

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE  
LARVAS DE *Grapsus grapsus* LINNAEUS, 1758 (DECAPODA, GRAPSOIDEA)  
EM AMOSTRAS DE PLÂNCTON**

CURITIBA

2010

PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE  
LARVAS DE *Grapsus grapsus* LINNAEUS, 1758 (DECAPODA, GRAPSOIDEA)  
EM AMOSTRAS DE PLÂNCTON**

Monografia apresentada à disciplina  
de Estágio em Zoologia como  
requisito parcial à conclusão do curso  
de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná,

Orientador: Prof. Dr. Marcio R. Pie

Curitiba  
2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Délcio e Ivete Ströher, pelo amor inesgotável, por tudo o que me ensinaram, por todo apoio e esforços durante minha graduação, tão distante de casa, mas sempre muito próximos em meus pensamentos. Nada conseguiria sem vocês e estas palavras de gratidão por mais que me esforce sempre serão insuficientes para expressar o que sinto. Obrigada.

Obrigada ao meu irmão Ricardo, companheiro, amigo, que desde 2008 por “minha culpa” juntou-se a mim como estudante da UFPR compartilhando filas no RU, risadas, dificuldades, saudades dos pais, mas pelo menos desde então sempre tive meu “maninho” por perto que com o seu bom humor sempre deixa tudo mais fácil.

Agradeço ao meu namorado Bruno Marena Garotti, por me ouvir empolgada contando tudo o que havia feito no dia, por sua ajuda, por suas palavras de apoio, estímulo e carinho.

Muito mais que obrigada, agradeço especialmente meu orientador Prof. Marcio Roberto Pie. Agradeço pela orientação e palavras amigas. Obrigada pela paciência e auxílio na realização deste trabalho através de seu amplo e notório conhecimento.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram nas análises práticas e em especial à Carina Firkowski por sua atenção, paciência sempre me ajudando e ensinando, sua colaboração foi muito importante para que conseguisse realizar este trabalho.

Aos meus amigos também deixo o meu muito obrigada! Em especial à Paloma Minervini Teixeira e Fabiana Silveira, com quem dividi ótimos momentos durante toda a minha graduação.

*“Daria tudo que sei em troca da metade que ignoro”*

Descartes

## RESUMO

O estudo de larvas de decápodes usualmente é feito com base em sua morfologia, fato que requer profissionais altamente especializados e capacitados, além de ser demorado. Como alternativa, o presente estudo desenvolveu um método molecular para a detecção de larvas do caranguejo da espécie *Grapsus grapsus*, que é mais rápido e de maiores garantias de sucesso. O marcador espécie-específico se mostrou altamente eficiente no seu propósito, sendo aprovado em todos os testes realizados: detectou a presença de material genético de *G. grapsus* todas as vezes que este esteve presente nas reações, e em nenhum momento amplificou o material genético das espécies próximas que foram usadas como controle da especificidade. Além disso, apresentou uma alta sensibilidade, sendo capaz de detectar amostras que contenham de 300 ng a 0,03 ng de material genético de *G. grapsus*. Deste modo, o marcador molecular desenvolvido será muito útil em estudos com esta espécie que envolvam hábitos de vida, dispersão, estudo de populações e distribuição geográfica.

**Palavras-chave:** Marcador Molecular. *Grapsus grapsus*. Larvas Planctônicas.

## ABSTRACT

The study of decapod larvae is usually done based on morphology, which requires highly skilled specialized and trained professionals, besides being time consuming. As an alternative, this study developed a molecular method for detection crab larvae of the species *G. grapsus* in plankton samples. This method is faster and more efficient than the traditional method. The species-specific molecular marker proved highly efficient for its purpose, being approved in all tests: detected the presence of genetic material of *G. grapsus* all the time which it was present in the reactions, and it never amplified the genetic material from closely related species, that were used as control for specificity. Moreover, the molecular marker showed a high sensitivity, being able to detect samples containing 300ng - 0.03 ng of the genetic material of *G. grapsus*. Therefore, the developed molecular marker will be very useful in studies with this species that involve lifestyle, dispersion, study of populations and geographic distribution.

**Key words:** Molecular marker, *Grapsus grapsus* and planktonic larvae

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - <i>G. grapsus</i> .....	10
FIGURA 2- VARIAÇÃO DOS MARCADORES USADOS EM TRABALHOS CIENTÍFICOS AO LONGO DOS ANOS.....	18
FIGURA 3- GENOMA MITOCONDRIAL .....	20
FIGURA 4- BIOEDIT- SOFTWARE UTILIZADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.....	24
FIGURA 5- ESPECIFICIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1.....	27
FIGURA 6- SENSIBILIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1 .....	28
FIGURA 7- ESPECIFICIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1 EM AMOSTRAS DE PLÂNCTON DO LITORAL SUL BRASILEIRO .....	29

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 <i>G. grapsus</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Larvas Planctônicas .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Marcadores Moleculares .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *G. grapsus*

Caranguejos são animais definidos na classificação zoológica atual como pertencentes ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda e Infra-Ordem Brachyura. Os braquiúros, também conhecidos como caranguejos verdadeiros são, na sua maioria, marinhos, mas espécies dulcícolas, semiterrestres e terrestres de ambientes úmidos ocorrem nos trópicos (BRUSCA e BRUSCA, 2003). Mais de 4.500 espécies já foram descritas, representando os decápodes mais bem-sucedidos (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os decápodes (camarões, siris, caranguejos e lagostas) possuem carapaça fundida recobrendo todos os segmentos torácicos, olhos pedunculados e os três primeiros pares de apêndices torácicos modificados em maxilípedes. Em vários grupos o primeiro par de apêndices ambulatórios (dos cinco existentes) é modificado para formar quelas (pinças) como no caso dos caranguejos (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2003).

A espécie alvo deste trabalho, o caranguejo *Grapsus grapsus* (FIGURA 1) pertence à família Grapsoidea cuja monofilia é indicada além das semelhanças morfológicas por dados moleculares de genes mitocondriais (SCHUBART *et al.*, 2006). Esta espécie ocorre preferencialmente em ilhas oceânicas (MELO, 1996) e possui uma ampla distribuição geográfica, incluindo as costas dos Estados Unidos, Cuba, Peru e Galápagos (Equador) onde é a espécie de caranguejo mais proeminente, aparecendo devido sua coloração vermelho-amarelada da carapaça, como “salpicos de cores vivas no escuro substrato de lavas vulcânicas” (HICKMAN e ZIMMERMAN, 2000). No Brasil há registro da sua ocorrência nas ilhas Atol das Rocas, Fernando de Noronha, Arquipélago de São Pedro e São Paulo e Trindade. Sua preferência por ilhas oceânicas (principalmente no Brasil) o coloca em um expressivo isolamento geográfico.

Trata-se de uma espécie pouco estudada e pouco também se conhece sobre sua biologia. Este caranguejo costuma habitar costões rochosos, e por isto está sob constantes condições ambientais extremas. Não há registros de predadores naturais. É um animal muito ágil, que se movimenta rapidamente entre as rochas onde se esconde nas fendas, sua carapaça quando adulto pode variar de 5-7cm (BAIRD,1978), pode se alimentar de algas assim como de cracas e outros invertebrados, ocasionalmente também pode se alimentar de carniças (ROMERO, 2003).



FIGURA 1 - *Grapsus grapsus* Linnaeus, 1758 (Decapoda, Grapsoidea)

FONTE: SHAPIRO, LEO. (2010)

No Brasil, no Arquipélago de São Pedro e São Paulo há a descrição da interação de *G. grapsus* com a o atobá marrom (*Sula leucogaster*), em que esta ave funciona como uma importante fonte de alimento para o caranguejo, na medida em que este se alimenta de ovos quebrados e aves mortas, fazendo uma “limpeza” no ninho (GIANUCA e VOOREN, 2007). No entanto também pode se portar como um predador, principalmente de filhotes, quando fica próximo aos ninhos à espera da oportunidade de devorar uma pequena ave (BOTH e FREITAS, 2004). Há também a descrição de canibalismo durante a reprodução no momento da cópula (ROMERO, 2003). Os adultos possuem um hábito de vida mais solitário, enquanto os mais jovens (que ainda estão com a carapaça mais escura) costumam formar grupos de indivíduos do mesmo tamanho (BAIRD, 1978). Uma vez adulto *G. grapsus* se reproduz durante todo o ano e pode mostrar um ritmo lunar em que a eclosão dos ovos coincide com a lua cheia ou nova (WARNER, 1977). Mesmo terrestre ainda depende do oceano para a sua reprodução, no desenvolvimento larval e também para a sua distribuição geográfica, tendo em vista que está é a principal fase de dispersão. Segundo Gurney (1960) a larva de *G. grapsus* é uma típica zoea, com longos espinhos rostrais, dorsais e laterais sobre a carapaça e pelo fato de suas larvas serem livres planctônicas alicerça-se o presente trabalho. O termo larva aqui empregado refere-se a um estágio, ou uma série de estágios, em uma seqüência de desenvolvimento ontogenético (VENTURA e PIRES, 2002).

## 1.2 LARVAS PLANCTÔNICAS

Pela duração da vida planctônica, segundo Omori & Ikeda (1984), os animais do plâncton (zooplâncton) podem ser divididos em duas categorias básicas: (1) o holoplâncton, que inclui organismos que passam todo o seu ciclo de vida como membros do plâncton, e (2) o meroplâncton, representado por ovos, larvas e juvenis de muitos animais que ocorrem apenas em parte do seu ciclo vital no plâncton, como é o caso de *G. grapsus*. Dentre os crustáceos, as larvas de decápodes, frequentemente alcançam densidades altas o suficiente para representarem o

segundo grupo mais abundante nas regiões costeiras brasileiras, superadas apenas por copépodes (BRANDINI *et al.*, 1997), além de representarem um importante componente da cadeia trófica, servindo de alimento para peixes e outros invertebrados de maior porte (SCHWAMBORN *et al.*, 2001). No ambiente pelágico, diferentes fases larvares apresentam morfologia e hábitos diferentes dos adultos. Desta forma, pode existir pouca semelhança também entre as fases do desenvolvimento de uma mesma espécie (BONECKER, 2006). De acordo com Warner (1967), há uma alta mortalidade no período larval, sendo que de cada mil larvas eclodidas apenas uma chega ao estágio juvenil, este fato é compensado com a imensa quantidade de ovos liberados. Assim a vantagem na produção de larvas planctônicas está no aumento da dispersão natural que além de diminuir a competição intraespecífica permite uma rápida colonização em áreas distantes, além da grande quantidade de alimento disponível no plâncton (POHLE *et al.*, 1999). Como desvantagem pode-se citar a alta vulnerabilidade à predação e a possível falha em encontrar um habitat adequado para completar o seu ciclo de vida, o que explica a alta mortalidade comentada anteriormente.

A detecção e o estudo de larvas planctônicas se fazem usualmente por meio de coleta do plâncton e análise das amostras com uso de lupas, um trabalho árduo e demorado. A identificação de espécies através de larvas também não é simples e requer um grande conhecimento específico tendo em vista que caracteres como a forma geral da larva, a morfologia dos apêndices, a presença de espinhos, distribuição e tipos de cerdas, entre outros (BONECKER, 2006) utilizados neste tipo de identificação não são fáceis de observar, ainda mais no caso das larvas de *G. grapsus*, que como foi dito anteriormente, possuem uma larva zoea típica, sem grandes diferenciações específicas. Durante muito tempo, não só em estudos planctônicos, a maneira tradicional de observação da natureza esteve limitada a estudos comparativos da morfologia. Porém com o desenvolvimento da genética e, posteriormente, da biologia molecular, uma nova e rica fonte de caracteres foi descoberta (GARRAFFONI e NEGRELLO-FILHO, 2007).

### 1.3 MARCADORES MOLECULARES

Uma técnica que permita agilidade na detecção de larvas planctônicas, sem a perda da acuidade (e até melhoria desta) é o uso de marcadores moleculares espécie-específicos. Há na literatura descrição de outros marcadores moleculares de sucesso para larvas planctônicas, como no caso de mexilhão dourado (PIE *et al.*, 2006, BOEGER, *et al.*, 2007).

O advento da biologia molecular permitiu o avanço desta técnica que se baseia nas diferenças genéticas, e no caso de um marcador espécie-específico, nas diferenças entre as espécies. Esta ferramenta proporcionou uma grande melhoria no estudo de populações, desde sua diversidade, estruturação, ecologia e relacionamento com outros grupos. Isto permite, inclusive, com o auxílio de dados fósseis a reconstrução da história evolutiva dos grupos. Os marcadores moleculares podem ser considerados como uma revolução dentro de genética de populações, uma vez que, não se faz mais necessário a existência de organismos mutantes que manifestem diferenças visíveis, para se estudar a sua genética (PAVINATO, 2010). Esta revolução veio por meio de uma imensidade de dados gerados pelos métodos moleculares em estudos de polimorfismos genéticos, estes permitem que as populações sejam estudadas independentemente da espécie ou habitat sem que haja a necessidade de cruzamentos controlados, ou qualquer outra técnica tradicional anterior (HARTL, 2008).

Um grande passo metodológico acerca do uso de marcadores moleculares é a PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 revolucionou a Biologia Molecular, pois possibilitou uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências, além de requerer quantidades muito pequenas de DNA (FARAH, 2000). O método conta com a amplificação de milhares de segmentos aleatórios ou específicos de DNA, via síntese enzimática *in vitro*, por meio de um aparelho que

gera ciclos de alternância de temperatura (TORRES, 2006). Este processo ocorre em três etapas básicas: (1) desnaturação do DNA original, (2) anelamento dos iniciadores de reação (primers) e (3) extensão das novas cadeias polinucleotídicas. Primers ou iniciadores podem ser definidos como uma pequena sequência de nucleotídeos, na qual podem ser adicionadas desoxirribonucleotídeos (A,C,G ou T) pela DNA polimerase, para síntese de DNA artificial (BORÉM e SANTOS, 2002). Estas etapas, desnaturação, anelamento e síntese correspondem a um ciclo, em uma reação completa de PCR estes ciclos são repetidos muitas vezes, em geral entre 30 a 40 ciclos. O uso deste aparelho que alterna as temperaturas (termociclador) se faz necessário, tendo em vista que cada uma destas etapas ocorre em temperaturas diferentes, que variam também conforme a origem do DNA em questão. Assim a PCR explora a capacidade de duplicação de DNA.

A região do DNA a ser sintetizada é definida pelos primers, que se anelam especificadamente às suas sequências complementares da fita molde do DNA original, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar. Embora os oligonucleotídeos, que atuam como primers, possam ser muito pequenos (geralmente cerca de 20pb), eles devem ser suficientemente grandes para identificar uma única sequência complementar do genoma que está sendo analisado, garantindo desta forma a amplificação específica do fragmento que se deseja. A escolha dos primers é um dos pontos críticos na eficiência da PCR. No final do processo o DNA produzido pode ser visualizado em gel de agarose ou poliacrilamida (FARAH, 2000).

Um marcador molecular é definido como “qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA” (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) e que assim permite a distinção de indivíduos ou grupo de indivíduos geneticamente diferentes. Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens em relação aos marcadores morfológicos tradicionais como, por exemplo, a neutralidade fenotípica, as raras interações epistáticas ou pleiotrópicas e podem

ser detectados em qualquer fase do ciclo de vida. Estes marcadores possuem um amplo potencial para responder muitas questões em biologia que vão desde relações de parentesco, conectividade entre populações, diferenciação taxonômica até respostas sobre relações filogenéticas (AVISE, 1994). Também vale destacar o uso de marcadores nas questões forenses, no reconhecimento de criminosos por amostras de DNA deixadas no local do crime e pelo reconhecimento de relações familiares a exemplo do que ocorreu na Argentina, onde filhos de pessoas desaparecidas durante o regime militar foram identificados com suas avós maternas através da análise do DNA mitocondrial (FARAH, 2000), assim como, este tipo de identificação foi usado nos corpos carbonizados no ataque terrorista do World Trade Center em Nova York (BORÉM e SANTOS, 2002).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares, entre os principais, vale destacar:

- Alocima: é um marcador baseado não em DNA, mas sim um método indireto de avaliar a variação genética por meio das variantes de proteína das enzimas que podem ser distinguidas por eletroforese em gel. Devido à sua relação custo-eficácia, muitas populações com grande tamanho de amostra são estudadas com alozimas;
- RFLP- Polimorfismo de Restrição do Tamanho do Fragmento (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*)- que se baseia em endonucleases de restrição, descobertas em 1960 por Arber, Smith e Nathans (SCHLÖTTERER, 2004), porém o seu uso como marcador molecular só foi proposto no início dos anos 80 por Alec Jeffreys. Estas enzimas (endonucleases) cortam o DNA em locais específicos que diferem entre indivíduos gerando tamanhos de fragmento também diferentes. Os sítios de restrição são como uma impressão digital e permitem a identificação de forma precisa e inequívoca do indivíduo. Uma das principais vantagens deste

marcador é a sua expressão co-dominante que permite distinguir indivíduos homozigóticos de indivíduos heterozigóticos. Assim a variação do tamanho de fragmentos obtidos de diferentes indivíduos após a digestão com as enzimas de restrição, deu origem a esta classe de marcadores (BORÉM e SANTOS, 2002).

- Minissatélites: técnica semelhante à análise RFLP, já que o primeiro passo também envolve a digestão por enzimas de restrição. No entanto, trata-se de uma classe diferente de marcador por se constituir de repetições por sequências em tandem (uma após a outra), alinhadas lado a lado (6 a 50), como “vagões de um trem”. Os polimorfismos de minissatélites são geralmente chamados de VNTRs (do inglês *variable number of tandem repeats*- número variável de repetições em tandem) (MICKLOS e FREYER, 2005);
- Microsatélites: também são regiões repetidas em tandem, mas diferem dos minissatélites pelo número de repetições (2 a 5). Acredita-se que estas repetições curtas de DNA originem-se quando a DNA polimerase “tropeça” durante a replicação, perdendo sua orientação e adicionando uma unidade extra. Desta maneira, as regiões repetitivas podem aumentar de tamanho no transcorrer da evolução. Os polimorfismos de microsatélites são conhecidos como STRs (do inglês *short tandem repeats*- repetições curtas em tandem) (MICKLOS e FREYER, 2005). Como são altamente polimórficos, abundantes e bem distribuídos em todo genoma de eucariotos tornaram-se um dos marcadores mais populares para o mapeamento genético, testes de paternidade e genética de populações (SCHLÖTTERER, 2004);
- RAPD- técnica baseada na PCR que depende da utilização de primers curtos que podem se ligar a vários locais do genoma. O RAPD (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*- DNA polimórfico amplificado randomicamente)



utiliza uma sequência de oligonucleotídeos sintética como iniciador (primer) do processo de amplificação, que produz um polimorfismo detectado pela presença ou ausência de bandas discretas de DNA. Uma grande vantagem desta técnica é a obtenção de “fingerprints” (impressões digitais) genômicos de indivíduos, variedades e populações. Semelhante ao RAPD por usarem PCR e dependerem de primers são os marcadores ISSRS (do inglês *Inter-Simple Sequence Repeats*- amplificação inter repetições de seqüência simples), IRAPs (do inglês *Inter-retronson Amplified Polymorphisms*- amplificação de regiões entre transposons) e AFLPs (do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfismos amplificados do comprimento do fragmento);

- SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism* é um marcador que foca em apenas uma única mudança de posição de um nucleotídeo no genoma. Sua principal vantagem é seu elevado potencial para a análise automatizada de alto rendimento a um custo moderado (SCHLÖTTERER, 2004);
- Sequenciamento de DNA - mesmo não sendo um marcador no sentido estrito, esta técnica tem sido frequentemente usada em genética de populações para a inferência de padrões demográficos, mesmo que inicialmente este método tenha sido demorado e caro, atualmente o sequenciamento completo de genomas está cada vez mais barato e rápido a sua principal vantagem é oferecer informações completas de todo o genoma, especialmente para espécie com baixo índice de polimorfismo (SCHLÖTTERER, 2004).

Com esta vasta gama de marcadores, alguns mais antigos e outros mais recentes, é natural que ao longo do tempo os trabalhos científicos usassem mais frequentemente um tipo de marcador com relação a outros, além de levar em conta a disponibilidade de métodos e equipamentos do

laboratório a escolha parece ser influenciada pelo marcador “da moda” como exemplificado na FIGURA 2.

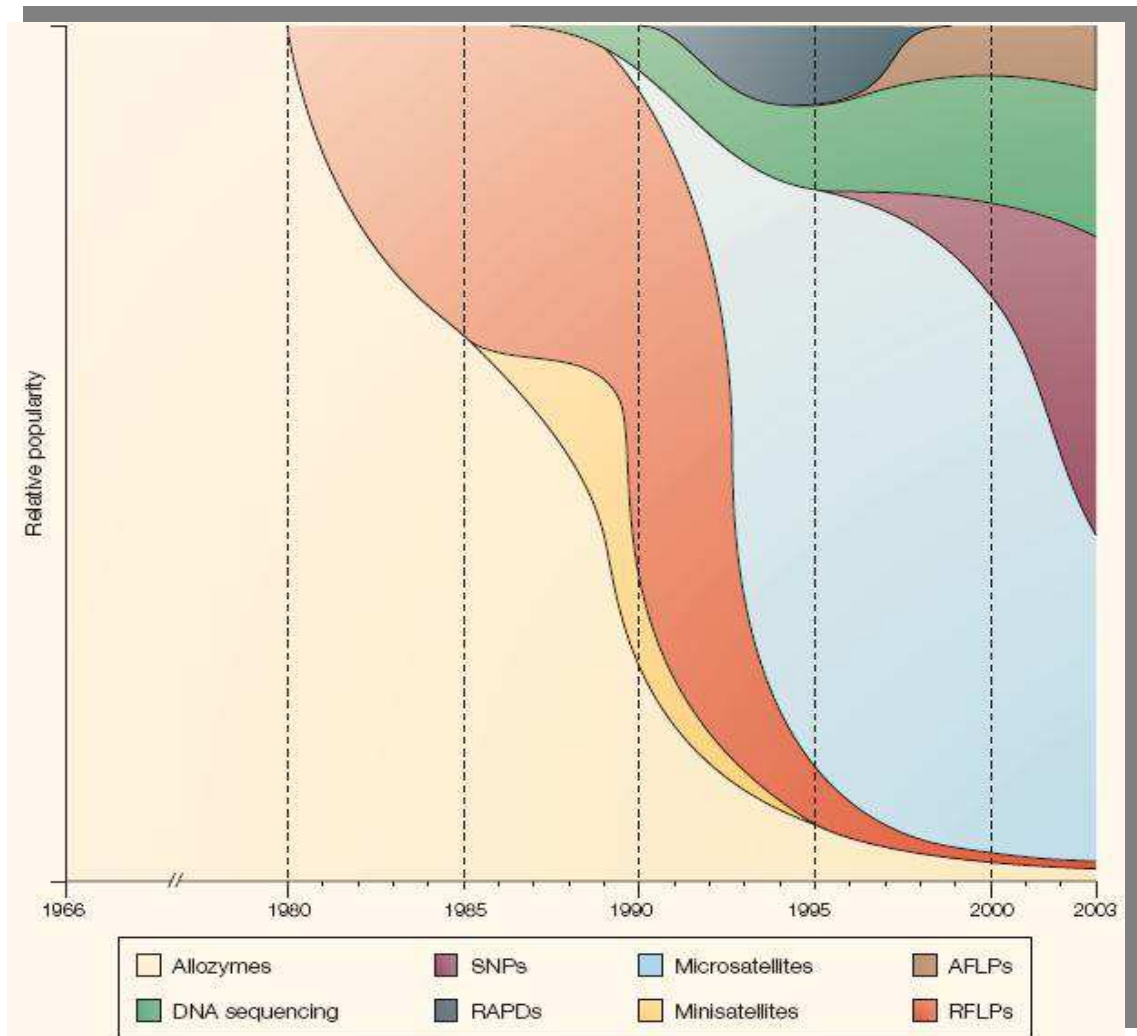


FIGURA 2- VARIAÇÃO DOS MARCADORES USADOS EM TRABALHOS CIENTÍFICOS AO LONGO DOS ANOS

FONTE: SCHLÖTTERER, C.(2004)

Apesar destes vários tipos, para que o marcador tenha sucesso é de fundamental importância escolher o melhor gene que será usado para o diagnóstico

da espécie ou indivíduo. É preciso escolher regiões que tenham o máximo de diferenças entre os grupos, ou seja, regiões com alto índice de mutações. Portanto, variabilidade é o conceito chave, ela está presente na natureza em vários níveis hierárquicos, e nesta escala, um dos níveis, é a variabilidade que ocorre entre as espécies, a qual marcador molecular desenvolvido neste trabalho se propõe a detectar.

Justamente devido a sua alta variação o marcador molecular desenvolvido neste trabalho usou a região controladora do genoma mitocondrial denominada D-loop (FIGURA 3). As mitocôndrias, organelas presentes no citoplasma das células, responsáveis pela respiração celular, são descritas como cilindros finos e alongados com um diâmetro de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  e são providas de uma carga genética própria, o DNA mitocondrial (mtDNA) (ALBERTS *et al.*, 2006). Sua composição química é a mesma do DNA nuclear, no entanto, a sua organização é mais econômica, já que praticamente todo o genoma é codificante, além de ser um genoma circular. Por ter sua herança apenas de origem materna, é um genoma haplóide. A distribuição assimétrica de guanina e citosina das fitas do DNA mitocondrial gera uma cadeia pesada (H) e outra leve (L). As fitas são transcritas a partir de promotores da região de controle (D-loop) que justamente caracteriza-se por abrigar as origens de replicação e transcrição do genoma mitocondrial (FARAH, 2000).

A região D-loop é hipervariável sendo a única não codificadora do genoma mitocondrial e corresponde a cerca de apenas 2% de todo genoma. Devido a sua alta taxa de mutação (estimada em 10 vezes maior do que a do DNA nuclear) o DNA circular mitocondrial possui grandes diferenças entre as espécies. Essa hipervariabilidade pode ser explicada por vários fatores, dentre eles destacam-se: (1) o mtDNA não possui histonas, que exercem um papel protetor ao DNA nuclear, (2) a mtDNA polimerase possui pouca atividade reparadora se comparada a DNA polimerase nuclear, aliado ao fato de (3) a típica estrutura D-loop, onde há a

formação momentânea de fita simples na replicação favorece mutações pontuais, além de (4) ser mais suscetível ao dano oxidativo (REYES *et al.*, 1998).

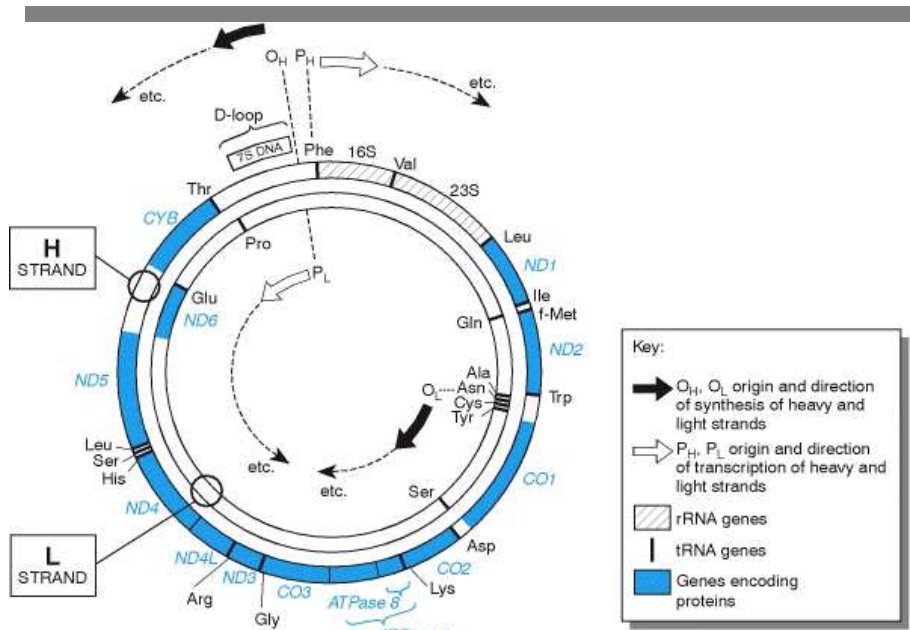


FIGURA 3- GENOMA MITOCONDRIAL

FONTE: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Uma área de pesquisa que se beneficiou com as pesquisas com mtDNA foi a evolução humana, onde um estudo de 1991, comparando genomas mitocondriais de pessoas de várias partes do mundo corroborou a hipótese para uma origem humana africana, além da reconstrução de eventos migratórios de mulheres ancestrais onde a idade estimada para um único ancestral comum do DNA mitocondrial humano esta entre 166.000 a 249.000 anos atrás (VIGILANT *et al.*, 1991).

Apesar de todos estes avanços da Biologia Molecular e seus estudos de impacto em várias áreas, alguns autores acreditam que no âmbito da biologia evolutiva, as ferramentas moleculares ainda estão sub-otimizadas, como por exemplo, Kondrashov (1999) que afirma que estamos usando estes dados na maior parte das vezes para entender apenas eventos microevolutivos (mudanças em pequena escala, no nível de população). No entanto, atualmente esta situação parece mudar, pois alguns estudos já estão sendo feitos aplicando dados genéticos à macroevolução (mudanças em larga escala, eventos em nível superior ao de espécie).

## 2. OBJETIVOS

Desenvolver um método molecular espécie-específico para a detecção de larvas de *G. grapsus* em amostras de plâncton de alta sensibilidade e confiabilidade.

Este método se traduz na construção de um primer para o gene mitocondrial D-loop, que apenas amplifique material genético proveniente da espécie *G. grapsus*, a fim de permitir um meio mais eficiente e rápido da identificação dos estágios iniciais desta espécie dispersos nas águas marinhas, possibilitando estudos de biologia e conectividade deste caranguejo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O marcador foi desenvolvido pela comparação da sequência do gene mitocondrial D-loop entre *G. grapsus* e outras espécies próximas. Foi escolhida a região que mais diferiu a espécie *G. grapsus* das outras a fim de se tornar o primer espécie-específico para as larvas deste caranguejo. Estas sequências foram feitas anteriormente pela equipe de trabalho do meu orientador e com amostras feitas por coletas prévias realizadas pela Professora Pesquisadora da UFSC Dr<sup>a</sup>. Andrea S. Freire em Fernando de Noronha. Estas sequências também se encontram disponíveis on-line no GenBank do The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), local onde cientistas do mundo inteiro depositam informações de sequências genéticas.

O software BioEdit foi usado para visualizar e alinhar estas sequências (FIGURA 4). Dos vários primers específicos possíveis, foi selecionado o primer de maior especificidade. Amostras de tecido de *G. grapsus* e de outras espécies próximas: *Goniopsis cruentata* (Família Grapsidae), *Ocypode quadrata* (Família Ocypodidae), *Cardisoma guanhumi* (Família Gecarcinidae), *Ucides cordatus* (Família Ocypodidae), que foram usadas em outros trabalhos do laboratório já se encontravam com o DNA extraído e disponíveis acondicionadas em freezer, estas foram usadas nos testes como controle para a espécie- especificidade do marcador.



FIGURA 4- BIOEDIT- SOFTWARE UTILIZADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

FONTE: PRÓPRIA

Foram realizados testes de PCR com o primer desenvolvido e adicionando-se também a mesma reação um primer universal (16S) que serviu como um controle positivo da presença de material genético e da sua integridade. Todas as amostras, tanto de *G. grapsus*, como de outras espécies, foram testadas na mesma reação. Algumas reações de ajustes por “tentativa e erro” foram necessários a fim de aperfeiçoar temperaturas, concentração e volume de reagentes, tendo em vista que estas variáveis são cruciais para o sucesso da reação e são específicas para cada tipo de amostra. A quantidade de DNA em relação ao primer é um dos fatores fundamentais, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se sua quantidade for excessivamente alta ou baixa (CARVALHO e VIEIRA, 2001). Um dos problemas associados à alta concentração de DNA é também a alta concentração de impurezas agregadas.



Apenas um primer espécie-específico foi produzido, o “reverse” ou “anti-sense” (3'→5') já que não existia variabilidade suficiente para o desenvolvimento de um primer “forward ” ou “sense”(5'→3'). Mas de forma alguma isto comprometeu o trabalho, pois a grande especificidade do primer reverse já garante sua credibilidade, como complementar ao primer específico produzido, foi utilizado um primer geral forward já existente para a região D-loop.

O protocolo de PCR para obtenção de faixas específicas constituiu de: 2 min a 95°C/35 ciclos de 92°C por 30s, 54°C por 30s e 68°C por 60 s/ 72°C por 10 min. Em 25 ml de reação contendo 1 unidade de enzima *Taq platinum*, 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 0.5 mM de dNTPs. As concentrações dos primers foi 0.5 mM para 16S e para o primer específico foi de 1mM. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados por 20 min em brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, quando o padrão de bandas é observado.

Por fim foram realizados testes com concentrações cada vez menores de DNA proveniente *G. grapsus*, a fim de determinar a sensibilidade do primer desenvolvido, além de testes com amostras planctônicas provenientes da costa sul brasileira (onde a espécie em questão não ocorre) para provar sua confiabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primer específico produzido, denominado Grapsus.R1, foi testado em uma reação de PCR, juntamente com o controle positivo da presença de material genético: um par de primers de um gene também mitocondrial, 16S. Como 16S é um primer universal amostras que possuam DNA de qualquer natureza amplificarão. As sequências do primer Grapsus.R1 e dos outros primers usados nas reações podem ser vista na Tabela 1 .

Tabela 1- DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS

PRIMER	SEQUÊNCIA	GENE
16S AR Universal	5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	16S
16S BR Universal	5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	16S
Grapsus R1 Específico	5' CCCTTCTCTTTTCTTTGGGATG 3'	D-loop
Dlussaf1	5'GTATAACCGCGAATGCTGGCAC 3'	D-loop

Os resultados de PCR mostraram que o primer desenvolvido anelou e permitiu a amplificação apenas ao DNA de *G. grapsus* (FIGURA 5), tendo em vista que na mesma reação foram observadas duas bandas no gel da amostra de *G. grapsus* (uma do fragmento gerado pelo primer específico e outra pelo fragmento gerado pelo primer universal), e nas amostras de outras espécies ocorreu a formação de apenas uma banda (correspondente ao primer universal). O fragmento gerado pelos primers universais possui em torno de 510 pb, enquanto que o fragmento gerado pelo primer específico possui cerca de 400 pb. A não amplificação

do controle negativo (que possui todos os reagentes, mas não material genético) mostra que não ocorreu nenhum tipo de contaminação.

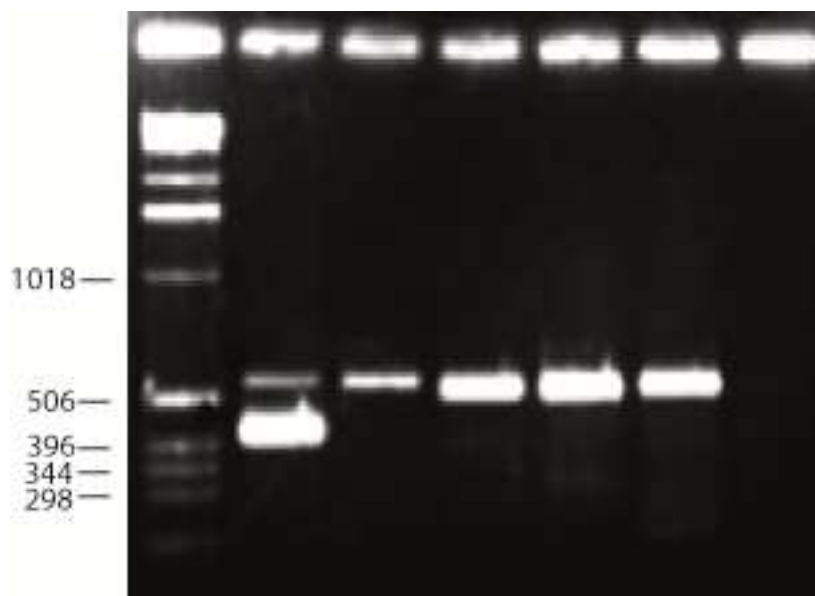


FIGURA 5- ESPECIFICIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1

1- *Grapsus grapsus* ; 2- *Goniopsis cruenta*; 3- *Ocypode quadrata*; 4- *Cardisoma guanhumii* ;  
5- *Ucides cordatus*; 6- Controle negativo

O teste seguinte ocorreu a fim de determinar a sensibilidade do primer desenvolvido, ou seja, qual a quantidade mínima de DNA presente em uma amostra que o marcador consegue detectar, para isto foram feitas diluições das amostras disponíveis de *G. grapsus* e estas também foram submetidas a PCR e a visualização em gel de agarose. A diluição seriada mostrou uma surpreendente sensibilidade para o primer Grapsus.R1 detectando nas análises concentrações de DNA do caranguejo variando de 300 ng a 0,03 ng de DNA (FIGURA 6). Tendo em vista outros estudos com larvas planctônicas de tamanho similar, como exemplo *Limnoperna fortunei*, em que foram extraídos 28 ng de DNA de uma única larva (Pie,

M. *et al.* 2006) pode-se estimar que larvas de *G. grapsus* possuam uma quantidade de DNA similar, garantindo pela sensibilidade do método, a detecção, mesmo que apenas uma única larva esteja na amostra.

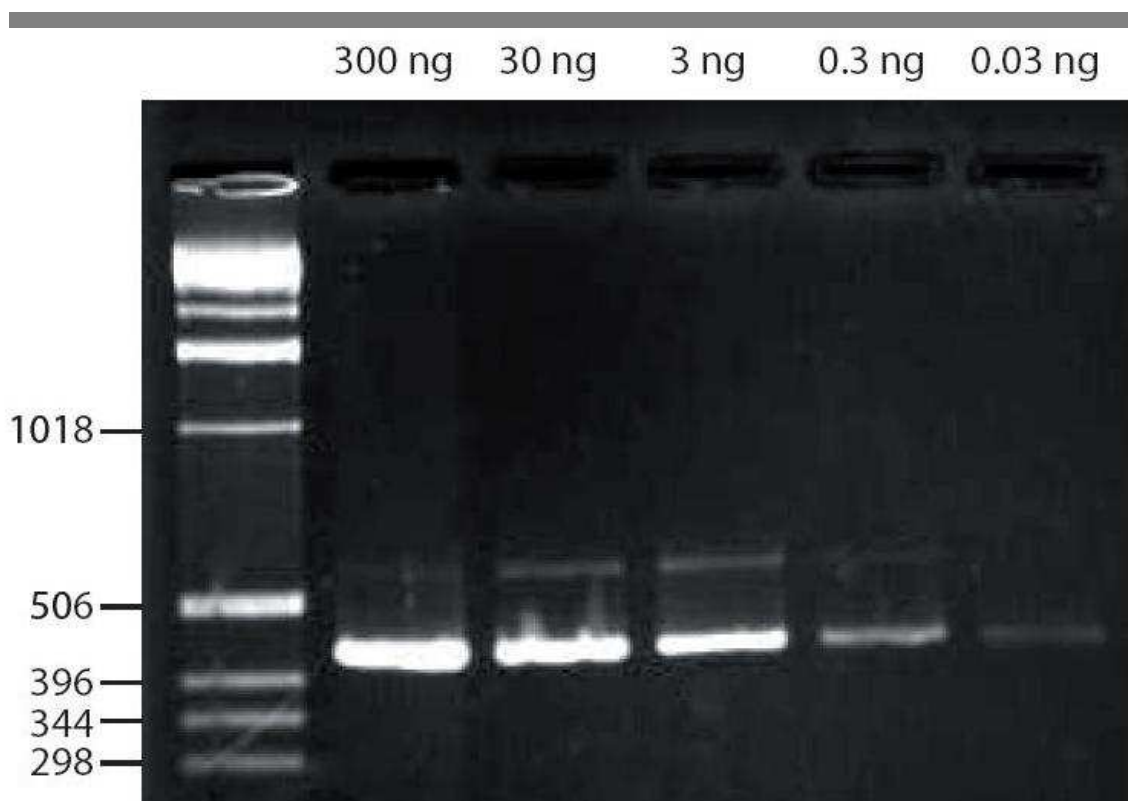


FIGURA 6- SENSIBILIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1

A reação de teste de sensibilidade também foi realizada usando o primer específico em conjunto com o primer universal. Nas amostras com uma grande quantidade de DNA de *G. grapsus*, devido à alta especificidade do primer Grapsus.R1 ocorre a preferência imediata por este na reação, inibindo a formação da banda do primer universal, que tem sua amplificação bem diminuída, assim como quando a quantidade DNA é muito baixa, como pode ser observado na FIGURA 6, nas bandas fracas formadas nesses casos.

Por fim, como última prova da sua eficiência, o primer Grapsus.R1 foi submetido a uma reação de PCR com amostras planctônicas do litoral sul brasileiro. Estas amostras são usadas no laboratório para outros estudos, e devido a sua natureza marinha, servem como ótimos indicadores de material genético que seja semelhante em condições às amostras provenientes da região de ocorrência de *G. grapsus*. Como a espécie não ocorre na região sul, espera-se que o primer não amplifique nenhuma amostra, a não ser, é claro, o controle positivo contendo DNA de *G. grapsus*. O padrão de bandas da FIGURA 7, mostra que foi justamente isto que aconteceu:

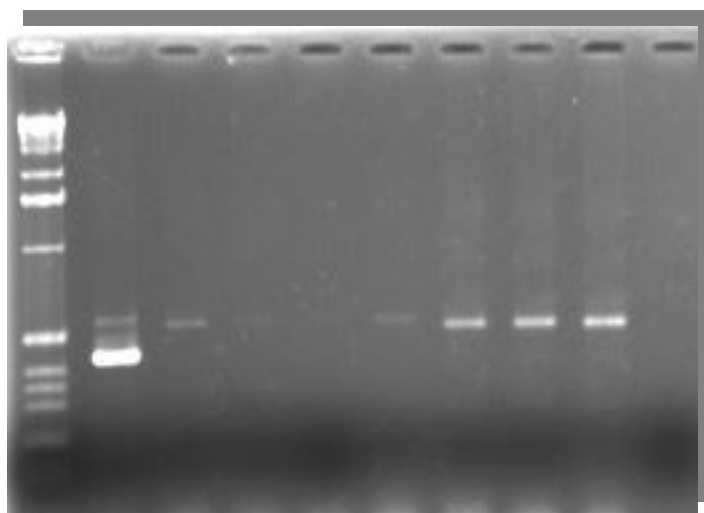


FIGURA 7- ESPECIFICIDADE DO PRIMER GRAPSUS.R1 EM AMOSTRAS DE PLÂNCTON DO LITORAL SUL BRASILEIRO

A amostra com material de *G. grapsus* apresenta as duas bandas (uma do primer universal e outra do específico) enquanto as amostras planctônicas apresentam uma banda simples (proveniente do primer universal). Ou seja, este último teste rendeu uma maior credibilidade ao marcador, uma vez que, submetido à análise com amostras de plâncton, ele não detectou e amplificou material genético de outras fontes.

## 5. CONCLUSÃO

Marcadores moleculares são ferramentas muito interessantes para o estudo de populações, mas também se mostram muito eficientes na detecção de DNA em amostras consideradas difíceis de trabalhar morfológicamente, como as de larvas planctônicas. O primer desenvolvido permite uma confiável identificação de larvas de *G. grapsus*, mesmo em amostras que contenham pouco material genético, uma vez que este possui uma alta sensibilidade além de uma alta especificidade já que em nenhum dos testes material genético de outras fontes foram amplificadas pelo primer Grapsus.R1.

O marcador molecular sob o formato de primer espécie-específico para a detecção de larvas *G. grapsus* é uma técnica eficaz que facilita o trabalho e economiza tempo, sendo muito útil em estudos da distribuição, dispersão e ecologia da espécie.

## 6. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* 2006 **Biologia Molecular da Célula**. Editora Artmed, Quarta Edição

AVISE, J.C.1994. **Molecular markers, Natural history and Evolution**. Chapman & Hall.

BAIRD,T. 1978. **Sally Lightfoot**. Sea Frontiers. 24:2.

BOEGER, W.A.; PIE, M.; FALLEIROS, R.M.; OSTRENSKY, A.; DARRIGRAN, G.; MANSUR, M.C.D.; BELZ, C.E., 2007. **Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperma fortune*) in plankton samples**. Journal of Plankton Research, Volume 29, Number 11, Pages 1015- 1019.

BORÉM, A. e SANTOS, F.R., 2002. **Biotecnologia Simplificada**. Suprema Gráfica e Editora.

BOTH, R. e FREITAS, T.O.R., 2004. **Aves marinhas no arquipélago de São Pedro e São Paulo**. p.193-212 in Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação (Organizado por Joaquim Olinto Branco). Editora da UNIVALI, Itajaí, SC.

BONECKER, S.L.C., 2006. **Atlas de zooplâncton da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. MMA, 232p.

BRANDIN, F. P.; LOPES, R.M.; GUTSIT, K.S.; SPACH, H.L.; SASSI, R., 1997. **Planctonologia na plataforma continental do Brasil: Diagnose e revisão bibliográfica**. MMA, CIRM, FEMAR. 196p.

BRUSCA, R. C e BRUSCA, G. J., 2003. **Invertebrados**. Segunda edição, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 552 p.

CARVALHO DE, A. O.R. e VIEIRA, L. G.E. 2001. **Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)** Neotrop. Entomol. vol.30 no.4 Londrina Dec.

FARAH, S.B. 2000. **DNA segredos e mistérios**. Editora Savier. 276 pág.

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D., 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Terceira Edição. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GARRAFFONI, A.R.S e FILHO, O.A.N.,2006. **Novas Fronteiras da Biologia Evolutiva: a era dos dados moleculares**. Em Revisões em Zoologia- I, p.35 (Organizado por Emygdio Leite de Araujo Monteiro-Filho e José Marcelo Rocha Aranha). SEMA/PR.

GIANUCA, D. e VOOREN, C.M., 2007. **Abundance and behavior of the sally lightfoot crab (*Grapsus grapsus*) in the colony of the brown booby (*Sula leucogaster*) in the São Pedro and São Paulo Archipelago**. Investigaciones Marinas, Vol. 35(2).

GURNEY, R. 1960. **Larvae of Decapod Crustacea**. J. Cramer Publisher, 82 pág.

HARTL,D.L. 2008. **Princípios de Genética de População**. Tradução I.F. Afonso. Terceira Edição . Riberão Preto .FUNPEC, 1V.



HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. 2003. **Princípios Integrados de Zoologia**. Editora Guanabara Koogan S.A., 11ª edição, Rio de Janeiro, 383p.

HICKMAN, C.P. e ZIMMERMAN, T.L. 2000. **A field guide to Crustaceans of Galápagos**. Sugar.

KONDRASHOV, A.S. 1999. Comparative genomics and evolutionary biology. **Current opinion in genetics and development**, 9: 24- 629.

MELO, G.A.S. 1996. **Manual de Identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro**. Plêiade, São Paulo. 640 p.

MICKLOS, D.A. e FREYER, G.A. 2005 . **A Ciência do DNA**. Editora Artmed, 576 pág.

OMORI, M.; IKEDA, T. 1984. **Methods in marine zooplankton ecology**. John Wiley & Sons, New York: 332pp.

PAVINATO, V.A.C. 2010. Tese. **Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabama argillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado**. Piracicaba, 121 pág

PIE, M.; BOEGER, A.W.; PATELLA, L.; FALLEIROS, R.M. 2006. **A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples**. Journal of Molluscan Studies 2006 72(2): 218-219.

POHLE, G. *et al.* 1999 **Larval decapod**. In: BOLTOVSKOY, D. South Atlantic Zooplankton. Leiden: Backhuys Publishers, v. 2, p. 1281-1351.

REYES, A.; GISSI, C.; PESOLE, G. SACCONI, C. 1998 **Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome in mammals**. *Mol. Biol. Evol.* 15 (957-966).

ROMERO, L. 2003. **Comportamiento reproductivo y mutilaciones en el cangrejo de lãs rocas *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Decapoda)**. *Rev. peru. biol.* 10(2): 195 – 202.

RUPPERT, E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. 2005. **Zoologia dos Invertebrados**. Sétima Edição. Roca Editora, São Paulo. 735 p.

SHAPIRO, LEO., "***Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758)**". *Encyclopedia of Life*, available from "<http://www.eol.org/pages/1021865>". Acessado em 30 de agosto de 2010.

SCHLÖTTERER, C. 2004. **The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?** *Nature Reviews Genetics* 5, 63-69 (January 2004).

SCHUBART, C.D, CANNICCI, S., VANINI, M., FRATINI, S. 2006. **Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification**. *Journal compilation*, Blackwell Verlag, Berlin.

SCHWAMBORN, R.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SILVA, T.A.; SILVA, A.P.; EKAU, W. & SAINT-PAUL, U. 2001. **Distribution and dispersal of decapod crustacean larvae and other zooplankton in the Itamaracá estuarine system, Brazil**. *Tropical Oceanography*, 29(1): 1-17.

TORRES, R.A. 2006. Genômica comparativa e a vanguarda dos estudos em Zoologia e Ecologia. P 55 in **Revisões em Zoologia- I** (Organizado por Emygdio Leite de Araujo Monteiro-Filho e José Marcelo Rocha Aranha). SEMA/PR.

VENTURA, C. R. R.; PIRES, D. O. 2002. **Ciclos de vida de Invertebrados Marinhos**. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Inteligência, p. 49-67.

VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HARPENDING, H.; HAWKES, K.; WILSON, A.C. 1991. **African populations and the evolution of mitochondrial DNA**. *Science*. 253 1503-1507.

WARNER, G. F. 1967. **The life history of the mangrove tree crab, *Aratus pisonii***. *J. Zool., London*, v. 153, p. 321-335.

Warner, G.F. 1977. **The Biology of Crabs**. Elek Science London. 202 pág.

YAKES, M.F.; VAN HOUTEN, B. 1997. **Mitochondrial DNA damage in human cells following oxidative stress**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. p. 514-519.