

ALGUNS ASPECTOS DA GENÉTICA DAS BIONFALÁRIAS

MR-13

Luiz Carlos Gomes Simões

Departamento de Biologia

IB - USP

Caixa Postal 11.461

CEP: 05499 - São Paulo - SP

Qualquer discussão sobre a genética de uma determinada espécie ou grupos de espécies, pode envolver os enfoques mais diversos dependendo dos interesses imediatos do autor e das informações existentes na literatura. No caso das bionfalárias vamos nos ater à situação da citogenética do gênero, à estudos da reprodução e às análises enzimáticas realizadas em algumas espécies. Os dados sobre genética em geral existentes na literatura são muito importantes embora frequentemente bastante dispersos.

Citogenética

A citogenética de moluscos em geral e em particular a das bionfalárias, tem progredido muito lentamente em virtude das dificuldades técnicas para obtenção de preparações citológicas de alta qualidade e, principalmente aos problemas encontrados para se conseguir aplicar a estes moluscos as diferentes técnicas de bandeamento cromossômico, corriqueiramente aplicadas aos vertebrados e que permitiram a obtenção de ótimos resultados na pesquisa da evolução cromossômica entre eles. Entre os invertebrados, de um modo geral, o sucesso na aplicação de bandeamentos cromossômicos tem sido bastante restrito, e aqueles que se dedicam à citogenética de certos grupos de invertebrados, têm que se contentar com o uso das técnicas clássicas da citogenética e a adaptação de uma ou outra técnica mais atual para o seu material de pesquisa.

Quando em nosso laboratório decidimos fazer um levantamento citogenético das espécies de *Biomphalaria* com ocorrência no Brasil, sabíamos que enfrentaríamos sérias dificuldades, inicialmente para as adaptações técnicas na obtenção de

O autor agradece o suporte financeiro do CNPq e FINEP.

preparações de qualidade e, em seguida, para se conseguir algum tipo de bandeamento cromossômico que nos permitisse ir além da simples montagem de cariótipos e contagem dos cromossomos.

No que concerne às preparações cromossômicas, conseguimos bastante sucesso com a adaptação das técnicas usadas em vertebrados (Kawano et al., 1984, Uemura, 1989). Tuan (1988) elaborou uma técnica extremamente eficiente para análise meiótica e mitótica usando o ovotestis. A aplicação desta técnica, após dessecação dos animais, resulta em ótimos resultados, possibilitando a observação de todo o ciclo meiótico e oferecendo oportunidade de seleção de fases para testes experimentais. A técnica funciona da seguinte maneira: os animais ao serem submetidos à dessecação reduzem ao mínimo a sua atividade metabólica, assim sendo, o ritmo das divisões celulares é também reduzido. Seguindo o processo meiótico durante diferentes tempos de dessecação verificamos que o mesmo é gradualmente interrompido isto é, as células que já entraram no processo de divisão prosseguem, porém muito lentamente, aumentando assim a duração de cada fase e possibilitando a observação daquelas cuja duração é muito curta como a metáfase II, por exemplo.

A observação dos cromossomos de nove espécies do gênero Biomphalaria: B. amazonica; B. oligoza; B. peregrina; B. intermedia; B. schrammi; B. occidentalis (Uemura, 1989); B. glabrata; B. straminea; B. tenagophila (Kawano et al., 1987) mostrou que efetivamente todas estas espécies têm o número básico  $2n=36$  cromossomos e que, pelo menos entre as linhagens estudadas, não foi encontrada nenhuma população poliplóide, como foi o caso de populações do grupo truncatus encontradas na África (Burch, 1964, 1967).

O advento das técnicas de bandeamento cromossômico proporcionou um considerável avanço à citogenética tradicional, possibilitando a análise comparativa de pequenas frações cromossômicas. O mecanismo básico dos bandeamentos cromossômicos é a afinidade existente entre determinados corantes e a estrutura química dos vários tipos de cromatina. Hoje, existem diversos tipos de bandeamentos os quais permitem sempre a análise comparativa entre cromossomos de uma mesma espécie ou entre espécies distintas. Todas estas técnicas foram desenvolvidas basicamente para cromossomos de vertebrados e algumas vezes aplicadas, com sucesso, também para invertebrados. No caso das bionfalárias foram tentadas quase todas as técnicas de bandeamento cromossômico, obtendo-se um resultado apenas relativo. Conseguimos por

exemplo algum sucesso com o bandeamento G, entretanto os resultados nunca foram reproduzíveis de maneira rotineira impedindo, desta forma, um estudo da evolução cromossômica do gênero como seria desejável. A única técnica que funcionou a contento foi a marcação das RON (Howell e Black, 1980) que permite a identificação, através da impregnação por prata, das regiões organizadoras do nucléolo. Esta técnica foi aplicada com sucesso às 9 espécies estudadas e os resultados demonstraram que a RON está localizada no mesmo par cromossômico em todas elas (Kawano et al., 1987, Uemura, 1989). A região impregnada pela prata corresponde aos braços curtos de cromossomos subtelocêntricos, estando de acordo com os resultados de Goldman et al. (1983), para B. glabrata.

As dificuldades em se obter bandeamentos cromossômicos aliados à constância do número modal de cromossomos em espécies do gênero Biomphalaria, não inviabilizam o estudo da evolução cromossômica entre esses moluscos.

Os resultados obtidos por Kawano et al. (1987) em três espécies do gênero Biomphalaria mostram claramente, através de medidas de razões de braços, a existência de diferenças morfológicas entre as espécies estudadas. O trabalho de Uemura (1989), que estudou citogeneticamente 6 espécies do gênero, mostra diferenças bem acentuadas entre elas, principalmente considerando-se a B. intermedia que apresenta cromossomos notadamente maiores que os das demais espécies. Desta forma, acreditamos que os resultados que já temos em mãos permitem algumas considerações sobre a evolução cromossômica das espécies em questão.

Com pequenas exceções, acredita-se que o tamanho do genoma de espécies próximas seja mais ou menos constante. Esta observação encontra suporte em dados citológicos obtidos através da análise da constituição cromossômica em espécies relacionadas entre si. A análise cromossômica das bionfalárias é perfeitamente compatível com esta conclusão. O processo Robertsoniano de fusão de dois elementos com um braço em um único com dois braços, é extremamente comum em quase todos os seres vivos. Nesses casos, o número diplóide pode ser variável, porém o número de braços cromossômicos permanece imutável, isto é: a redução do número diplóide deve sempre acompanhar um aumento do número de cromossomos com 2 braços (Pathak et al., 1973; Mathey, 1945).

Em muitos grupos de animais, diferentes gêneros ou espécies apresentam sempre o mesmo número diplóide de cromossomos e em alguns desses há uma variação no número de braços (Hsu e Arrighi, 1966, 1968; Pathak et al., 1973). A explicação clássica para esses casos é a de que o número variável de braços cromossômicos se deva à inversões pericêntricas e/ou translocações recíprocas desiguais, havendo alterações na morfologia cromossômica, permanecendo entretanto, constante o teor do material genético.

Hsu e Arrighi (1971) e Bostock et al. (1972) encontraram braços cromossômicos totalmente heterocromáticos em algumas espécies de mamíferos e, verificaram que as diferenças no número básico de braços (N.F.) estavam correlacionadas com diferenças no número de braços heterocromáticos. Esses dados, segundo Pathak et al. (1973) levam à novas conceituações quanto à evolução cromossômica. Em adição aos rearranjos mencionados anteriormente, um outro mecanismo pode estar operando uma vez que, um cromossomo pode perder ou ganhar um braço inteiro desde que seja heterocromático e conseqüentemente modificando o tamanho do genoma.

Considerando o exposto anteriormente, o número cromossômico constante, tanto no gênero Biomphalaria quanto em outros próximos (Bulinus p. ex.) e as variações relativamente pequenas na localização centromérica, pode-se imaginar que a fórmula cromossômica das espécies atuais teria sido alcançada através dos mecanismos clássicos descritos por White (1968, 1978) e, possivelmente por alterações originadas pela perda ou ganho de segmentos heterocromáticos, o que explicaria pequenas diferenças relativas à posição do centrômero entre espécies próximas e ainda as variações encontradas entre diferentes populações de uma mesma espécie, o que está bem documentado no trabalho de Kawano et al. (1987). Uemura (resultados não publicados) está preparando um trabalho em que os cromossomos de espécies de Biomphalaria são estudados de maneira comparativa, estabelecendo-se uma análise comparativa com os cariótipos de outros moluscos filogeneticamente próximos. A partir deste trabalho talvez tenhamos mais subsídios para se tentar elaborar uma filogenia cromossômica do gênero.

Comportamento Reprodutivo e Polimorfismo Enzimático

Vários experimentos têm sido conduzidos pelo grupo que estuda as bionfalárias no Departamento de Biologia, no sentido de se tentar esclarecer o papel da autofecundação.

Os resultados dos diferentes experimentos já concluídos aliados a outros encontrados na literatura, têm sido no mínimo surpreendente, uma vez que trabalhando com linhagens diferentes de uma mesma espécie, temos obtido sempre resultados conflitantes.

Hofmann (1987) trabalhou com B. peregrina, B. intermedia e B. straminea e acompanhou todo o ciclo de vida de 39 indivíduos em autofecundação. Várias observações interessantes foram efetuadas, dentre elas, um comportamento rítmico de postura verificando ainda que, em autofecundação, a amostra de B. intermedia foi a mais produtiva e a amostra de B. straminea, originária de Ribeirão Preto-SP, foi a que apresentou os piores autotofecundantes, sendo encontrado nessa amostra um número relativamente alto de caramujos com problemas reprodutivos. Com uma amostra de B. straminea, originária de Lagoa Santa - MG, o mesmo experimento foi repetido mais duas vezes, em condições idênticas às dos experimentos de Hofmann (1987). Os resultados foram totalmente díspares desde que, desta feita, 100% dos caramujos desovaram em autofecundação, sendo inclusive a produção de ovos por desova superior à dos controles em fecundação cruzada (Simões e Garrido, não publicado).

Tuan (1988) e Mascara (1988) trabalharam separadamente com amostras diferentes de B. tenagophila, usando as mesmas condições experimentais no mesmo laboratório. Os resultados desses autores, embora não tão discrepantes quanto os relatados anteriormente, também apresentaram diferenças quanto a produção de desova.

A reunião desses dados obtidos em nosso laboratório sugere que linhagens distintas de uma mesma espécie tenham uma performance reprodutiva diferente, não sendo possível generalizações relativas à mais ou menos eficiência da espécie quando submetida à autofecundação.

O estudo dos polimorfismos enzimáticos têm se mostrado eficiente com critério de distinção e estabelecimento de filogenia entre espécies.

Hofmann (1987) analisou polimorfismo enzimático em três espécies do gênero: B. straminea, B. intermedia e B. peregrina. Foi feita uma análise de 11 sistemas enzimáticos que mostrou ser um bom critério para distinção entre as espécies estudadas, onde foi encontrado um alto grau de monomorfismo e homozigose, nas três espécies. Esses dados, aliados ao bom rendimento em autofecundação obtido para essas mesmas espécies, sugerem que em a natureza a autofecundação deve assumir papel mais importante do que lhe é atribuído.

Os dados de Mascara (1988) com B. occidentalis e B. tenagophila, revelaram também alto grau de monomorfismo e heterozigose em ambas as espécies levando-o igualmente a sugerir um papel mais relevante ao processo de autofecundação.

#### Referências Bibliográficas

- BOSTOCK, C.J.; PRESCOTT, D.M. and HATCH, F.T. (1972). Timing of replication of the satellite and main band DNAs in cells of the kangaroo rat (Dipodomys ordii). Exp. Cell Res., 74: 487-495.
- BURCH, J.B. (1964). Cytological studies of planorbidae (Gastropoda: Basomatophora) the African subgenus Bulinus ss. Malacologia, 1(3): 387-400.
- BURCH, J.B. (1967). Chromosomes of intermediate hosts of human bilhardazis. Malacologia, 5 (2): 127-235.
- GOLDMAN, M.A.; LOVERDE, P.T.; CHRISMAN, C.L.; FRANKLIN, D.A.; MATTEWS, F.; PITCHFORD, R.J. and RICHARDS, C.S. (1983). Nucleolar organizer regions in Biomphalaria and Bulinus snails. Experientia, 39: 911-913.
- HOFMANN, P.R.P. (1987). Aspectos da Biologia e do Polimorfismo Enzimático em Três Espécies do Gênero Biomphalaria. São Paulo. Universidade de São Paulo, 117p. Tese (doutorado). Instituto de Biociências, Depto. de Biologia.
- HOWELL, W.M. and BLACK, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. Experientia, 36: 1014-1015.
- HSU, T.C. and ARRIGHI, F.E. (1966). Chromosomal evolution in the genus Peromyscus (Cricetidae, Rodentia). Cytogenetics, 5: 355-359.

- HSU, T.C. and ARRIGHI, F.E. (1968). Chromosomes of Peromyscus (Rodentia, Cricetidae). I. Evolutionary trends in 20 species. Cytogenetics, 7: 417-446.
- HSU, T.C. and ARRIGHI, F.E. (1971). Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. Chromosoma. Berl., 34: 243-253.
- KAWANO, T.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. e SIMÕES, L.C.G. (1984). Técnica para estudos citogenéticos do gênero Biomphalaria. Bol. Zool. Univ. S. Paulo 8 (suppl.): 183-187.
- KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G. and ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1987). Nucleolar organizer region in three species of the genus Biomphalaria (Mollusca, Gastropoda). Rev. Brasil. Genet., X (4): 695-707.
- MASCARA, D. (1988). Análise de Padrões Isozímicos e da Biologia Reprodutiva em Duas Espécies do Gênero Biomphalaria: B. tenagophila e B. occidentalis. São Paulo. Universidade de São Paulo, 109p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Depto. de Biologia.
- MATTHEY, R. (1945). L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. Experientia, 1: 50-56.
- PATHAK, S.; HSU, T.C. and ARRIGHI, F.E. (1973). Chromosomes of Peromyscus (Rodentia, Cricetidae). IV. The role of heterochromatin in karyotypic evolution. Cytogenet. Cell Genet., 12: 315-326.
- TUAN, R. (1988). Aspectos da Biologia da Reprodução e Espermatogênese de Biomphalaria tenagophila. São Paulo. Universidade de São Paulo, 89p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Depto. de Biologia.
- UEMURA, G. (1989). Implantação da Criação em Laboratório e Levantamento Cariotípico de Seis Espécies do Gênero Biomphalaria. São Paulo. Universidade de São Paulo, 132p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Depto. de Biologia.
- WHITE, M.J.D. (1968). Models of Speciation. Science, 159: 1065.
- WHITE, M.J.D. (1978). Chain processes in chromosomal speciation. Syst. Zool., 27: 285.