

SISTEMA DE RASTREAMENTO DE HAPLÓTIPOS DA REGIÃO CONTROLE DO DNAmit DE TARTARUGAS MARINHAS DA ESPÉCIE *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758) BASEADO NA TÉCNICA COMBINADA DE PCR-SSCP

Reis¹, E.C.; Albano², R.M.; Lôbo-Hajdu³, G.; Soares⁴, L.

^{1,3} Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524 - PHLC - Sala 205, 20.550-013, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ. est.cardinot@gmail.com

² Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro, 87 fundos - 4º andar, 20.551-013, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Fundação Centro Brasileiro de Proteção e Pesquisa das Tartarugas Marinhas, Projeto TAMAR-IBAMA, Cx. postal 2219, Rio Vermelho, 41.950-970, Salvador, BA.

RESUMO

A região controle do DNA mitocondrial ou *D-loop* de tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) de áreas de desova dos estados do Rio de Janeiro e Sergipe é analisada corriqueiramente através de seqüenciamento pelo Laboratório de Genética Marinha (LGMar) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) num projeto de caracterização genética das populações de tartarugas marinhas no litoral brasileiro desenvolvido em parceria com o Projeto TAMAR-IBAMA. O objetivo do presente estudo é buscar um sistema de rastreamento dos haplótipos de *D-loop* das tartarugas desta espécie através de uma técnica mais simples, barata e rápida que possa ser empregada por laboratórios que não disponham do serviço de seqüenciamento. A técnica combinada de PCR-SSCP (Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) foi escolhida para este fim por apresentar estas características. Foram utilizados 10 espécimes representantes dos três diferentes haplótipos previamente encontrados para os estados do Rio de Janeiro e Sergipe - CC-A4, CC-A24 e CCxLO. O padrão de bandas de cada haplótipo gerado por SSCP é nitidamente distinto, o que mostra que a técnica é sensível e que pode ser seguramente utilizada como forma de rastreamento dos haplótipos de *D-loop* de *C. caretta*.

Palavras-chave: *D-loop*, polimorfismo, tartaruga cabeçuda.

INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas de modo geral apresentam um ciclo de vida longo e complexo, envolvendo migrações transoceânicas, alternância de habitats e de alimentação. Até os séculos XVIII e XIX, estas foram muito abundantes nos mares tropicais e subtropicais. Entretanto, a ação antrópica caracterizada pela pesca comercial, a captura acidental, a destruição de habitats de reprodução, descanso e alimentação e, mais recentemente, a contaminação dos mares tem determinado a condição atual de ameaça às populações de tartarugas marinhas e de extinção de muitas delas (LUTZ & MUSICK, 1996). Por este motivo, em todo o mundo, têm sido realizados estudos de modo a esclarecer dúvidas sobre seu ciclo de vida, comportamento, estrutura de populações, e auxiliar desta maneira na determinação de estratégias regionais e globais de manejo e conservação destes organismos. As ferramentas mais recentes utilizadas com esta finalidade têm sido a telemetria e a genética. Entretanto, estas exigem altos investimentos financeiros, o que ainda é inviável para muitos laboratórios.

No presente estudo, foi enfocada a espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) ou cabeçuda, como é popularmente conhecida, por ser considerada a mais abundante em relação ao número de desovas no litoral brasileiro, assim como pelo estado de ameaça de extinção ou vulnerabilidade em que se encontra - CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*), NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*), IUCN (*The World Conservation Union*) e MMA (Ministério do Meio Ambiente).

A região controle do DNA mitocondrial (DNAmit) ou *D-loop* de tartarugas desta espécie de áreas de desova dos estados do Rio de Janeiro e Sergipe é analisada corriqueiramente através de seqüenciamento pelo Laboratório de Genética Marinha (LGMar) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) num projeto de caracterização genética das populações de

tartarugas marinhas no litoral brasileiro desenvolvido em parceria com o Projeto TAMAR-IBAMA.

O objetivo do presente estudo é buscar um sistema de rastreamento dos haplótipos de *D-loop* de *C. caretta* através de uma técnica mais simples, barata e rápida que possa ser empregada por laboratórios que não disponham do serviço de seqüenciamento. A técnica combinada de PCR-SSCP (Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) foi escolhida para este fim por apresentar estas características.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tecido de fêmeas de *C. caretta* foram coletadas em praias de desova do litoral norte do estado do Rio de Janeiro (Bacia de Campos) e Sergipe (Pirambu), monitoradas pelo Projeto TAMAR-IBAMA durante suas atividades rotineiras de conservação. O material foi então acondicionado em frascos contendo etanol 70% e enviados ao LGMar na UERJ.

A extração do DNA genômico total foi realizada segundo protocolo modificado de DAMATO & CORACH (1996) e faz uso de tampão de lise contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB 2% / 100 mM Tris-Cl pH 8,0 / 20 mM EDTA / 1,4 M NaCl). Em seguida, este foi quantificado em gel de agarose 0,8% visualizado após incubação em brometo de etídeo (0,6 µg/mL). A amplificação da região controle do DNAmiT ou *D-loop* (BOWEN *et al.*, 1994; BOWEN *et al.*, 1995) foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR; MULLIS & FALOONA, 1987), utilizando-se os primers LCM15382 (Abreu-Grobois, comunicação pessoal 2005) e H599 (LAURENT *et al.*, 1998). Um fragmento de cerca de 800 pares de bases foi amplificado e, em seguida, purificado utilizando-se *GFX™ PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O seqüenciamento foi realizado utilizando-se *ET Dye terminator cycle sequence kit* (Amersham Biosciences) conforme especificações para uso no seqüenciador automático MegaBace 1000. As seqüências foram geradas pelo menos quatro vezes tanto no sentido senso quanto no anti-senso. Para cada amostra, a seqüência consenso foi gerada através dos programas CAP3 Sequence Assembly Program (HUANG & MADAN, 1999) e BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os haplótipos foram definidos a partir da comparação com os já depositados em bancos de dados, como o Archie Carr Center for Sea Turtle Research (ACCSTR - <http://www.accstr.ufl.edu/ccmtDNA.html>). Neste, encontram-se depositados 41 haplótipos da região controle do DNAmiT para *C. caretta* do Atlântico e Mediterrâneo.

Para a validação da técnica combinada de PCR-SSCP no rastreamento de haplótipos de *D-loop* de *C. caretta* foram utilizadas 10 amostras representantes dos três diferentes haplótipos previamente encontrados para os estados do Rio de Janeiro e Sergipe - dois de CC-A4, quatro de CC-A24 e quatro de CCxLO, considerados híbridos por apresentarem morfologia externa mais parecida com *C. caretta* e DNAmiT de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). Os produtos purificados foram então submetidos à técnica de SSCP (ORTI *et al.*, 1989) e analisados em gel não desnaturante de poliacrilamida 8%, sendo visualizados por coloração com nitrato de prata (BASSAM *et al.*, 1991). As mutações acumuladas por cada indivíduo são detectadas pelo re-pareamento interno de cada fita simples, que apresenta uma conformação própria dependendo da seqüência dos nucleotídeos e de quantas mutações foram acumuladas durante o processo evolutivo (ORTI *et al.*, 1997; SUNNUCKS *et al.*, 2000). Os padrões de migração são diferentes para cada fita e apresentam precisão de distinção das conformações da ordem de um único nucleotídeo no gel de poliacrilamida não-desnaturante.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A extração de DNA genômico total com tampão de lise contendo CTAB 2% foi satisfatória, obtendo-se DNA de alto peso molecular (Fig.1a). Na amplificação por PCR, foram obtidos fragmentos em torno de 800 pares de bases, posteriormente purificados (Fig.1b), o que reduz a interferência de ruídos tanto na análise do seqüenciamento quanto na do SSCP, garantindo a maior confiabilidade dos resultados obtidos. Após coloração com nitrato de prata, a eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% das 10 amostras revelou a ocorrência de três padrões de bandas distintos (Fig.2), separando os representantes analisados dos haplótipos: CC-A4, CC-A24 e CCxLO. Os dois primeiros são haplótipos de *C. caretta* ao passo que o

terceiro é um haplótipo de *L. olivacea*, mostrando a ocorrência de hibridismo entre estas espécies.

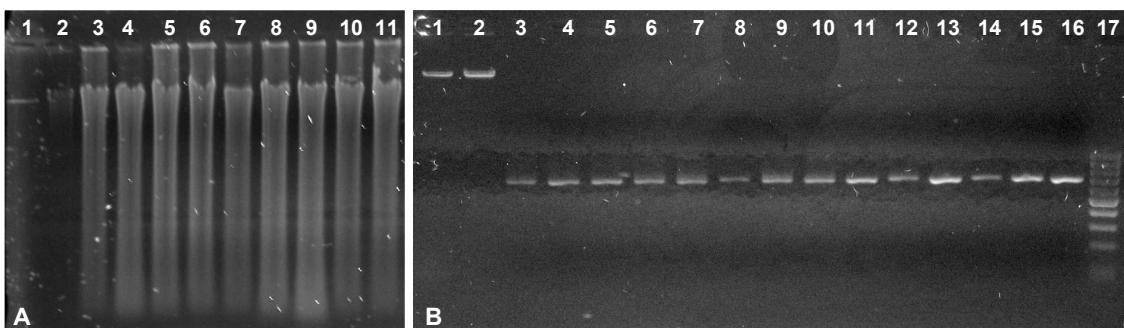


Figura 1(a) - Quantificação do DNA genômico total em gel de agarose 0,8% após procedimento de extração. *Slots*: (1) padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 10 ng; (2) padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 20 ng; (3-11) DNA de diferentes amostras de *Caretta caretta*. **1(b)** - Visualização da purificação dos produtos amplificados em gel de agarose 1,5%. *Slots*: (1) padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 50 ng; (2) padrão de concentração de DNA de bacteriófago lambda 100 ng; (3-16) produtos amplificados de diferentes amostras de *C. caretta*; (17) Marcador de tamanho de fragmento Gene Ruler 100 pb DNA ladder: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 e 80 pares de bases.

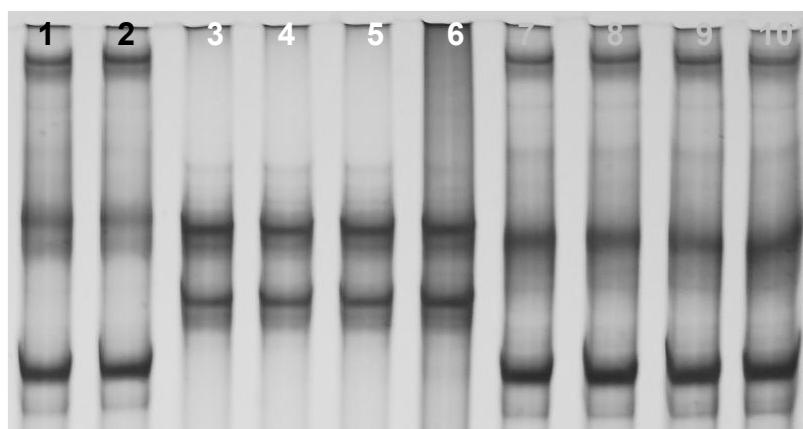


Figura 2 - Foto do gel não desnaturante de poliacrilamida 8% para SSCP da região controle do DNAmi de tartarugas da espécie *Caretta caretta*, indicando a ocorrência de 3 haplótipos. Estes são mostrados pelas cores preta, branca e cinza. *Slots*: (1-2) haplótipo CC-A4; (3-6) haplótipo CCxLO; (7-10) haplótipo CC-A24.

CONCLUSÕES

Esse resultado indica que a técnica combinada de PCR-SSCP aplicada a região controle do DNAmi ou *D-loop* de *C. caretta* é eficaz na distinção de seus haplótipos. Como também foi eficiente na separação de CCxLO, haplótipo representante de outra espécie, pode-se inferir que a técnica permite separar haplótipos de outras espécies. Esta técnica simples, barata e rápida poderá ser então utilizada por laboratórios de pesquisa de tartarugas marinhas que não disponham do serviço de seqüenciamento ou mesmo para permitir uma triagem inicial das amostras a serem posteriormente seqüenciadas.

AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento à Gerência de Avaliação e Monitoramento Ambiental do Centro de Pesquisas da PETROBRAS pela coordenação e financiamento do Projeto Mamíferos e Quelônios Marinhos, do qual este faz parte. Também aos membros do Projeto TAMAR-IBAMA e Fundação Pró-TAMAR pelo fornecimento das amostras e apoio.

REFERÊNCIAS

- ACCSTR - Archie Carr Center for Sea Turtle Research. (<http://www.accstr.ufl.edu/ccmtdna.html>). Página acessada em dezembro de 2006.
- BASSAM, BJ; CAETANO-ANOLLES, G & GRESSHOF, PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. In: *Anal. Biochem.* 196 (1), 80-83.
- BIOEDIT - *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.1*. Copyright© 1997-2004, Tom Hall. Isis Pharmaceuticals, Inc. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).
- BOWEN, BW & AVISE, JC (1995). Conservation Genetics of Marine Turtles. *Conservation Genetics: Case histories from nature*. P 190-235, Chapman and Hall, New York.
- BOWEN, BW; KAMEZAKI, N; LIMPUS, CL; HUGHES, GH; MEYLAN, AB & AVISE, JC (1994). Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*, 48:1820-1828.
- CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna* (apêndice I). (www.cites.org). Página acessada em dezembro de 2006.
- DAMATO, ME & CORACH, D (1996). Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli* (Cardidea, Palaemonidae) evaluated by RAPD analysis. *J. Crust. Biol.* 16:650-655.
- HUANG, X & MADAN, A (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9: 868-877. (<http://pbil.univlyon1.fr/cap3.php>).
- IUCN - *The World Conservation Union*. (www.iucn.org). Página acessada em dezembro de 2006.
- LAURENT, L; CASALE, P; BRADAI, MN; GODLEY, BJ; GEROSA, G; BRODERICK, AC; SCHROTH, W; SCHIERWATER, B; LEVY, AM; FREGGI, D; ABD EL-MAWLA, EM; HADOUD, DA; GOMATI, HE; DOMINGO, M; HADJICHRISTOPHOROU, M; KORNARAKY, L; DEMIRAYAK, K & GAUTIER, CH (1998). Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology*, 7:1529-1542.
- LUTZ, PL & MUSICK, JA (1996). *The Biology of Sea Turtles*. Boca Raton, Fla. CRC Press.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Espécies ameaçadas. (www.mma.gov.br). Página acessada em dezembro de 2006.
- MULLIS, KB & FALOONA, F (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350.
- NOAA - *National Oceanic and Atmospheric Administration*. (www.noaa.org). Página acessada em dezembro de 2006.
- ORITA, M; SUZUKI, Y; SEKIYA, T & HAYASHI, K (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.
- ORTI, G, HARE, MP & AVISE, JC (1997). Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol. Ecol.* 6, 575-580.
- SUNNUCKS, P; WILSON, ACC; BEHEREGARAY, LB; ZENGER, K; FRENCH, J & TAYLOR, AC (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9, 1699-1710.