and intricate system of these ecological relations with the other biota elements and represent an important source of biomolecules, but it's still poorly explored comparing to others habitats, and their microorganisms are still to be described. As a consequence, natural microbial products are promising sources for the bioprospecting of new molecules with potential applications in medicine (pharmaceuticals), agriculture (agrochemicals) and in biological processes (chemical biology) studies (Prakash *et al.*, 2014).

The earliest research on the marine ecosystem and its ecological diversity began in the middle of the last century, gaining more visibility in the present day. Introducing itself as a hostile environment of particular characteristics, the marine ecosystem harbours different ecological niches that produce particular macromolecules in response to variations in this environment of pH, temperature, pressure and salinity. Approximately 30.000 macromolecules isolated from these niches have already been discovered and catalogued, however, these data correspond to only 5% of the studied sources of this ecosystem, where only a few are explored and validated (Indraningrat, Smidt e Sipkema, 2016; Ye *et al.*, 2015).

Currently recognized as the "Cradle "The seas and oceans represent an important source with potential for application in the cosmetic, nutritional, agrochemical and therapeutic industries, especially in the attempt to obtain and elucidate the anticancer properties of these compounds. By the end of the 1990s the number of molecules discovered was approximately 500 per year. Currently 28.175 chemical classes with hundreds of new compounds are discovered annually. Although increasing the number

of researches for discoveries of new marine compounds this ecosystem is little explored.

Different aspects are considered in the study of products from marine species, such as chemical diversity found from different ecological niches, function in nature and strategies for preclinical or clinical use. The first proposal of an anticancer compound was approved in 1969, known and applied nowadays the Citarabina or Ara-C, was developed to be a synthetic analogue of nucleoside C found in species of sea sponges, *Tethya crypta*. After this first proposal new molecules, from different marine niches, were launched, such as Trabectedina from tunicate *Ecteinascidia turbinata*, Eribulin from the metabolite produced by marine sponges *Halichondria okadai* and Ziconotide with analgesic function obtained from studies in *Conus magus* (Verma *et al.*, 2007).

The discovery of novel bioactive marine natural products (MNPs) is based on a sequence of methods under the organism to be worked through the process of isolation, extraction, characterization and purification of the molecule of interest. Although many methods still employed are considered standard in the identification of new molecules some cultivate the problematic of low efficiency, costly and that demand of spaced times to obtain satisfactory results. The process of isolation of microorganisms that have a symbiosis relationship with marine eukaryotic organisms has been one of the major problems present during the process of obtaining molecules from these agents, such as some bacteria of the genus *Prochlorococcus* that present a compromised growth in synthetic media, due to the absence of heterotrophic bacteria in co-cultures. Techniques that employ concepts of genomics, metagenomics, proteomics, bioinformatics, expression systems have been used as alternative ways to discover and obtain bioactive molecules from marine organisms (Batool *et al.*, 2016; Dustan, 1973).

Enzymes are great biological catalysts that plays unique role on accelerating the speed of chemical reactions being essential for the maintenance for the homeostasis of biological systems which, when under uncatalyzed conditions, would take so long to happen that they would make the structuring of complex organisms thermodynamically unfeasible. In addition to forming the basis of metabolic systems, enzymes provide enormous opportunities for industries to perform biocatalytic conversions with high yield and reliability (Adrio e Demain, 2014).

Hydrolytic enzymes are widely used in different processes in major industries such as pharmaceuticals, textiles, detergents, food and biofuels, employing different classes of enzymes such as proteases, pectinases, lipases, cellulases (Santos, Dos *et al.*, 2018; Veras, Queiroz, Gomes, *et al.*, 2018). In a field so required by new bioactive molecules, microorganisms belonging to new environments are emerging as potential sources for new research and industry employment of brand-new molecules due the metabolic versatility and stability in extreme environmental conditions (temperature, salinity and so on) where these organisms inhabit. Thus, the present work seeks mainly to isolate bacterial strains from marine organisms present in the coastal Northeast region of Brazil in order to characterize and purify enzymes synthesized by these microbes,

with potential biotechnological applications (Veras, Queiroz, Diniz, *et al.*, 2018).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of bacteria

The bacterial isolates were from aseptically collected tissues from *Siderastrea stellata* colonies (Verrill, 1868) on the coral reefs of Cabo Branco-Paraíba, Brazil (7°08'50"S, 34° 47'51"W), being removed according to Dustan methodology (Dustan, 1973). For bacterial isolation, tissues from the ecto and mesoderm of the Anthozoa were suspended in sterile saline solution, then inoculated into culture medium Sea Agar (5.0 g/L⁻¹ peptone, 0.1 g/L⁻¹ extract yeast, 15.0 g/L⁻¹ agar) and incubated at 55°C until adequate growth. The strains were grown for 48 h at 40 °C on pH 7.0 in carboxymethylcellulose (CMC) agar plates (containing 0.1%, CMC; 0.05%, NaNO₃; 0.1%, K₂HPO₄; 0.05%, MgSO₄·7H₂O; 0.001% FeSO₄·7H₂O; 0.1% Yeast extract; 1.5% agar) and then overlaid with 0.1% congo-red solution for 30 min and washed with 1 M NaCl for equal time as well as stained with 0.2% potassium iodine for 5 min, bacterial colonies showing clear zones were considered to be cellulase producers and selected for agro-waste degradation experiments. (Kasana *et al.*, 2008).

BACTERIAL MOLECULAR IDENTIFICATION

In order to identify the cellulase producer isolates, 16S rRNA gene sequence was amplified from extracted DNA. Bacterial universal primers 26F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG) and 1492R (5' -ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') were used to amplify the 16S rDNA gene by Polymerase Chain Reaction (PCR) performed in MWG-Biotech Primus 96 Plus Thermal Cycler (Primus, USA). Each reaction mixture (50 µL) contained reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1U of DNA polymerase and 40 ng of genomic DNA. The amplification products were directly purified from the PCR reaction using the Wizard® SV Genomic DNA Purification System. The purified reactions were sequenced using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems, USA).

PHYLOGENETIC ANALYSIS

The obtained 16S rRNA gene sequence for isolates was compared to deposited sequences in the GenBank database (NCBI). For the local alignment, BLASTn tool (NCBI) was used. MEGA 7.0 software was used for multiple sequence monitoring and for the construction of a dendrogram by the Neighbour-Joining method (Hogg e Lehane, 1999; Mahajan *et al.*, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial strains associated with coral tissues were obtained from the collection

of corals in works prior to this study and deposited in stock in the marine Agar culture medium (composed of filtered sea water from the study region, 0, 5% Peptone (Difco), 0.1% Yeast Extract (Difco) and 1.5% Agar).

Bacterial isolates from corals presenting different health conditions were divided into two groups named “SS” and “SR” plus an individualized numbering for each isolate strain. The isolates from coral samples affected by the depigmentation received the SR code with a numbering associated with each strain. In total, 29 SS strains and 40 SR strains coral were isolated.

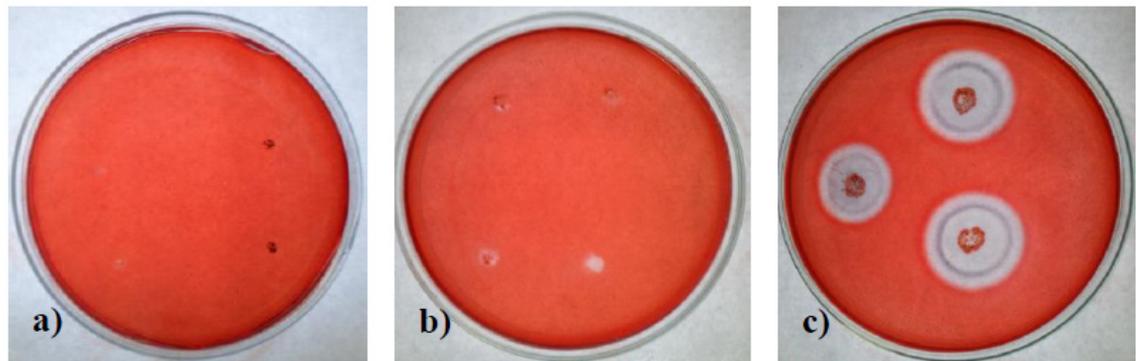


Figure 1. Aspects of the cellulolytic activity test: a) negative result (there is no halo formation); b) positive result demonstrating degradation of the substrate around the colony (although not significant for prospecting purposes; c) positive result with evident halo of more than 3 cm of diameter.

Among the bacteria of the SS lineage listed, three presented considerable cellulolytic activity while the others formed only a faint halo evidencing activity, often restricted only to the colony area; the proteolytic activity (data not shown) was more widely observed with five strains showing conspicuous activity while five others also exhibited the formation of considerable degradation halos of the protein substrate, in addition to the other strains where the degradation was restricted to the colony region.

In the SR line, seven presented intense cellulolytic activity with the others presenting activity only in the region of the colony; in relation to the proteolytic activity (data not shown), five strains had a significant halo of degradation while nine presented a positive result, although attenuated when compared to the other five strains. For classification purposes, lineages that produced degradation halos with diameters greater than 1 cm were considered as a significant positive activity, being considered as high activity the halos with diameters of approximately three centimeters or higher (Figure 1).

Among SR isolates, one strain showed to be a gram-positive spore-forming bacilli, facultative anaerobe, and catalase positive, as well as negative for indole, H₂S production, and citrate utilization. The same morphological characteristics were found by previous studies with cellulolytic *Bacillus* sp. strains Rastogi et al. (2010 e Rawat; Tewari (2012) e Srivastava et al. (2018) Bacteroidetes, Chloroflexi, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, and Proteobacteria were identified. Eight isolates capable of

degrading cellulose, carboxymethyl cellulose (CMC).

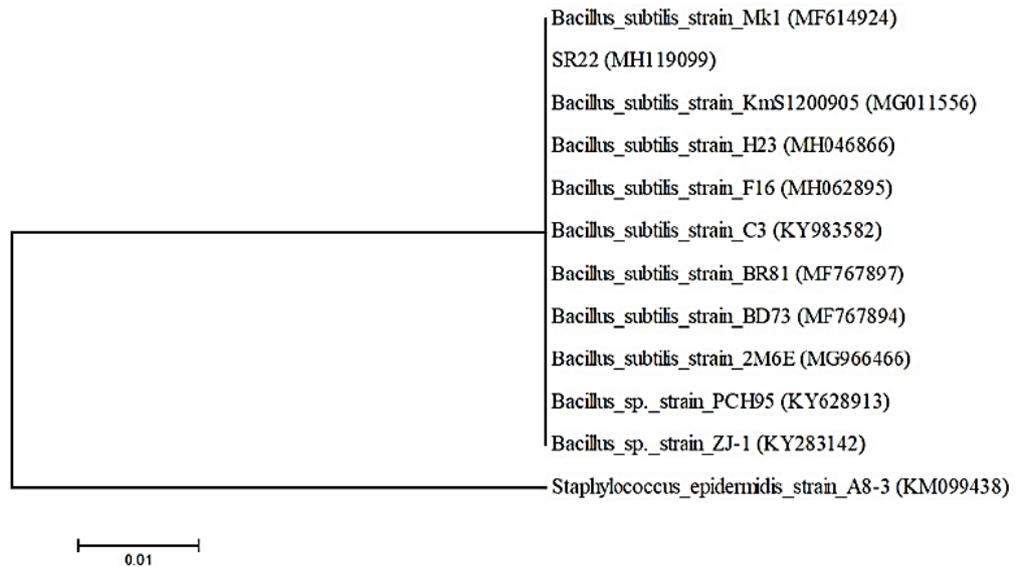


Figure 2. Phylogenetic tree of SR isolate labelled as “22” and other related species based on 16S rDNA sequences, constructed using the Neighbour-Joining principle. The scale bar represents 0.01 substitutions per site. The evolutionary distances were computed using the Kimura two-parameter method. Bootstrap values are indicated at the branches from 1.000 replications. GenBank accession numbers of the sequences are given in parentheses.

Those findings led us to consider the isolate belonging to the genus *Bacillus*, which was confirmed by the phylogenetic analysis, which revealed since the strain formed a clade with *Bacillus subtilis* sequences (Figure 2). Its nucleotide sequence was deposited in GenBank as Accession No. MH119099 and the degree of sequence similarity of strain was 99%.

CONCLUSIONS

Besides the expression of extracellular enzymes, the secretion of bactericidal compounds by microorganisms competing for the same ecological niche with other prokaryotes is also responsible for modulating a large part of the structure of the associated microbiota, changes in the environmental and physiological conditions of the host can be decisive events triggering succession, where the antagonistic strains to a certain pathogen is eliminated allowing the colonization of hosts.

When subjected to a new temperature condition, corals are therefore suffering from the phenomenon of ecological succession due to the decrease in the fitness of their microbiota associated with the concomitant elevation of competition for adhesion sites and virulence in the case of some pathogens.

This process leads to an insertion of other microorganisms into the coral microbiota, causing an increase in diversity and destabilizing the mutual equilibrium between prokaryotes and the host, which in turn becomes even more susceptible due to the aggression of the pathogens now present and the development of virulence

in previously non-pathogenic strains of stressors that culminate in further favoring the succession of the original microorganisms leading to a vicious circle capable of chronically compromising coral homeostasis leading to a qualitative deficit in the mutualistic association between coral and a photobiont component of the association that is very often algae of the genus *Symbiodinium* (commonly referred to as zooxanthellae) causing bleaching (Rosenberg *et al.*, 2007).

REFERENCES

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, p. 117–139, 2014.

BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 7 mar. 2016.

DUSTAN, P. Distribution of zooxanthellae and photosynthetic chloroplast pigments of the reef-building coral *Montastrea*. **Bulletin of Marine Science**, v. 29, n. 1, p. 79–95, 1973.

HOGG, J. C.; LEHANE, M. J. Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4227–9, set. 1999.

INDRANINGRAT, A. A. G.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 1–66, 2016.

KASANA, R. C. *et al.* A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, 2008.

KAZEEM, M. O. *et al.* Prospecting Agro-waste Cocktail: Supplementation for Cellulase Production by a Newly Isolated Thermophilic *B. licheniformis* 2D55. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1318–1340, 2017.

MAHAJAN, R. V. *et al.* A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 2, p. 122–126, 2013.

PRAKASH, S. *et al.* Optimization and partial purification of a protease produced by selected bacterial strains grown on trash fish meal substrate and its antagonistic property against bacterial pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 288–295, 2014.

RASTOGI, G. *et al.* Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8798–8806, 2010.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. **Extremophiles**, v. 16, n. 4, p. 637–644, 2012.

ROSENBERG, E. *et al.* The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 355–362, 26 maio 2007.

SANTOS, Y. Q. DOS *et al.* A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine *Bacillus* sp. Strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 1078–1085, 2018.

SRIVASTAVA, A. *et al.* Screening of biologically active microbial strains having therapeutic

applications. **Indian journal of experimental biology**, v. 56, n. April, p. 244–251, 2018.

VERAS, B. O. DE; QUEIROZ, Y.; GOMES, A.; *et al.* Production of Antileukemic Enzyme L-asparaginase from Marine Bacteria Associated. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 12, n. 11, p. 87–91, 2018.

VERAS, B. O. DE; QUEIROZ, Y.; DINIZ, K. M.; *et al.* Screening of protease , cellulase , amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain. **F1000Research**, n. 0, p. 1–7, 2018.

VERMA, N. *et al.* L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

YE, J. *et al.* Anticancer agents from marine sponges. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 1, p. 64–88, 2015.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DOENÇAS HUMANAS NA ERA DA BIOINFORMÁTICA

Kleber Santiago Freitas e Silva

Replicon – Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO

Juliana Santana de Curcio

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal de Goiás – UFG

Lucas Webá Soares

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal de Goiás – UFG

Lívia do Carmo Silva

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal de Goiás – UFG

Amanda Alves de Oliveira

Programa de pós-graduação em Medicina Tropical – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP – UFG

Thaynara Gonzaga Santos

Programa de pós-graduação em Medicina Tropical – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP – UFG

RESUMO: Polimorfismo genético ocorre em situações em que mais de um alelo ocupa o mesmo locus de um determinado gene representando uma população com uma frequência maior do que 1%. Variações polimórficas de genes podem induzir a expressão alterada ou produção de uma proteína com perda de

função e aumentar a predisposição a doenças como câncer, aterosclerose e endometriose. Pesquisas relacionadas a interações proteicas auxiliam a esclarecer processos biológicos, genéticos e moleculares ainda desconhecidos. As abordagens de bioinformática usam dados clínicos, químicos, biológicos e estruturais para a elaboração de ensaios *in silico* que serão testados e validados, contribuindo para a produção de medicamentos mais eficientes e diagnóstico menos evasivos. Doenças como câncer, aterosclerose e endometriose atingem um grande número de pessoas no mundo todo. É primordial que se busque alternativas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, além de buscar a redução dos altos custos para os sistemas de saúde em relação a essas doenças. As ferramentas de bioinformática fornecem informações importantes para o desenvolvimento de opções de tratamento mais eficazes para as referidas doenças. A identificação de resíduos importantes na interface de interação entre proteínas-chaves leva à possibilidade de desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais eficientes, personalizadas e menos invasivas. O mesmo ocorre para o tratamento dessas doenças. O desenho racional de peptídeos moduladores baseados em estrutura é o futuro da genética molecular e poderá revolucionar a medicina e a indústria farmacêutica nas próximas décadas.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinformática; p53; eNOS; câncer; endometriose.

ABSTRACT: Genetic polymorphism is characterized where more than one allele occupies the same locus of a given gene in a population with a frequency greater than 1%. Polymorphic variations of genes may induce altered expression or production of a protein with loss of function and increase predisposition to diseases such as cancer, atherosclerosis and endometriosis. Researches related to protein interactions help to clarify biological, genetic and molecular processes that are still unknown. Bioinformatics approaches use clinical, chemical, biological and structural data for the preparation of *in silico* assays that will be tested and validated, contributing to the production of more efficient and less evasive diagnostic drugs. Diseases such as cancer, atherosclerosis and endometriosis reach a large number of people worldwide. It is of paramount importance to seek alternatives to improve the quality of life of patients, as well as to seek to reduce the high costs to health systems in relation to these diseases. Bioinformatics tools provide important information for the development of more effective treatment options for such diseases. The identification of important residues in the interaction interface between key proteins leads to the possibility of developing more efficient, personalized and less invasive diagnostic techniques. The same is true for the treatment of these diseases. The rational design of structure-based modulating peptides is the future of molecular genetics and could revolutionize medicine and the pharmaceutical industry in the coming decades.

KEYWORDS: Bioinformatics; p53; it is us; cancer; endometriosis.

INTRODUÇÃO

O polimorfismo genético se define quando mais de um alelo ocupa o locus de um determinado gene representante de uma população com uma frequência maior do que 1% (KARKI et al., 2015) related to disease susceptibility and efficacy of drug responses, they have blurred the definitions of mutation and polymorphism.

Discussion

In the era of personal genomics, it is critical to establish clear guidelines regarding the use of a reference genome. Nowadays DNA variants are called as differences in comparison to a reference. In a sequencing project Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs. Polimorfismos podem estar presente em qualquer região do genoma. A grande maioria dos polimorfismos genéticos não modifica a expressão de um gene ou proteína, nesses casos ela é chamada de silenciosa (MILLS et al., 2011) 000 bp in length in the genomes of 79 diverse humans. These variants include 819,363 small INDELs that map to human genes. Small INDELs frequently were found in the coding exons of these genes, and several lines of evidence indicate that such variation is a major determinant of human biological diversity. Microarray-based genotyping experiments revealed several interesting observations regarding the population genetics of small INDEL variation. For example, we found that many of our INDELs had high levels of linkage disequilibrium (LD. No entanto, variações

polimórficas de certos genes podem induzir expressão alterada ou produção de uma proteína anômala ou afuncional e aumentar a predisposição a doenças (WU et al., 2014)8, 11, 14-eicosatetraenoic acid (20-HETE. A figura 1 mostra a alteração de um único nucleotídeo sequência do gene p53, gene responsável, dentre de várias funções por controlar o ciclo celular, reparo do DNA e crescimento. Quando um único nucleotídeo é alterado, promovendo variação gênica, o polimorfismo recebe o nome de SNP (do inglês, *single nucleotide polymorphism*). SNPs são capazes de alterar o padrão de enovelamento proteico, perda de função da proteína e consequente desenvolvimento de doenças (GUO et al., 2013).

Pesquisas relacionadas a interações proteicas têm contribuído de várias maneiras para esclarecer processos biológicos, genéticos e moleculares ainda desconhecidos. Esses processos ocorrem no ambiente celular e tecidual podendo levar ao desenvolvimento de doenças. Além disso, o conhecimento sobre interação proteína-proteína pode auxiliar na compreensão da dinâmica dos sistemas biológicos, do início e da progressão de doenças, além de auxiliar no diagnóstico, tratamento e prognóstico das mesmas. As interações entre proteínas coordenam todas as funções biológicas, uma vez que elas nunca atuam sozinhas, coordenando processos de sinalização (BATADA; SHEPP; SIEGMUND, 2004; MAYER, 2006), transporte (AMES; SPURICH, 1976), secreção (NYFELER; MICHNICK; HAURI, 2005) e modificações pós-tradução (DUAN; WALTHER, 2015) para realizar seus papéis nas células. Anomalias nos padrões de interações proteicas podem levar ao desenvolvimento como câncer (HAO; ZHAO; WANG, 2014; SANTUCCI et al., 2015; ZHAO et al., 2015), doenças cardiovasculares (GEMICI et al., 2007; RAHIMI et al., 2012), epilepsia (FAHEEM et al., 2014; KONG et al., 2014), glaucoma (MINEGISHI et al., 2013; SRINIVASAN; TONDDAST-NAVAEI; SKOLNICK, 2017), infertilidade (YAN et al., 2014), diabetes (GRUNERT; LABUDDE, 2015; TANG et al., 2016) e muitas outras.

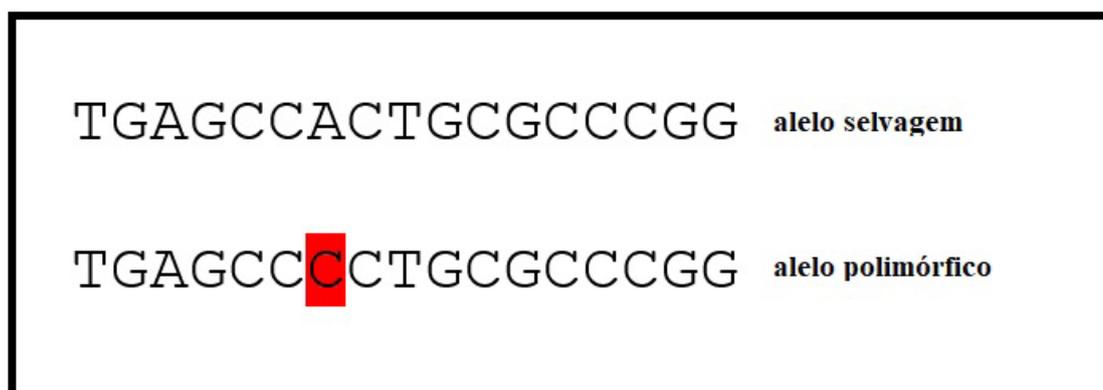


Figura 1 - Sequência de nucleotídeos entre alelos selvagem e polimórfico do gene p53. A sequência de nucleotídeos do gene p53 selvagem foi obtida através do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e a sequência de nucleotídeos do gene polimórfico é proveniente de dados clínicos alimentos pelo banco de dado dbSNP do NCBI. A alteração de um único nucleotídeo é capaz de influenciar na expressão proteica do p53 e aumentar a susceptibilidade a doenças como o câncer.

Estudos genéticos têm buscado na bioinformática alternativas para melhor diagnóstico e tratamento. As ferramentas de bioinformática permitem a comparação da estabilidade estrutural e energética de proteínas nas suas versões selvagem e polimórfica, estabelecer o perfil de interação com outras proteínas e identificar padrões de interações entre resíduos de aminoácidos nas interfaces de interação (TANNOUS et al., 2018). Dessa forma, as abordagens de bioinformática usam dados clínicos, químicos, biológicos e estruturais para a elaboração de ensaios *in silico* que serão testados e validados, contribuindo para a produção de medicamentos mais eficientes e diagnóstico menos evasivos.

POLIMORFISMO DO GENE P53 E CÂNCER

A proteína p53 é codificada pelo gene TP53. Ela é uma proteína importante que atua como supressora de tumores, e assim, intimamente ligada ao câncer (MOBARAKI et al., 2018). Variações gênicas nas regiões codificadoras do gene TP53 também estão relacionadas a doenças ligadas a perda do controle do ciclo celular, como a endometriose (SILVA; MOURA, 2016a), aterosclerose (LAGARES et al., 2017), e infertilidade (DE MORAIS et al., 2016). Outras funções da p53 dizem respeito à regulação e progressão do ciclo celular, além de proteger o DNA contra danos internos e externos (SPEIDEL, 2015).

O gene responsável por codificar a p53 está localizado no cromossomo 17, na região p13.1. Além disso, o gene compreende 11 éxons que se apresentam altamente conservados nas mais diversas espécies. A proteína p53 humana contém 393 aminoácidos e também apresenta grande homologia estrutural entre as espécies de seres vivos. A p53 selvagem é enovelada em uma conformação tetramérica (KUNG; MURPHY, 2016)p53 is an undisputedly critical protein. Functioning primarily as a transcription factor, p53 helps fend off the initiation and progression of tumors by inducing cell cycle arrest, senescence or programmed cell death (apoptosis. A figura 2 representa a estrutura da superfície da p53. A proteína é considerada de tamanho médio, e apresenta um grande número de parceiros proteicos que garantem a realização das suas funções.

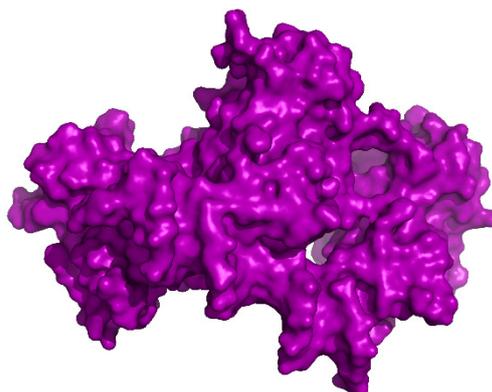


Figura 2 - Estrutura da superfície da proteína p53. A representação em superfície é usada na

bioinformática para visualização da conformação tridimensional de macromoléculas. A imagem foi gerada a partir do arquivo obtido pelo banco de dados de estruturas proteicas (PDB) e através do uso do software PyMOL.

A proteína p53 é induzida quando o DNA sofre algum tipo de dano, seja ele devido a fatores externos ou internos. Os principais causadores de danos ao material genético correspondem às espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2018), também conhecidas como ROS (do inglês reactive oxygen species), hipóxia (TIMANI et al., 2015), e privação de nutrientes (YU et al., 2018) e erros nos processos de replicação do DNA (ROMANOVA; MUSHINSKI; KOVALCHUK, 2018). Polimorfismos no gene da p53 aumentam as chances desses erros acontecerem e se estabelecerem no DNA, com transmissão para as células-filhas quando ocorre o processo de divisão celular. Erros metabólicos que ocorrem no DNA induzem a produção de p53 como resposta (ROMEO et al., 2018). Dessa forma, a p53 em sua forma selvagem interage com outras proteínas, a fim de desencadear vias relacionadas à reparação do DNA (MENON; POVIRK, 2014), à apoptose (IWASA et al., 2018) ou promove a inibição do ciclo celular (ZHOU et al., 2018b). A p53 apresenta uma região caracterizada como motivo, o qual é altamente conservado e compreende mais de 60% da proteína. Essa região interage diretamente com o DNA como forma de reparar possíveis danos ao material genético. Polimorfismos genéticos nessa região são bastante comuns e podem aumentar consideravelmente a suscetibilidade a doenças e principalmente ao câncer (VOUSDEN; PRIVES, 2009).

Mutações no gene TP53 são geralmente do tipo missense (aquelas que alteram a sequência de aminoácidos que determinado gene codifica) e levam a uma redução ou total perda de função da p53 (ZHOU et al., 2018a). A perda de função da p53 codificada pelo gene polimórfico se deve, além de outros fatores, à alteração da sua capacidade de se interagir com outras proteínas que auxiliam na realização de sua função, como proteínas de sinalização, por exemplo. A figura 3 mostra a estrutura da proteína p53 com as regiões de polimorfismos mais frequentes descritas clinicamente (dsSNP). Essas regiões contêm resíduos de aminoácidos que participam ativamente das interações que a p53 realiza com outras proteínas. Os aminoácidos localizados na interface de interação entre a p53 e a proteína parceira contribuem energeticamente e favoravelmente para que a interação seja forte o suficiente para garantir que a função exercida pelo complexo proteico seja realizada. A substituição de um nucleotídeo no TP53 e conseqüentemente de um aminoácido na região de interface entre as proteínas promove uma alteração na conformação da p53. Isso leva a uma redução da força de interação com a proteína parceira, ou até mesmo inibe a interação, impedindo assim, o reparo do DNA e a possível perda do controle mitótico e desenvolvimento de tumores (SILVA et al., 2018).

Polimorfismos Genéticos na Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial de etiologia complexa. Vários fatores contribuem para o aparecimento da doença e dentre eles se destacam os aspectos genéticos e a presença de polimorfismos (VARGAS-ALARCON et al., 2018), fisiológicos (KASAHARA et al., 2017), imunológicos (KRÁLOVÁ; KRÁLOVÁ LESNÁ; POLEDNE, 2014), ambientais (NANNI et al., 2006), inflamação (KOZAROV; HUBER; WOJTA, 2015), estresse oxidativo (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014) e agentes infecciosos (CAMPBELL; ROSENFELD, 2015). Aterosclerose é definida pela formação de placas de ateroma (deposição de lipídeos nas paredes das artérias) e a consequente redução do suprimento de sangue arterial para os tecidos afetados. Os fatores de risco tradicionais, como hipertensão arterial (LEONG; NG; JAARIN, 2015), tabagismo (DE RONDE et al., 2017), aumento da glicemia (SU et al., 2018) e dislipidemia (HURTUBISE et al., 2016), também influenciam o aparecimento e o desenvolvimento da aterosclerose. Outros fatores de risco induzem a expressão de genes de citocinas inflamatórias (KRÁLOVÁ; KRÁLOVÁ LESNÁ; POLEDNE, 2014), ROS (KATTOOR et al., 2017) e oxidação lipídica (JUN et al., 2018) que levam a um metabolismo endotelial alterado e aumentam a predisposição ao desenvolvimento da doença.

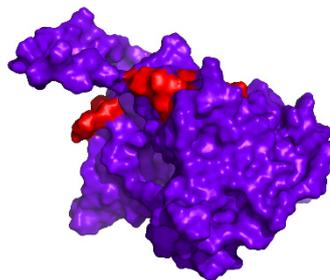


Figura 4 – Interação entre as proteínas VEGF e eNOS. As funções de angiogênese e produção de óxido nítrico são garantidas pela interação do VEGF e eNOS. A região cinza corresponde à interface de interação entre as duas proteínas. A proteína em azul corresponde à eNOS e a proteína em vermelho corresponde à estrutura parcial do VEGF.

A enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) é uma das mais estudadas quando se refere a doenças cardiovasculares. O gene que codifica a proteína eNOS está localizado no cromossomo 7 e é altamente polimórfico na população humana (TANNOUS et al., 2018). A proteína é responsável pela síntese de óxido nítrico, uma substância lipofílica altamente ativa que participa em diversos processos fisiológicos (DELLAMEA et al., 2014). O óxido nítrico produzido pela atividade da proteína eNOS regula o tônus vascular (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015), a progressão do ciclo celular (TIWARI et al., 2017), a adesão celular do sistema imune (GUTSAEVA et al.,

2014) e a agregação plaquetária (SMYTH et al., 2017). Anomalias no gene eNOS levam à disfunção endotelial que influencia a aterogênese através da regulação do metabolismo endotelial, da redução dos níveis de óxido nítrico e aumento da produção de ROS. O óxido nítrico é um promissor agente terapêutico, pois apresenta efeitos protetores e antiaterogênicos. Polimorfismos genéticos da eNOS alteram os níveis de óxido nítrico no plasma, influenciando o aparecimento de várias doenças como doença arterial coronariana (SUNG et al., 2015), infarto (WANG et al., 2017), diabetes (WANG et al., 2018), hipertensão (CHANG et al., 2017) e aterosclerose (BARBOSA et al., 2017).

Outra proteína relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A proteína está principalmente relacionada à angiogênese, processo metabólico que fornece suprimento de energia para manter a homeostase fisiológica nos tecidos através da formação de novos vasos sanguíneos. A angiogênese é responsável pelo desenvolvimento de diversas doenças, como inflamação crônica (FREDMAN; TABAS, 2017), infarto (ZHOU et al., 2018c), câncer (WOJTUKIEWICZ et al., 2017), doenças degenerativas (PUFE et al., 2005), doenças cardiovasculares (JOHNSON et al., 2018) e aterosclerose (JAIPERSAD et al., 2014). O VEGF é um fator de crescimento que atua como uma proteína sinalizadora regulando a formação de vasos sanguíneos, que fornece oxigênio e nutrientes às células (CHEUNG, 1997). A concentração sanguínea de VEGF está alterada em certas doenças, como asma (ABDELSAID et al., 2017), diabetes (ZHANG et al., 2017), câncer (FREZZETTI et al., 2017) e aterosclerose (ZHU et al., 2017). O VEGF participar de mais de 70 redes interação proteica (CHATR-ARYAMONTRI et al., 2017). SNPs presentes em resíduos importantes na interface de interação entre VEGF e proteínas parceiras aumentam consideravelmente a probabilidade de desenvolvimento de câncer (SONG et al., 2018) e aterosclerose (SHIBUYA, 2001), além de outras doenças cardiovasculares.

A figura 4 mostra a interação entre as proteínas VEGF e eNOS. A interface de interação entre essas proteínas, representada de cinza na figura 4, possui grande extensão e contém resíduos de aminoácidos que contribuem com a estabilidade do complexo proteico através de ligações intermoleculares (hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e eletrostáticas). A estabilidade do complexo, por sua vez, garante uma função normal da VEGF e síntese de óxido nítrico em níveis homeostáticos (SHIZUKUDA et al., 1999). A análise computacional auxilia na identificação das regiões de interação das proteínas e na identificação das propriedades químicas dos resíduos na interface de interação. Dessa forma, a bioinformática e suas abordagens auxiliam na produção de conhecimento sobre a relação entre o polimorfismo e a susceptibilidade à aterosclerose e outras doenças humanas. Ambas proteínas apresentam inúmeras possibilidades de ocorrer um SNP nas suas sequências. Variações nos resíduos de aminoácidos na interface de interação entre VEGF e eNOS pode desestabilizar o complexo proteico e impedir que as funções dessas proteínas ocorram de forma

normal, podendo levar ao aparecimento de aterosclerose, dentre outras doenças.

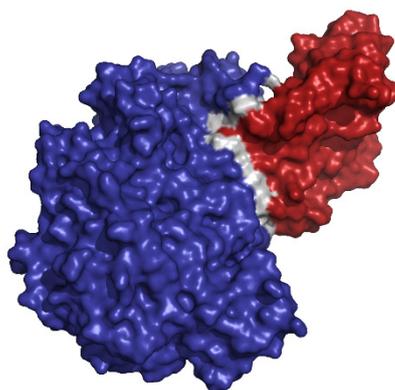


Figura 5 – Interação entre TFF3 e PAR-2 – Na interface de interação entre TFF3 (amarelo) e PAR-2 (bege) pode ser observado projeções de resíduos que estabilizam o complexo partindo de TFF3 em direção à PAR-2. A presença de polimorfismos interfere na interação e no aumento da expressão de TFF3 que induz processos inflamatórios e aumentam a susceptibilidade à endometriose.

Polimorfismos Genéticos na Endometriose

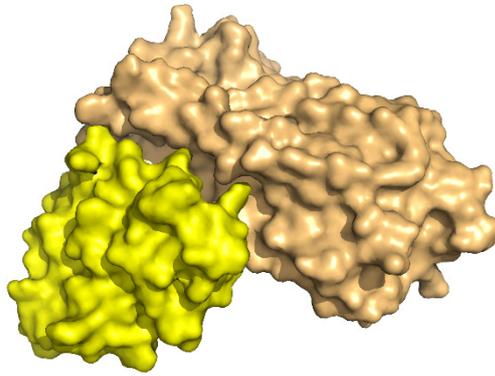
A endometriose caracteriza-se pela presença de estroma e células endometriais fora da cavidade uterina. Esse material biológico, proveniente de menstruação retrógrada, se instala com maior frequência no compartimento pélvico, mas pode se espalhar para outros tecidos e órgãos (VERCELLINI et al., 2014)coelomic metaplasia and Müllerian remnants. A endometriose é uma condição inflamatória, associada à dor pélvica crônica, infertilidade, dismenorreia e dispareunia. A patogênese da endometriose não é totalmente compreendida, evidências indicam que a doença possivelmente está associada a alterações na imunidade, disseminação metastática e metaplasia coelômica. Além disso, fatores genéticos e ambientais também estão associados ao surgimento e desenvolvimento da doença (MACER; TAYLOR, 2012).

A doença é impulsionada pelo hormônio estrogênio e afeta principalmente mulheres na faixa etária reprodutiva. A principal forma de diagnóstico é realizada por laparoscopia (RODGERS; FALCONE, 2008). Em muitos casos, as mulheres em idade reprodutiva não são submetidas a procedimento cirúrgico e o uso de drogas que retardam o desenvolvimento da doença e reduzem a dor pélvica é indicado (AHN; SINGH; TAYADE, 2017). Métodos não invasivos, como exames de imagem, têm sido usados recentemente para o diagnóstico de endometriose (KAVOUSSI et al., 2016). E mais recentemente, estudos têm mostrado diversos genes polimórficos que podem estar associados à endometriose (SILVA; MOURA, 2016a), e assim, o diagnóstico poderia ser realizado através de análises genéticas simples, como a PCR (reação em cadeia da polimerase).

O tratamento da endometriose emprega o uso de hormônios para induzir um estado hipoestrogênico. As lesões causadas pela endometriose podem ser removidas

à laser ou por cauterização, principalmente quando os métodos cirúrgicos são ineficazes e a doença é recorrente (RODGERS; FALCONE, 2008). Recentemente, pesquisas têm buscado desenvolver métodos de tratamento mais eficiente e menos invasivo. O estudo das interações proteína-proteína tem avançado no sentido de desenvolver moléculas pequenas capazes de modular essas interações e adequar as expressões dessas proteínas a níveis compatíveis com a homeostase de tecidos e órgãos. Peptídeos moduladores de interações proteicas têm sido desenvolvidos como forma de tratamento promissor de diversas doenças, incluindo endometriose (DE CURCIO et al., 2018). Linzh e colaboradores, 2018 empregando a tecnologia de apresentação de fagos, descreveram um peptídeo com alta afinidade para se ligar a células do endométrio ectópico, possivelmente o uso deste peptídeo pode favorecer o tratamento e o prognóstico da endometriose (LINZHI et al., 2018).

Vários trabalhos mostraram que polimorfismos genéticos podem estar associados ao desenvolvimento de endometriose. A mutação de genes também está associada à infertilidade na endometriose. Alguns dos principais genes polimórficos que podem aumentar o risco de desenvolvimento de endometriose compreendem a interleucina (MATALLIOTAKIS et al., 2018; ZHAO et al., 2018), arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT2) (FAYEZ et al., 2018), CYP1A1 (BARBOSA et al., 2016; SILVA; MOURA, 2016b), p53 (DE MORAIS et al., 2016, p. 53; SANTOS et al., 2018; SILVA; MOURA, 2016b) e eNOS (SANTOS et al., 2018). A figura 5 mostra a interação de duas proteínas importantes, cujas expressões podem estar alteradas em pacientes com endometriose. A proteína TFF3 (do inglês trefoil fator 1) tem um papel no crescimento, diferenciação celular e recuperação de tecidos danificados (GE et al., 2015). Essa proteína age na remodelação do tecido endometrial em mulheres em idade reprodutiva. A atividade da TFF3 é garantida pela sua estrutura conformacional e interações com proteínas parceiras. Alterações na região codificadora do gene TFF3 podem interferir em suas funções e padrões de interação proteica, de modo a aumentar a suscetibilidade de pacientes à endometriose. O TFF3 interage e regula o receptor ativado por protease 2 (PAR-2) (BARRERA; TORTOLERO, 2016). O PAR-2 está relacionado a respostas inflamatórias, excesso de peso (LIM et al., 2013), metabolismo (BADEANLOU et al., 2011) e responde a enzimas proteolíticas de microrganismos (BADEANLOU et al., 2011, p. 2). Moléculas capazes de inibir a atividade da TFF3 quando esta proteína é expressa em excesso pode reduzir a inflamação, a adesão de células endometriais e a dor crônica.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doenças como câncer, aterosclerose e endometriose atingem um grande número de pessoas no mundo todo. É primordial que se busque alternativas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, além de buscar a redução dos altos custos para os sistemas de saúde em relação a essas doenças. As ferramentas de bioinformática fornecem informações importantes para o desenvolvimento de opções de tratamento mais eficazes para as referidas doenças. A identificação de resíduos importantes na interface de interação entre proteínas-chaves leva à possibilidade de desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais eficientes, personalizadas e menos invasivas. O mesmo ocorre para o tratamento dessas doenças. O desenho racional de peptídeos moduladores baseados em estrutura é o futuro da genética molecular e poderá revolucionar a medicina e a indústria farmacêutica nas próximas décadas.

REFERÊNCIAS

- ABDELSAID, M. et al. Enhanced VEGF signalling mediates cerebral neovascularisation via downregulation of guidance protein ROBO4 in a rat model of diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 4, p. 740–750, 2017.
- AHN, S. H.; SINGH, V.; TAYADE, C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 3, p. 523–532, 2017.
- AMES, G. F.; SPURICH, E. N. Protein-protein interaction in transport: periplasmic histidine-binding protein J interacts with P protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 6, p. 1877–1881, jun. 1976.
- BADEANLOU, L. et al. Tissue factor-protease-activated receptor 2 signaling promotes diet-induced obesity and adipose inflammation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1490–1497, 23 out. 2011.
- BARBOSA, A. M. et al. Association of CYP1A1 (cytochrome P450) MspI polymorphism in women with endometriosis. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 3, 26 ago. 2016.
- BARBOSA, A. M. et al. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 21 set. 2017.
- BARRERA, G. J.; TORTOLERO, G. S. Trefoil factor 3 (TFF3) from human breast milk activates PAR-2

- receptors, of the intestinal epithelial cells HT-29, regulating cytokines and defensins. **Bratislavské Lekárske Listy**, v. 117, n. 6, p. 332–339, 2016.
- BATADA, N. N.; SHEPP, L. A.; SIEGMUND, D. O. Stochastic model of protein–protein interaction: Why signaling proteins need to be colocalized. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 17, p. 6445–6449, 27 abr. 2004.
- CAMPBELL, L. A.; ROSENFELD, M. E. Infection and Atherosclerosis Development. **Archives of Medical Research**, v. 46, n. 5, p. 339–350, jul. 2015.
- CHANG, C.-C. et al. 3-Methylcholanthrene/Aryl-Hydrocarbon Receptor-Mediated Hypertension Through eNOS Inactivation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 5, p. 1020–1029, 2017.
- CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D369–D379, 04 2017.
- CHEUNG, C. Y. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 4, n. 4, p. 169–177, ago. 1997.
- DE CURCIO, J. S. et al. Structure-based design of TFF3-PAR2 inhibitor peptides as a promising new therapeutic approach for endometriosis patients. **Mathews Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 03, n. 01, p. 06, 2018.
- DE MORAIS, M. P. et al. Male idiopathic infertility and the TP53 polymorphism in codon 72. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 4, 3 nov. 2016.
- DE RONDE, M. W. J. et al. High miR-124-3p expression identifies smoking individuals susceptible to atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 377–384, 2017.
- DELLAMEA, B. S. et al. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 6, n. 1, p. 17, 12 fev. 2014.
- DUAN, G.; WALTHER, D. The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. **PLOS Computational Biology**, v. 11, n. 2, p. e1004049, 18 fev. 2015.
- FAHEEM, M. et al. Interaction of different proteins with GABAA receptor and their modulatory effect on inhibitory neural transmission leads to epilepsy. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 13, n. 7, p. 1148–1159, 2014.
- FAYEZ, D. et al. Arylamine N-acetyltransferase 2 Polymorphisms and the Risk of Endometriosis. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 163, set. 2018.
- FREDMAN, G.; TABAS, I. Boosting Inflammation Resolution in Atherosclerosis: The Next Frontier for Therapy. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 6, p. 1211–1221, jun. 2017.
- FREZZETTI, D. et al. VEGF as a potential target in lung cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 10, p. 959–966, 2017.
- GE, H. et al. Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Regulated by Food Intake, Improves Glucose Tolerance and Induces Mucinous Metaplasia. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0126924, 17 jun. 2015.
- GEMICI, G. et al. Interaction between C-reactive protein and endothelin-1 in coronary artery disease. **Cardiology**, v. 107, n. 4, p. 340–344, 2007.
- GRUNERT, S.; LABUDDE, D. Evolutionary Influenced Interaction Pattern as Indicator for the Investigation of Natural Variants Causing Nephrogenic Diabetes Insipidus. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2015, p. 641393, 2015.

- GUO, G. et al. Trp53 inactivation in the tumor microenvironment promotes tumor progression by expanding the immunosuppressive lymphoid-like stromal network. **Cancer Research**, v. 73, n. 6, p. 1668–1675, 15 mar. 2013.
- GUTSAEVA, D. R. et al. Molecular mechanisms underlying synergistic adhesion of sickle red blood cells by hypoxia and low nitric oxide bioavailability. **Blood**, v. 123, n. 12, p. 1917–1926, 20 mar. 2014.
- HAO, Y.; ZHAO, S.; WANG, Z. Targeting the protein-protein interaction between IRS1 and mutant p110 α for cancer therapy. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 1, p. 140–147, jan. 2014.
- HURTUBISE, J. et al. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 18, n. 12, p. 82, dez. 2016.
- IWASA, H. et al. UNC119 is a binding partner of tumor suppressor Ras-association domain family 6 and induces apoptosis and cell cycle arrest by MDM2 and p53. **Cancer Science**, 21 jun. 2018.
- JAIPERSAD, A. S. et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 7 jan. 2014.
- JOHNSON, T. et al. Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, 15 dez. 2018.
- JUN, S. et al. The impact of lipids, lipid oxidation, and inflammation on AMD, and the potential role of miRNAs on lipid metabolism in the RPE. **Experimental Eye Research**, 5 out. 2018.
- KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, 15 jul. 2015.
- KASAHARA, K. et al. Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 3, p. 519–528, 2017.
- KATTOOR, A. J. et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p. 42, 18 set. 2017.
- KAVOUSSI, S. K. et al. New paradigms in the diagnosis and management of endometriosis. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 28, n. 4, p. 267–276, 2016.
- KONG, B. et al. Protein-protein interaction network analysis and gene set enrichment analysis in epilepsy patients with brain cancer. **Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, v. 21, n. 2, p. 316–319, fev. 2014.
- KOZAROV, E.; HUBER, K.; WOJTA, J. Infection-associated biomarkers of inflammation in atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 13, p. 1776–1782, 2015.
- KRÁLOVÁ, A.; KRÁLOVÁ LESNÁ, I.; POLEDNE, R. Immunological aspects of atherosclerosis. **Physiological Research**, v. 63 Suppl 3, p. S335-342, 2014.
- KUNG, C.-P.; MURPHY, M. E. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. **The Journal of endocrinology**, v. 231, n. 2, p. R61–R75, nov. 2016.
- LAGARES, M. H. et al. Analysis of p53 gene polymorphism (codon 72) in symptomatic patients with atherosclerosis. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 17 ago. 2017.
- LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 528757, 2015.
- LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis.

Atherosclerosis, v. 237, n. 1, p. 208–219, nov. 2014.

LIM, J. et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 12, p. 4757–4767, dez. 2013.

LINZHI, Y. et al. Screening for novel peptides specifically binding to the surface of ectopic endometrium cells by phage display. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, v. 64, n. 11, p. 36–40, 30 ago. 2018.

MACER, M. L.; TAYLOR, H. S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 39, n. 4, p. 535–549, dez. 2012.

MATALLIOTAKIS, M. et al. The role of IL-16 gene polymorphisms in endometriosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 3, p. 1469–1476, mar. 2018.

MAYER, B. J. Protein-protein interactions in signaling cascades. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 332, p. 79–99, 2006.

MENON, V.; POVIRK, L. Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 85, p. 321–336, 2014.

MILLS, R. E. et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. **Genome Research**, v. 21, n. 6, p. 830–839, jun. 2011.

MINEGISHI, Y. et al. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 17, p. 3559–3567, 1 set. 2013.

MOBARAKI, R. N. et al. RITA induces apoptosis in p53-null K562 leukemia cells by inhibiting STAT5, Akt, and NF- κ B signaling pathways. **Anti-Cancer Drugs**, 28 ago. 2018.

NANNI, L. et al. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 6, p. 934–948, dez. 2006.

NYFELER, B.; MICHNICK, S. W.; HAURI, H.-P. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 18, p. 6350–6355, 3 maio 2005.

PUFE, T. et al. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 15, n. 4, p. 211–222, ago. 2005.

RAHIMI, Z. et al. Strong interaction between T allele of endothelial nitric oxide synthase with B1 allele of cholesteryl ester transfer protein TaqIB highly elevates the risk of coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. **Human Genomics**, v. 6, p. 20, 25 set. 2012.

RODGERS, A. K.; FALCONE, T. Treatment strategies for endometriosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 2, p. 243–255, fev. 2008.

ROMANOVA, L. Y.; MUSHINSKI, F.; KOVALCHUK, A. L. Transcriptional activation of p21Waf1 contributes to suppression of HR by p53 in response to replication arrest induced by camptothecin. **Oncotarget**, v. 9, n. 39, p. 25427–25440, 22 maio 2018.

ROMEO, M. et al. The human T-cell leukemia virus type-1 p30II protein activates p53 and induces the TIGAR and suppresses oncogene-induced oxidative stress during viral carcinogenesis. **Virology**, v.

518, p. 103–115, 2018.

SANTOS, T. R. et al. Infertility caused by an association between Arg72Pro polymorphism of the p53 gene and Glu298Asp of the eNOS gene in patients with endometriosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, 27 jul. 2018.

SANTUCCI, M. et al. The Hippo Pathway and YAP/TAZ-TEAD Protein-Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 4857–4873, 25 jun. 2015.

SHIBUYA, M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 1, p. 25–35, fev. 2001.

SHIZUKUDA, Y. et al. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. **Circulation Research**, v. 85, n. 3, p. 247–256, 6 ago. 1999.

SILVA, K. S. F. et al. Identification of conserved residues on the interaction interface of VEGF with urological cancer-related proteins by a systems biology approach. **Journal of Research Notes**, v. 01, n. 01, p. 07, 2018.

SILVA, K. S. F.; MOURA, K. K. V. O. Genetic polymorphisms in patients with endometriosis: an analytical study in Goiânia (Central West of Brazil). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 25 maio 2016a.

SILVA, K. S. F.; MOURA, K. K. V. O. Genetic polymorphisms in patients with endometriosis: an analytical study in Goiânia (Central West of Brazil). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 25 maio 2016b.

SMYTH, E. et al. Influence of inflammation and nitric oxide upon platelet aggregation following deposition of diesel exhaust particles in the airways. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 2130–2139, 2017.

SONG, Y. et al. Association between vascular endothelial growth factor rs699947 polymorphism and the risk of three major urologic neoplasms (bladder cancer, prostate cancer, and renal cell carcinoma): A meta-analysis involving 11,204 subjects. **Gene**, v. 679, p. 241–252, 6 set. 2018.

SPEIDEL, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 501–517, abr. 2015.

SRINIVASAN, B.; TONDDAST-NAVAEI, S.; SKOLNICK, J. Pocket detection and interaction-weighted ligand-similarity search yields novel high-affinity binders for Myocilin-OLF, a protein implicated in glaucoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 4133–4139, 01 2017.

SU, H. et al. Relationship between high-sensitivity C-reactive protein and subclinical carotid atherosclerosis stratified by glucose metabolic status in Chinese adults. **Clinical Cardiology**, 14 out. 2018.

SUNG, J. H. et al. Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 4, p. 16508–16520, 9 dez. 2015.

TANG, X. et al. Predicting diabetes mellitus genes via protein-protein interaction and protein subcellular localization information. **BMC genomics**, v. 17 Suppl 4, p. 433, 18 2016.

TANNOUS, I. et al. Involvement of Protein-Protein Interactions of eNOS and Genetic Polymorphisms in Coronary Artery Disease. **Involvement of Protein-Protein Interactions of eNOS and Genetic Polymorphisms in Coronary Artery Disease**, v. 02, n. 03, p. 067–071, 2018.

- TIMANI, K. A. et al. Tip110 Regulates the Cross Talk between p53 and Hypoxia-Inducible Factor 1 α under Hypoxia and Promotes Survival of Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 13, p. 2254–2264, jul. 2015.
- TIWARI, M. et al. Nitric oxide signaling during meiotic cell cycle regulation in mammalian oocytes. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 9, p. 307–318, 1 jun. 2017.
- VARGAS-ALARCON, G. et al. The rs1805193, rs5361, and rs5355 single nucleotide polymorphisms in the E-selectin gene (SEL-E) are associated with subclinical atherosclerosis: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican study. **Immunobiology**, 24 nov. 2018.
- VERCELLINI, P. et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 5, p. 261–275, maio 2014.
- VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413–431, 1 maio 2009.
- WANG, H. et al. Naoxintong inhibits myocardial infarction injury by VEGF/eNOS signaling-mediated neovascularization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 13–23, 14 set. 2017.
- WANG, L. et al. Oxymatrine ameliorates diabetes-induced aortic endothelial dysfunction via the regulation of eNOS and NOX4. **Journal of Cellular Biochemistry**, 19 nov. 2018.
- WOJTUKIEWICZ, M. Z. et al. Platelets and cancer angiogenesis nexus. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 36, n. 2, p. 249–262, 2017.
- WU, C.-C. et al. 20-HETE and Blood Pressure Regulation. **Cardiology in review**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2014.
- YAN, L. et al. Genetic variants in telomerase reverse transcriptase (TERT) and telomerase-associated protein 1 (TEP1) and the risk of male infertility. **Gene**, v. 534, n. 2, p. 139–143, 25 jan. 2014.
- YU, X. et al. Zinc Metallochaperones Reactivate Mutant p53 Using an ON/OFF Switch Mechanism: A New Paradigm in Cancer Therapeutics. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, 18 jun. 2018.
- ZHANG, B. et al. Overexpression of lncRNA ANRIL up-regulates VEGF expression and promotes angiogenesis of diabetes mellitus combined with cerebral infarction by activating NF- κ B signaling pathway in a rat model. **Oncotarget**, v. 8, n. 10, p. 17347–17359, 7 mar. 2017.
- ZHANG, W. et al. Hydrogen alleviates cellular senescence via regulation of ROS/p53/p21 pathway in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 106, p. 1126–1134, out. 2018.
- ZHAO, W. et al. A functional promoter polymorphism in interleukin 12B gene is associated with an increased risk of ovarian endometriosis. **Gene**, v. 666, p. 27–31, 5 ago. 2018.
- ZHAO, Y. et al. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1038–1052, 12 fev. 2015.
- ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, out. 2015.
- ZHOU, F. et al. Establishment and characterization of three stable Basal/HER2-positive breast cancer cell lines derived from Chinese breast carcinoma with identical missense mutations in the DNA-binding domain of TP53. **Cancer Cell International**, v. 18, p. 118, 2018a.

ZHOU, J. et al. Histone deacetylase inhibitor chidamide induces growth inhibition and apoptosis in NK/T lymphoma cells through ATM-Chk2-p53-p21 signalling pathway. **Investigational New Drugs**, v. 36, n. 4, p. 571–580, ago. 2018b.

ZHOU, L. et al. Atherosclerosis Might Be Responsible for Branch Artery Disease: Evidence From White Matter Hyperintensity Burden in Acute Isolated Pontine Infarction. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 840, 2018c.

ZHU, X. et al. Bilayered Nanoparticles with Sequential Release of VEGF Gene and Paclitaxel for Restenosis Inhibition in Atherosclerosis. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 33, p. 27522–27532, 23 ago. 2017.

QUIMIOPROTEÔMICA: DESCOBRINDO MOLÉCULAS BIOATIVAS E SEUS ALVOS

Lívia do Carmo Silva

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas,

Kleber Santiago Freitas e Silva

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

Juliana Santana De Curcio

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

Lucas Webá Soares

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

Amanda Alves de Oliveira

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

Thaynara Gonzaga Santos

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas

RESUMO: É crescente a necessidade do desenvolvimento de fármacos mais seguros, eficazes e com menos efeitos colaterais. Um dos caminhos pelos quais as células se ajustam a mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão das proteínas. Assim, técnicas proteômicas estão sendo aplicadas com o objetivo de obter uma visão integrada da biologia e de extrair alvos adequados para a descoberta de drogas. A descoberta ou síntese de uma molécula

com potencial ativo e a sua correlação com o alvo biológico apropriado constitui o início do processo de pesquisa e desenvolvimento racional de fármacos. Neste intuito a mais nova área científica, quimioproteômica, que visa estudar sistematicamente o efeito biológico de uma grande variedade de ligantes em uma ampla gama de alvos macromoleculares, utiliza ferramentas biotecnológicas como análises proteômicas globais e análises direcionadas baseadas na afinidade ou na atividade para identificação de novas proteínas e a descoberta de novos alvos terapêuticos. Estas tecnologias exploram a afinidade entre uma molécula orgânica e a sua proteína putativa alvo, assumindo que a interação é um pré-requisito para os efeitos funcionais. Esta revisão discutirá as principais abordagens metodológicas utilizadas para a pesquisa por potenciais alvos e escaneamento de novas moléculas bioativas. **PALAVRAS-CHAVE:** Quimioproteômica, alvos moleculares, fármacos

ABSTRACT: There is a growing need for the development of drug more safer, effective and with fewer side effects. One of the ways in which cells adjust to environmental changes is by changing the expression pattern of proteins. Thus, proteomic techniques are being applied with the aim of obtaining an integrated view of biology and extracting suitable targets for drug

discovery. The discovery or synthesis of a molecule with active potential and its correlation with the appropriate biological target is the beginning of the rational drug research and development process. In this sense, the newest scientific area, chemoproteomic, which aims to systematically study the biological effect of a wide variety of ligands on a wide range of macromolecular targets, uses biotechnological tools such as global proteomic analyzes and directed analysis based on affinity or activity for identification of new proteins and the discovery of new therapeutic targets. These technologies exploit the affinity between an organic molecule and its target putative protein, assuming that interaction is a prerequisite for functional effects. This review will discuss the main methodological approaches used for the search for potential targets and the scanning of new bioactive molecules.

KEYWORDS: Chemoproteomic, molecular targets, drugs.

1 | INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é um processo que se inicia com a identificação de substâncias com propriedades bioativas e a sua correlação com o alvo biológico. Essa etapa da pesquisa básica é extremamente importante, já que os dados de eficácia e segurança são determinados. Considerando os resultados obtidos na fase inicial, novos parâmetros são avaliados até que um composto seja aprovado como medicamento pelas agências fiscalizadoras (Ferreira et al. 2009, Guido et al. 2010).

Estima-se que sejam necessários 12 anos para que o processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos seja concluído. Os altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) contrastam com o número de novos medicamentos que têm chegado ao mercado nos últimos anos. De acordo com Calixto & Siqueira 2008, de cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) entram na fase I dos estudos clínicos, 40 (0,13%) passam para a fase II, 12 (0,04%) entram na fase III e somente nove (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios. Dos medicamentos aprovados, apenas 1 (0,003%) é incluído nos protocolos terapêuticos. Este complexo panorama tem forçado a adoção de novas estratégias com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de Pesquisa e desenvolvimento de fármacos, tendo como alicerces as inovações científicas e tecnológicas.

Coerente com a sua amplitude, a ciência farmacêutica continua a sustentar-se da investigação e inovação de muitos campos tecnológicos, especialmente em relação à identificação de alvos, estudo de sistemas biológicos *in vitro*, predição *in silico* da farmacocinética, farmacodinâmica e toxicologia (Kalgutkar & Dalvie 2015). A revolução biotecnológica, especialmente com os avanços da biologia molecular, introduziu um grande número de tecnologias emergentes que têm sido aplicadas em projetos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos visando à identificação funcional e estrutural

de tecidos, células, padrões de expressão gênica e características metabólicas, o que tem proporcionando o aumento da compreensão e a predição do comportamento de fármacos em sistemas biológicos (Matthews et al. 2016).

A eleição do alvo-terapêutico é uma etapa crítica no planejamento e desenvolvimento de fármacos. As interações entre o fármaco e os componentes celulares devem ser amplamente caracterizadas para uma melhor compreensão das suas atividades, o que depende estreitamente dos conhecimentos bioquímicos sobre a fisiopatologia da doença em estudo e seus mecanismos farmacológicos. Neste contexto, destacam-se a genômica e a proteômica, que oferecem informações relevantes de novos e atrativos alvos moleculares e sua relação com os mais diversos processos fisiopatológicos (Zhu et al. 2015).

Dos estudos na área da genômica e proteômica emergem estratégias que podem ser aplicadas no monitoramento de indicadores celulares ou bioquímicos, desde as etapas de identificação de alterações fisiológicas e metabólicas induzidas pelo estado de doença até a avaliação dos efeitos dos fármacos sobre o organismo humano como por exemplo, transcrição de um gene específico ou variação da expressão ou função de uma determinada proteína. Além disso, uma investigação das principais vias bioquímicas possibilita a identificação de proteínas essenciais para o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo alvo. Já uma análise comparativa dos organismos pode levar, preferencialmente, à seleção de proteínas ausentes no hospedeiro ou então com importantes diferenças estruturais em relação às proteínas que desempenham função análoga em humanos, culminando em ligantes seletivos e minimizando problemas como inespecificidade e toxicidade (Zhang et al. 2014)

Esta revisão concentrará nas abordagens quimioproteômicas utilizadas para a descoberta de alvos de fármacos e rastreamento de compostos com potencial terapêutico, como cromatografia de afinidade, perfil de proteínas baseado na atividade e estabilidade, imobilização de moléculas usando microarranjo de proteínas e rastreo virtual.

2 | PROTEÔMICA E QUIMIOPROTEÔMICA

A disponibilidade das sequências genômicas para diversos organismos procariotos e eucariotos tem direcionado a compreensão das bases moleculares da vida em suas diversas formas. No entanto, o conteúdo da informação presente no genoma é limitado e não pode por si só explicar os processos fisiológicos e patológicos complexos, que são, em geral, controlados por proteínas. Neste cenário novas estratégias para a análise sistemática dos produtos gênicos têm ganhado relevância e pesquisas estão sendo direcionadas para as proteínas, na perspectiva de saber quais são e como interagem entre si (Gomase et al. 2008; Wang et al. 2014).

O termo proteína foi introduzido na linguagem científica no ano de 1938,

pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, para descrever um tipo particular de macromoléculas composto por uma cadeia linear de aminoácidos, e que eram abundantes em organismos vivos. Proteínas são as biomoléculas mais abundantes e ocorrem em grande diversidade em um organismo, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares. Catalisam uma grande quantidade de reações químicas, fornecem rigidez estrutural à célula, controlam o fluxo do material através da membrana, regulam as concentrações dos metabolitos, atuam como sensores e chaves, produzem movimentos e controlam a função genética. Devido a essa diversidade de funções, as proteínas exercem um papel fundamental em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica e reprodução (Nelson & Cox 2002).

A técnica de estudo do perfil de proteínas, a proteômica, surgiu no final de 1970 quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas, usando naquela época a técnica de eletroforese bidimensional. O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Williams em 1994, como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento proteico expresso por um tecido ou células diferenciadas (Parker et al. 2010). O proteoma é altamente dinâmico e dependente do estado da célula. Além disso, a complexidade do proteoma não se explica apenas pelo número de proteínas, mas também, devido às inúmeras possibilidades de interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais, as quais apresentam um papel importante na função das proteínas.

As abordagens tradicionais da proteômica inicialmente focavam em estratégias que procuravam decifrar as proteínas que são diferencialmente expressas em qualquer condição de doença ou após o tratamento com algum medicamento, fornecendo informações sobre a identidade e a abundância dessas proteínas. Os objetivos, posteriormente, se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, atividades e estruturas. Além disso, o campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novos fármacos, terapias, diagnósticos, microbiologia e bioquímica (Lau et al. 2003; Leclerc et al. 2014).

Quanto à aplicação da proteômica na descoberta de fármacos, esta se relaciona com processo de deconvolução do alvo, ou seja, na identificação e caracterização de proteínas ligantes a um fármaco de interesse. Este é um passo crucial no desenvolvimento de compostos bioativos que permite a definição da seletividade do composto e na detecção precoce de potenciais efeitos colaterais (Schirle et al. 2012). A deconvolução do alvo pode ser realizada através de ensaios bioquímicos *in vitro* medindo a capacidade do fármaco de interagir com ligantes candidatos e, quando enzimas, a capacidade de interferirem na sua atividade.

Uma abordagem metodológica atualmente empregada para este fim é a quimioproteômica, que representa um novo conceito de pesquisa, focada no estudo

de mecanismos moleculares de ação de compostos bioativos, identificação de alvos moleculares, caracterização de alterações no proteoma induzidas por fármacos e prospecção de fármacos baseados em alvos já elucidados. Dentro do universo da quimioproteômica, uma gama de tecnologias é utilizada com o propósito de identificar alvos moleculares subjacentes à efeitos fenotípicos induzidos por moléculas orgânicas em sistemas complexos. Um dos aspectos que é comum a todas as tecnologias da quimioproteômica é que em determinado momento a afinidade entre a composto bioativo e a sua proteína putativa alvo é explorada, assumindo que a interação é um pré-requisito para efeitos funcionais (Nguyen et al. 2017).

Das estratégias experimentais da quimioproteômica, resultou o desenvolvimento de inibidores de proteínas cinases terapêuticas, principalmente como drogas anticâncer (Colzani et al. 2014). A HSP70 foi revelada como um alvo para o oridonin, um diterpeno anticâncer, em células Jurkat (Dal Piaz et al. 2013). Novos alvos de drogas e marcadores moleculares de vias de tumores de cabeça e pescoço foram identificados, abrindo uma abordagem mais racional para diagnóstico de câncer e terapia individualizado (Wu et al. 2011). Os modos de ação baseado em pesquisa de alvos moleculares de argenilactona e Tiosemicarbazida canfeno no fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foram propostos (Silva et al. 2018; Borba et al. 2018). Além das aplicações *in vitro* descritas acima, muitas estratégias quimioproteômicas podem potencialmente ser adaptadas para a identificação e avaliação do perfil de atividade de alvos em células vivas e em modelos animais (Edgington et al. 2009).

3 | MÉTODOS QUIMIOPROTEÔMICOS DIRECIONADOS AO ESTUDO DE ALVOS PARA FÁRMACOS

3.1 Análise Proteômica Global

É conhecido que para cada tipo celular e condição ambiental, o nível de expressão, modificação e interações das proteínas são diferencialmente detectadas. Em proteômica quantitativa, várias metodologias para envolvidas na análise global do proteoma são disponíveis, tal como eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE), uma metodologia analítica capaz de separar grande quantidade de proteínas em uma única corrida analítica. Neste caso, o gel, já com a amostra aplicada, é submetido a um campo elétrico para separação bidimensional. Na primeira dimensão, a separação ocorre de acordo com os pontos isoelétricos das proteínas (focalização isoelétrica). Já na segunda dimensão, a separação se dá de acordo com suas massas moleculares (Görg et al. 2004). A identificação das proteínas presentes nos géis 2D é realizada excisando-se os spots de proteína, digerindo a proteína com tripsina, extraíndo os peptídeos e identificando estes fragmentos por espectrometria de massas (Godovac-Zimmermann & Brown 2001). Quando combinada com técnicas de marcação fluorescentes, tal como DIGE, os géis 2D permitem análise de alto

rendimento da expressão da proteína e padrões de modificações.

A técnica 2-D PAGE é conceitualmente simples, porém, com várias limitações, como a impossibilidade de se analisar todas as proteínas de uma amostra biológica em um único gel devido à grande variação de abundância das proteínas, a necessidade de se encontrar uma estratégia de solubilização e separação que atenda a todas as proteínas de uma amostra. Proteínas hidrofóbicas requerem solubilização com o uso de surfactantes e requerem múltiplos passos de extração. Proteínas básicas podem requerer técnicas de enriquecimento. Proteínas muito grandes (maiores que 200 kDa) podem não migrar eficientemente no gel, e proteínas muito pequenas (menores que 10 kDa) se sobrepõem (devido a sua alta mobilidade no gel) na segunda dimensão, o que resulta em perda de resolução (Miklos & Maleska 2001).

Em contraposição a análise do perfil proteico por gel 2D, a espectrometria de massas surge como ferramenta imperativa, permitindo o processamento de uma variedade de amostras em uma única análise. Nesta metodologia, a identificação de proteínas se faz após uma digestão proteolítica das proteínas que resulta em uma coleção de peptídeos, os quais são posteriormente ionizados. Após a ionização, os analisadores de massas separam os íons produzidos em função da relação massa/carga (m/z), detectando-os qualitativa e quantitativamente por sua respectiva taxa m/z e abundância. Estes dados são confrontados com informações disponíveis em bancos de dados resultando na identificação das proteínas (Pennington & Dunn 2001).

A aplicação desta metodologia foi utilizada para avaliar o perfil proteico de *Paracoccidioides brasiliensis* na presença de argenilactona e tiossemicarbazida canfeno (Silva et al. 2018; Prado et al. 2015) e de *Aspergillus fumigatus* na após tratamento com voriconazol (Amarsaikhan et al. 2016).

3.2 Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade tem sido reconhecida como uma técnica útil para elucidar ligantes proteicos de moléculas bioativas. Nesta metodologia, uma molécula é imobilizada através de um grupo funcional sobre um suporte sólido, seguido pela adição do extrato proteico. Após vários passos de lavagem, proteínas retidas na coluna devido a afinidade à molécula são eluídas por desnaturação ou competição com ligante livre. As proteínas eluídas em seguida, são separadas por eletroforese em gel e identificadas por espectrometria de massa (Hage et al. 2017).

Uma desvantagem desta abordagem é a ocorrência de ligações inespecíficas. Embora uma lavagem mais rigorosa possa ser utilizada para reduzir os níveis das proteínas contaminantes, há o risco de perder parceiros fracos de ligação. Assim, as interações não-específicas entre um composto e proteínas de ligação muitas vezes levam à dificuldade de determinar a especificidade do ligante primário. Uma proposta para diferenciar parceiros de ligação específico do inespecífico é a adoção de um análogo estrutural inativo da droga que seria gerado como um controle negativo para a avaliação não-biológica das interações relevantes. Ao comparar as proteínas

eluídas, tanto da molécula ativa como do análogo inativo, alvos relevantes podem ser identificados (Katayama & Oda 2007).

Outra estratégia alternativa para distinção de ligação não específica foi descrita por Yamamoto et al. 2006, em que o extrato de proteína é aplicado à resina com o ligante imobilizado, que é subsequentemente removido. Uma nova resina é, em seguida, incubada com o mesmo lisado de proteínas. Ambas as resinas devem capturar a mesma quantidade de proteínas alvo específicas. A necessidade de um análogo inativo como um controle negativo é, por isso, diminuída.

Conceitualmente estratégias distintas, baseadas na cromatografia de afinidade, podem ser desenvolvidas, como por exemplo, a abordagem utilizada por Ylä-Herttua 2003, que não imobiliza o composto bioativo diretamente sobre a resina, mas utiliza colunas de avidina e compostos ligados a biotina. Esta estratégia fundamenta-se na forte interação entre a biotina e a avidina, resultando na imobilização não-reversível do composto bioativo e a resina. A vantagem de fármacos marcados com biotina para purificação por afinidade é a possibilidade do uso da mesma resina de avidina para diferentes moléculas. No entanto, algumas considerações devem ser levantadas antes da utilização deste método, como por exemplo, se a marcação com biotina altera as características de ligação ou atividade biológica do princípio ativo (Lesch et al. 2010).

Uma promissora abordagem, é a captura de um subproteoma usando resina de afinidade e eluição seletiva para proteína alvo. Uma revisão sobre quimioproteômica destacou a vantagens da captura de proteínas pertencentes à classe terapêuticamente relevantes, como quinases, lipases, helicases, desidrogenases, fosforilases, sintetases e transferases (Hall, 2006). Seguindo esta estratégia, Graves et al. 2002 utilizou uma matriz de afinidade de ATP-imobilizado para capturar proteínas de ligação de purinas, que são muitas vezes alvos de fármacos. Bantscheff et al. 2007 imobilizaram vários inibidores da quinase, resultando na captura de um subproteoma de 200 quinases.

3.3 Perfil de Proteínas Baseado na Atividade

Embora os métodos de genômica e proteômica convencionais, que comparativamente quantificam os níveis de expressão dos transcritos e proteínas, têm sido muito úteis, estas plataformas são, no entanto, limitadas na sua capacidade de identificar alterações da atividade da proteína que são causadas por mecanismos pós-traducionais. Assim, considerando que é a atividade de uma enzima determina o seu papel na fisiologia celular e patologia, tecnologias proteômicas que medem diretamente este parâmetro são imprescindíveis.

Neste contexto, a técnica de perfil de proteínas baseado na atividade, utiliza sondas químicas reativas projetadas para se ligarem ao sítio ativo de seus alvos enzimáticos (Li et al., 2007, Nguyen et al., 2017). A estrutura geral das sondas é dividida em três porções funcionalmente distintas: um componente reativo que interage com o sítio catalítico da proteína alvo, uma região de ligação que modula a reatividade e

especificidade do componente reativo, dirigindo-o para diferentes locais ativos das enzimas e uma tag, utilizada para posterior identificação e purificação de enzimas modificadas (Jeffery, 2004). Grupos radioativos, fluoróforos ou mesmo os marcadores de afinidade, tais como biotina, podem ser utilizados como repórteres para marcação das sondas.

Devido às sondas se ligarem aos sítios ativos de seus alvos enzimáticos, elas podem formar a base para o rastreio de inibidores competitivos de enzimas, como hidrolases, proteases (Kidd et al., 2001; Patricelli et al., 2001) e quinases (Yee et al., 2009). Além de monitorar a atividade enzimática específica, as estratégias de perfil de proteínas baseado em atividade também foram usadas para identificar alvos protéicos de produtos naturais (Krysiak & Breinbauer, 2012).

Avanços nesta abordagem metodológica estão sendo desenvolvidas, como por exemplo, a combinação da técnica de perfil de proteínas baseado em atividade com espectrometria de massa, o que permite a identificação de uma variedade de enzimas ativas a partir de uma única amostra (Speers & Cravatt 2009). Além disso, visto que *in vitro*, as análises proteômicas podem, em certos casos, não correlacionar precisamente com a atividade de enzimas *in vivo*, uma versão de ABPP sem tag foi desenvolvida para analisar atividades enzimáticas em células e animais vivos. Esta inovação permite a análise funcional das enzimas nas suas configurações nativas, facilitando, assim, a descoberta de proteínas que são seletivamente ativos *in vivo* (Speers et al. 2003; 2004).

3.4 Perfil de Proteínas Baseado na Estabilidade

O perfil de proteínas baseado na estabilidade é uma metodologia livre de marcação que explora a capacidade do alvo (proteínas), em resposta à afinidade ao ligante (molécula bioativa), mostrar estabilidade frente a proteólise. Essa estabilidade pode ser detectada analisando, por SDS- PAGE e espectrometria de massas, o padrão proteolítico entre amostras controle (sem interação com o composto) e amostras complexadas com o composto. Devido esta metodologia não requerer modificação prévia dos compostos, essa técnica tem possibilitado a elucidação de alvos moleculares de produtos naturais como resveratrol (Lomenick et al., 2011).

O perfil de estabilidade das proteínas também pode ser identificado a partir das taxas de oxidação. Semelhante ao perfil de estabilidade frente a proteólise, o perfil de estabilidade por taxa de oxidação baseia-se na estabilidade que uma molécula bioativa confere a uma proteína. A diferença é que no perfil de estabilidade a partir das taxas de oxidação, se mede as alterações induzidas pela molécula bioativa na taxa de oxidação da metionina de proteínas alvo. Essa metodologia foi o método escolhido para definir o alvo de Manassantin A, um produto natural que mostrou ter atividade anticancerígena (Geer Wallace et al., 2016). Um dos fatores limitantes da técnica é que apenas as proteínas mais abundantes em cada amostra podem ser identificadas

e quantificadas com precisão.

3.5 Microarranjo de Proteínas

O microarranjo de proteína, também denominado chip de proteína, foi criado para a imobilização de diferentes proteínas numa superfície sólida possuindo uma variedade de aplicações, incluindo a identificação de interações proteína-proteína, as interações proteína-fosfolípideo, proteína-moléculas. Na perspectiva de avaliar interações molécula bioativa e proteína, esta técnica tem se destacado e consiste na imobilização de moléculas de proteínas recombinantes ou anticorpos sobre a superfície de vidro ou silício. Compostos de interesse, marcados para a detecção, são adicionados a fim de monitorar a ligação das proteínas do chip (Yang et al. 2011),

A vantagem desta técnica é que várias proteínas podem ser imobilizadas sobre a superfície, de tal modo que a afinidade das moléculas de interesse pode ser avaliada para uma multiplicidade de parceiros proteicos simultaneamente. Huang et al. 2004 usaram microarranjo de proteínas de levedura para estudar interações proteína-droga. Eles utilizaram uma matriz com uma molécula biotinizada, inibidora da rapamicina, para encontrar alvos de proteínas que podem estar envolvidos na via de resposta alvo-rapamicina (TOR). Ptacek et al. 2005 estudaram a fosforilação de proteínas em leveduras com o uso de chips proteínas.

Por outro lado, moléculas bioativas imobilizadas podem ser utilizadas para ligar a proteínas específicas de interesse. A imobilização destas moléculas representa um grande desafio, neste caso, uma vez que não existe uma estratégia geral para imobilizar estruturas químicas à superfície do chip de proteínas. No entanto, uma vez gerada, matrizes químicas permitem rastreio de grandes bibliotecas de compostos imobilizados para ligação a uma proteína específica de interesse (Ma & Horiuchi 2006).

4 | QUIMIOPROTEÔMICA NA TRIAGEM DE BIBLIOTECAS DE COMPOSTOS

Com o aumento tanto do número de compostos disponíveis, bem como a elucidação de alvos moleculares, uma mudança no processo de pesquisa por novos fármacos tem emergido. Neste contexto, as técnicas de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS - *high throughput screening*) e de triagem virtual (VS - *virtual screening*) são vistas como elementos-chave para o preenchimento do pipeline de descoberta de drogas na indústria com novos compostos químicos e novos modos de ação (Mayr & Fuerst 2008).

A triagem biológica automatizada em alta escala propicia a avaliação biológica *in vitro* de vários compostos contra uma proteína alvo ou sistema celular definido. Os processos de triagem em alta escala evoluíram consideravelmente nas últimas décadas, graças aos progressos da tecnologia da robotização e de equipamentos automatizados que tornaram possível a realização de ensaios miniaturizados de forma

rápida, eficiente e confiável. Estes ensaios têm sido aplicados na identificação de moléculas inibidoras contra atividade de protease NS3/4A do vírus da hepatite C (Lee et al. 2013) e de fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* (Arora et al. 2014).

Por outro lado, a pesquisa por novos compostos baseado em métodos *in vitro*, é um processo oneroso, que demanda tempo e com grande taxa de insucesso. Assim, a identificação de compostos empregando estratégias computacionais tem sido constantemente empregada. Ao filtrar grandes bibliotecas de compostos em conjuntos menores passíveis de serem testados experimentalmente e orientar a otimização dos compostos, seja para aumentar a afinidade ou otimizar o metabolismo dos fármacos, as metodologias *in silico* tem um papel importante no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

A triagem virtual é um método *in silico*, com o objetivo de identificar moléculas com potencial de interação com proteínas alvos ou predição de estruturas passíveis de terem atividade biológica, minimizando o risco de posterior rejeição (Villoutreix, 2016). Duas estratégias de triagem virtual são conhecidas: (i) triagem virtual baseada na estrutura do ligante, onde moléculas podem ser avaliadas quanto a similaridade de ligantes com atividade biológica já conhecida, e (ii) triagem virtual baseada na estrutura do receptor, onde moléculas são triadas levando em consideração seu potencial de ligação a sítios de ligação de proteínas validadas como alvos (Lavecchia & Di Giovanni, 2013; Katsila et al., 2016).

Os métodos de triagem virtual baseados na estrutura do ligante se fundamentam em estudos de similaridade ou na construção de relação estrutura-atividade preditiva e quantitativa (Kalyaanamoorthy & Chen, 2011). As buscas por similaridade química envolvem a geração de impressões digitais moleculares para todas as moléculas disponíveis em bancos de dados, progredindo posteriormente para a comparação com um ligante de referência, o que permite a classificação dos compostos em relação à sua similaridade química (Geppert et al., 2010).

Dentre as diferentes metodologias de triagem virtual baseada no ligante, destaca-se i) a triagem baseada em formas, a qual baseia-se no conceito de que compostos que compartilham similaridade na forma e volume molecular também poderiam compartilhar similaridade quanto a atividade biológica. A semelhança da forma é determinada através de métodos de alinhamento, que constroem uma sobreposição tridimensional de duas formas ou através de métodos vetoriais, que reduzem as formas de um composto a um vetor com características de menor dimensão que são comparados numericamente. Além do volume estérico, as características eletrostáticas ou farmacopéicas da forma são consideradas para avaliação da similaridade (Koes & Camacho, 2014), ii) Docagem molecular, metodologia que possibilita a seleção de moléculas bioativas apresentando um conjunto favorável de interações intermoleculares, com base em um determinado mecanismo e modo de ligação. Um requerimento para essa abordagem é o conhecimento prévio da estrutura tridimensional da proteína, que pode ser representada experimentalmente, ou representada por um modelo construído a partir

de proteínas homólogas com alta identidade (Lavecchia & Di Giovanni 2013).

Utilizando a triagem virtual, vários compostos foram propostos para inibir o crescimento de *P. brasiliensis*, tendo como alvo proteínas como malato sintase (Costa et al. 2015) e tioredoxina redutase (Abadio et al., 2015). Além disso, diferentes métodos, baseado em triagem virtual foram empregados para selecionar produtos naturais com potencial atividade anticancerígena (Cavalcante et al. 2018).

5 | CONCLUSÃO

A quimioproteômica, área multidisciplinar, tornou-se indispensável na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Embora as tecnologias disponíveis divirjam nas coberturas e limitações, elas podem ser usadas em um contexto mais amplo, integradas entre si, resultando em abordagens mais eficazes para a obtenção do perfil dos alvos de novas drogas que tornam, assim, os futuros medicamentos mais eficientes, confiáveis e menos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABADIO, A.K. et al. **Identification of new antifungal compounds targeting thioredoxin reductase of *Paracoccidioides* Genus.** PLoS One. 2015. 10(11):e0142926.

AMARSAIKHAN, N. et al. **Proteomic profiling of the antifungal drug response of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole.** Int J Med Microbiol. 2008. 307(7):398-408.

ARORA, G. et al. **High Throughput Screen Identifies Small Molecule Inhibitors Specific for *Mycobacterium tuberculosis* Phosphoserine Phosphatase.** J Biol Chem. pii: 2014. jbc. M114.597682.

BANTSCHEFF, M. et al. **Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors.** Nat Biotechnol. 2007. 25:1035-1044.

BORBA, J.V.V.B. et al. **Chemoproteomic identification of molecular targets of antifungal prototypes, thiosemicarbazide and a camphene derivative of thiosemicarbazide, in *Paracoccidioides brasiliensis*.** PLoS One. 2018. 13(8):e0201948.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.M. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios.** Gazeta Médica da Bahia. 2008. Bahia 78: 98-106.

CAVALCANTI, É.B.V.S. et al. **Virtual screening of natural products to select compounds with potential anticancer activity.** Anticancer Agents Med Chem. 2018.

COLZANI, M. et al. **Quantitative chemical proteomics identifies novel targets of the anti-cancer multi-kinase inhibitor E-3810.** Mol Cell Proteomics. 2014. 13:1495-1509.

COSTA, F.G. et al. **Alkaloids as inhibitors of malate synthase from *Paracoccidioides* spp.: receptor-ligand interaction-based virtual screening and molecular docking studies, antifungal activity, and the adhesion process.** Antimicrob Agents Chemother. 2015. 59(9):5581-94.

DAL PIAZ, F et al. **Chemical proteomics reveals HSP70 1A as a target for the anticancer**

diterpene oridonin in Jurkat cells. J Proteomics. 2013. 82:14-26.

EDGINGTON, L.E. et al. **Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes.** Nat Med. 2009. 15: 967-973.

FERREIRA, F.G. et al. **Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado.** Revista Eletrônica de Farmácia. Goiás. 2009. 6: 14-24.

GEER WALLACE, M.A. et al. **Discovery of Manassantin A Protein Targets Using Large-Scale Protein Folding and Stability Measurements.** J Proteome Res. 2016. 15(8):2688-96.

GEPPERT, H.; VOGT, M., BAJORATH, J. **Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation.** J. Chem. Inf. Model. 2010. 50:205-216.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L.R. **Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics.** Mass spectrometry reviews. 2001. 20: 1-57.

GOMASE, V.S. et al. **Proteomics: technologies for protein analysis.** Curr Drug Metab. 2008. 9(3):213-20.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 2004. 4: 3665-3685.

GRAVES, P.R. et al. **Discovery of novel targets of quinolone drugs in the human purine binding proteome.** Mol Pharmacol. 2002. 62:1364-1372

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** Revista Estudos Avançados. 2010. 24:81-98.

HAGE, D.S. **Analysis of Biological Interactions by Affinity Chromatography: Clinical and Pharmaceutical Applications.** 2017. Clin Chem. 2017. 6(6):1083-1093.

HALL, S.E. **Chemoproteomics-driven drug discovery: addressing high attrition rates.** Drug Discov Today. 2006. 11: 495-502.

HUANG, J. **Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips.** Proc Natl Acad Sci. 2004.101: 16594–16599.

JEFFERY, D.A.; BOGYO, M. **Chemical proteomics and its application to drug discovery.** Drug Discov Today. 2004. 15:19-26.

KALGUTKAR, A.S.; DALVIE, D. **Predicting toxicities of reactive metabolite-positive drug candidates.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2015. 55:35-54.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y.P. **Structure-based drug design to augment hit discovery.** Drug Discov. Today. 2011. 16:831-39.

KATAYAMA, H.; ODA, Y. **Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography.** J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2007. 855:21-27.

KATSILA, T. et al. **Computational approaches in target identification and drug Discovery.** Comput. Struct. Biotechnol. J. 2016. 14:177-184.

KIDD, D.; LIU, Y.; CRAVATT, B.F. **Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes.**

Biochemistry. 2001. 40:4005-4015.

KOES, D.R.; CAMACHO, C.J. **Shape-based virtual screening with volumetric aligned molecular shapes.** J Comput Chem. 2014. 35(25):1824-34.

KRYSIAK, J.; BREINBAUER, R. **Activity-based protein profiling for natural product target discovery.** top Curr Chem. 2012. 324:43-84.

LAGE, K. **Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome.** Biochim Biophys Acta. 2014. 4439(14):00156-2.

LAU, A.T.; HE, Q.Y.; CHIU, J.F. **Proteomic technology and its biomedical applications.** Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). 2003. 35(11):965-75.

LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. **Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review.** Curr. Med. Chem. 2013. 20(23):2839-2860.

LECLERC, D. et al. **Quantitative proteomics reveals differentially expressed proteins in murine preneoplastic intestine in a model of intestinal tumorigenesis induced by low dietary folate and MTHFR deficiency.** Proteomics. 2014. doi: 10.1002/pmic.201400280.

LEE, H. **High-throughput screening (HTS) and hit validation to identify small molecule inhibitors with activity against NS3/4A proteases from multiple hepatitis C virus genotypes.** PLoS One. 2013. 8: e75144.

LESCH, H.P. **Avidin-biotin technology in targeted therapy.** Expert Opin Drug Deliv. 2010. 7(5):551-64.

LI, W.; BLANKMAN, J.L.; CRAVATT, B.F. **A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases.** J Am Chem Soc. 2007. 129: 9594-9595.

LOMENICK, B. et al. **Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS).** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(51):21984-9.

MA, H.; HORIUCHI, K.Y. **Chemical microarray: a new tool for drug screening and discovery.** Drug Discov Today. 2006.11: 661-668.

MATTHEWS, H.; HANISON, J.; NIRMALAN, N. **"Omics"-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives.** Proteomes. 2016. 12;4(3). pii: E28.

MAYR, L.M.; FUERST, P. **The future of high-throughput screening.** J Biomol Screen. 2008. 13: 443-448.

MIKLOS, G.L.G.; MALESZKA, R. **Protein functions and biological contexts.** Proteomics. 2001. 1:169-178.

NGUYEN, C.; WEST, G.M.; GEOGHEGAN, K.F. **Emerging Methods in chemoproteomics with Relevance to Drug Discovery.** Methods Mol Biol. 2017. 1513:11-22.

PARKER, C.E.; WARREN, M.R.; MOCANU, V. **Mass Spectrometry for Proteomics.** Neuroproteomics. 2010.

PATRICELLI, M.P. et al. **Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteome using fluorescent active site-directed probes.** Proteomics. 2001. 1: 1067-1071.

PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. **Proteomics: from protein sequence to function.** New

York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers. 2001. 1v.

PRADO, R.S. et al. **Proteomic profile response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal argentilactone.** Front Microbiol. 2015. 6:616.

PTACEK, J. et al. 2005. **Global analysis of protein phosphorylation in yeast.** Nature 438: 679-684.

SCHIRLE, M.; BANTSCHIEFF, M.; KUSTER, B. **Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery.** Chem Biol. 2012. 19: 72–84.

SILVA KS, et al. **Response of *Paracoccidioides lutzii* to the antifungal camphene thiosemicarbazide determined by proteomic analysis.** Future Microbiol. 2018. 13:1473-1496.

SILVA, L.D.C. **Argentilactone Molecular Targets in *Paracoccidioides brasiliensis* Identified by Chemoproteomics.** Antimicrob Agents Chemother. 2018. 62(11).

SPEERS, A.E.; ADAM, G.C.; CRAVATT, B.F. **Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.** 2003. J Amer Chem Soc 125: 4686-4687.

SPEERS, A.E.; CRAVATT, B.F. **Activity-Based Protein Profiling (ABPP) and click chemistry (CC)-ABPP by MudPIT Mass Spectrometry.** Curr Protoc Chem Biol . 2009. 1: 29-41.

SPEERS, A.E.; CRAVATT, B.F. **Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods.** Chem Biol. 2004. 11: 535-546.

WANG, G et al. **Diazonamide toxins reveal an unexpected function for ornithine delta-amino transferase in mitotic cell division.** Proc Natl Acad Sci. 2007. 104: 2068-2073.

WANG, K.; HUANG, C.; NICE, E. **Recent advances in proteomics: towards the human proteome.** Biomed Chromatogr. 2014. 28(6):848-57.

WU, Z. et al. **Quantitative chemical proteomics reveals new potential drug targets in head and neck cancer.** Mol Cell Proteomics. 2011. 10(12) M111.011635.

YAMAMOTO, K. et al. 2006. **A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins.** Anal Biochem 2006. 352:15-23.

YANG, L et al. **Protein microarrays for systems biology.** Acta Biochim Biophys. 2011. 43:161-171.

YEE, M.C. et al. **A cell-permeable activity-based probe for protein and lipid kinases.** J Biol Chem. 2005. 280: 29053-29059.

YLÄ-HERTTUALA S. **Novel targeting of biotinylated compounds to local tissues with avidin-lipoprotein receptor fusion protein.** Discov Med. 2003. 3(19):47-8.

ZHANG H. M. et al. **Application of genomics and proteomics in drug target discovery** Genet Mol Res. 2014. 13(1):198-204.

ZHU Y, et al. (2015). Application of chemical biology in target identification and drug discovery. Arch Pharm Res. 2015. 38(9):1642-50.

SOBRE O ORGANIZADOR

Benedito Rodrigues da Silva Neto - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia. Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Também possui seu segundo Pós doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com Análise Global da Genômica Funcional e aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Palestrante internacional nas áreas de inovações em saúde com experiência nas áreas de Microbiologia, Micologia Médica, Biotecnologia aplicada a Genômica, Engenharia Genética e Proteômica, Bioinformática Funcional, Biologia Molecular, Genética de microrganismos. É Sócio fundador da “Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde” (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Como pesquisador, ligado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. arroz, milho, sorgo, plantas de cobertura e integração lavoura pecuária. E-mail para contato: alan_zuffo@hotmail.com

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-421-4

