

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE AMOSTRAS DE BOTOS COMERCIALIZADAS NA REGIÃO AMAZÔNICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

Sholl, T.G.C.¹; F.F. Nascimento^{1,2}, O. Leoncini³, C.R. Bonvicino⁴ e S. Siciliano¹

(1) Projeto de Monitoramento de Aves e Mamíferos Marinhos na Bacia de Campos/CENPES/PETROBRAS – Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21041-210 Brasil

(2) Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, Sydney, Australia

(3) Divisão de Genética, CPq, INCA, Rio de Janeiro, RJ Brasil

(4) Divisão de Genética, CPq, INCA & Depto. de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ Brasil

Resumo

Para investigar a procedência geográfica e a identificação taxonômica de espécimes de cetáceos comercializados nos mercados populares de Belém, PA e Manaus, AM, adaptamos uma tecnologia de extração de ADN a partir de músculos desidratados ou conservados em perfumes à base de álcool. O importante neste procedimento de extração é trabalhar com amostras de, no máximo, dois milímetros, podendo ser utilizado qualquer tecido. Todo o procedimento é realizado em tubos de microcentrífuga em um volume máximo de 300 µl, sendo a base do procedimento a extração por fenol-clorofórmio. A análise das seqüências das 12 amostras provenientes destes mercados revelou cinco haplótipos. Estudos anteriores atribuíram ao boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) a origem das amostras à venda regularmente nos mercados públicos “Ver-o-Peso” em Belém, Pará, e no Mercado Municipal de Manaus, Amazonas. Mas nossas análises mostraram que estas amostras pertenciam a espécimes de *Sotalia guianensis*, e nenhuma delas pertencia a espécimes de *Sotalia fluviatilis* (“tucuxi”), nem tampouco ao boto-vermelho (*I. geoffrensis*). Esse resultado mostra que, de fato, o boto-cinza (*S. guianensis*) sofre maior pressão de captura em relação ao boto-vermelho e ao tucuxi, e que os mercados de Manaus e Belém são abastecidos com exemplares marinhos de *Sotalia*, provavelmente capturados por pescadores da região do estuário próximo a Belém.

Introdução

Uma séria ameaça aos golfinhos da Amazônia é o comércio de genitálias e outras peças anatômicas para fins religiosos e como lembranças para turistas. Estudos prévios (Best & da Silva 1989) atribuíram ao boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) a origem das amostras à venda regularmente nos mercados públicos “Ver-o-Peso” em Belém, estado do Pará, e no Mercado Municipal de Manaus, estado do Amazonas, Brasil.

A fim de investigar a procedência geográfica e a identificação taxonômica destes espécimes, desenvolvemos uma tecnologia de extração de ADN a partir das genitálias

comercializadas, que em sua maioria, são desidratadas ou conservadas em perfumes à base de álcool.

Materiais e métodos

As 12 amostras aqui estudadas foram obtidas por doação de moradores de Belém, Ilha do Marajó e arredores. A origem atribuída a estas amostras é dada como “Mercado Ver-O-Peso” em Belém e “Mercado Central”, em Manaus, Brasil. As amostras de tecido foram retiradas de genitálias conservadas em perfumes à base de álcool ou desidratadas. Foi extraído o ADN destas amostras utilizamos como base o protocolo tradicional de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989), porém adaptamos alguns passos com objetivo de aproveitar ao máximo o material genético.

Inicialmente, corta-se com um bisturi uma amostra de no máximo dois milímetros. É fundamental que esta amostra seja reduzida a pedaços muito pequenos. Coloca-se toda amostra em um tubo de microcentrifuga de 1,5ml. Adiciona-se 500µl de tampão de lise (100mM NaCl; 10mM TRIS pH7,5; acertar o pH com ácido clorídrico absoluto, 5mM EDTA), 25µl de SDS 20%, 3µl de Rnase e de 3 a 5µl de Proteinase XIV. A amostra é então colocada em uma estufa a 37°. Aproximadamente 2 horas depois, macera-se a amostra com um bastão. A amostra é mantida a 37° por no mínimo 12 horas.

No dia seguinte, seguem-se as etapas tradicionais do protocolo de fenol-clorofórmio, respeitando sempre as proporções obtidas. Adiciona-se o mesmo volume de fenol e centrifuga - se por dez minutos a 13200 rpm. Retira-se o sobrenadante, com uma pipeta e passa-se para outro tubo de microcentrifuga. Adicionam-se partes iguais de clorofórmio e fenol. Centrifuga-se novamente por dez minutos a 13200 rpm. Retira-se o fenol, que está na parte de baixo. Adiciona-se o mesmo volume de clorofórmio e centrifuga-se por cinco minutos a 13200 rpm. Retira-se o sobrenadante e transfira-o para outro tubo. Adicionar dois volumes de etanol absoluto gelado. Centrifugar 13200rpm de vinte a trinta minutos e ao final, descartar o etanol. Adiciona-se 100µl de etanol 70% e Centrifuga-se a 13200 rpm por vinte minutos. Descarta-se o etanol 70% e ressuspende-se a amostra em 50µl de H₂O estéril.

Todo o gene mitocondrial citocromo *b* foi amplificado através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR; do inglês, *polimerase chain reaction*) utilizando um par de iniciadores externos (CB-out1, 5’AATGAYATGAAAARYCATCGTTG-3’; CB-out2, 5’TCTTCCTTGAGTCTTAGGGAG-3’; Cassens *et al.* 2000) utilizando um termociclador. Para um total de 50,0 µl de reação foi adicionado ADN (de 250,0 ng a 1,0 µg), dNTPs (0,5 mM/ml), iniciadores (0,3 pmol/µl), taq DNA polimerase (Invitrogen, Biotools ou Pharmacia; 0,04 U/µl) tampão de amplificação 10X nas seguintes condições: 94°C (60s); 35 ciclos [94°C (60s), 55 (60s) e 72°C (90s)].

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando os iniciadores externos CB-out1 e CB-out2, e os iniciadores internos CB-in1; (5’-TTRTTRGATCCTGTTTCRTG-3’) e CB-in2; (5’-TGAGGACAAATATCATTYTGAG-3’; Cassens *et al.* 2000). As reações foram corridas no seqüenciador automático MegaBACE 1000 e as seqüências obtidas foram editadas com o programa Sequencing Navigator 3.3 (Applied Biosystems, Inc. 1994) e alinhadas manualmente.

As estimativas de distância genética foram calculadas com o programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA3; Kumar *et al.* 2004) a partir do modelo de distância *p* com todas as bases incluídas e a opção “deleção par a par” (*pairwise deletion*). A análise de *neighbor-joining*, com o algoritmo Kimura-2-parâmetros e a opção “deleção par a par”, a análise de parcimônia máxima e os valores de Bootstrap a partir de 1000 réplicas foram também obtidas com o MEGA3. Nas análises de NJ e MP foram utilizados duas seqüências de *Sotalia fluviatilis*

(DQ086828 e AF084078), uma de *S. guianensis* (DQ086827), uma de *Inia geoffrensis* (AF334485) e uma *Tursiops truncatus* (AF084095) obtidas do GenBank.

Resultados e Discussão

A metodologia aqui empregada obteve sucesso na extração de ADN de amostras de tecido de cetáceos desidratadas e amostras de tecido conservadas em perfumes a base de álcool. Todo o gene citocromo b foi amplificado e seqüenciado em todas as amostras, tendo sido encontrados cinco haplótipos. A análise de *neighbor joining* mostrou que os haplótipos das amostras aqui estudadas se agrupam com o haplótipo de *S. guianensis* disponível no GenBank; esta mesma análise mostrou que os haplótipos de *Sotalia* se dividem em dois grupos fortemente suportados (Bootstrap de 99%, Fig. 1), um contendo haplótipos de *S. guianensis* e outro contendo haplótipos de *S. fluviatilis*, ficando os espécimes de *Inia* e *Tursiops* como grupo de fora. Uma vez confirmado que as amostras aqui estudadas pertenciam ao gênero *Sotalia*, na análise de parcimônia máxima (MP) só foi utilizado espécimes de *Sotalia* e *Tursiops* como grupo de fora. A MP mostrou a mesma topologia da NJ em relação aos haplótipos *Sotalia*, divididos em dois grupos fortemente suportados (Bootstrap de 99%, Fig. 1). No primeiro clado se agrupam os espécimes da forma marinha (*S. guianensis*), e no segundo clado os espécimes da forma fluvial (*S. fluviatilis*).

As estimativas de distância genética p entre os haplótipos estudados variaram de 0,000 a 0,004 mostrando a estreita relação entre os espécimes estudados (Tab. 1), e mostrando que a diversidade de *Sotalia guianensis* em relação ao marcador citocromo b é maior que a previamente reportada (Cunha *et al.* 2005) onde um único haplótipo para a forma marinha de *Sotalia* foi encontrado com o mesmo marcador molecular citocromo b.

Estudos anteriores (Best & da Silva 1989) atribuíram ao boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) a origem das amostras à venda regularmente nos mercados públicos “Ver-o-Peso” em Belém, estado do Pará, e no Mercado Municipal de Manaus, estado do Amazonas. De fato, todas as amostras aqui estudadas eram referidas como pertencentes à “botos” pelos comerciantes destes mercados. No entanto, nossos achados além de mostrarem que as amostras comercializadas pertencem ao gênero *Sotalia*, mostram que tem origem marinha indicando que o boto-cinza (*S. guianensis*) sofre maior pressão de captura em relação ao boto-vermelho e ao tucuxi, e que os mercados de Manaus e Belém são abastecidos com exemplares marinhos de *Sotalia*, provavelmente capturados por pescadores da região do estuário próximo a Belém. Este trabalho mostra também a utilidade da técnica aqui empregada para a extração de ADN para identificação taxonômica das amostras comercializadas de cetáceos nos mercados populares.

Agradecimentos

Aos Projetos Piatam Mar e Piatam Oceano, da Petrobras, pelo auxílio em passagens e logística em Belém. C.R. Bonvicino é bolsista do CNPq. T. Sholl é bolsista PIBIC da FIOCRUZ/CNPq.

Referências bibliográficas

- Applied Biosystems, Inc. *Sequence navigator, DNA and protein comparison software*. A division of Perkin-Elmer Corporation. Foster city, California 1994.
- Best R.C. & da Silva V.M.F. 1989. Biology, status and conservation of *Inia geoffrensis* in the Amazon and Orinoco River basins. In: W. F. Perrin, R. L. Brownell Jr., Zhou Kaiya & Liu Jiankang (Org.). *Biology and Conservation of the river dolphins*. Gland, Switzerland: IUCN, 3: 23-34.

- Cassens I., Vicario S., Waddell B.G., Balchowsky H., Van Belle D., Ding W., Fan C., Lal Mohan R.S., Simões-Lopes P.C., Bastida R., *et al.* 2000. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 11343–11347.
- Cunha H.A., da Silva V.M.F., Lailson-Brito Jr. J., Santos M.C.O., Flores P.A.C., Martin A.R., Azevedo A.F., Fragoso A.B.L., Zanelatto R.C. & Sole'-Cava A.M. 2005. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. Marine Biology 148: 449-457.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinformatics 5:150-163.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.

Tabela 1. Estimativas de distância p entre os haplótipos das amostras de cetáceos oriundas dos mercados de Belém e Manaus. Em negrito as estimativas entre os haplótipos de *S. guianensis*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Belém 9									
2	Belém 4, 5, 13, 14, 19, 28, 29, CRB2848	0,002								
3	Belém 30	0,001	0,003							
4	Belém 12	0,001	0,004	0,002						
5	Belém 26	0,002	0,004	0,002	0,002					
6	<i>S. guianensis</i> DQ086827	0,000	0,002	0,001	0,002	0,002				
7	<i>S. fluviatilis</i> DQ086828	0,025	0,026	0,027	0,026	0,026	0,025			
8	<i>S. fluviatilis</i> AF084078	0,022	0,023	0,023	0,023	0,023	0,021	0,004		
9	<i>T. truncatus</i> AF084095	0,081	0,081	0,082	0,081	0,081	0,079	0,082	0,082	
10	<i>I. geoffrensis</i> AF334485	0,158	0,157	0,161	0,157	0,157	0,155	0,154	0,154	0,159

Figura 1. Análise de *neighbor joining* (em cima) e máxima parcimônia (em baixo) entre os haplótipos de *Sotalia* oriundos dos mercados de Belém e Manaus. Números próximos aos nós são valores de *Bootstrap* a partir de 1000 réplicas.

