

Revista da

# Biologia

Volume 18 (1)

Fevereiro 2019

[ib.usp.br/revista](http://ib.usp.br/revista)



## Revista da Biologia

Publica textos de todas as áreas da Biologia, abordando questões gerais (ensaios, revisões e comentários) e específicas (artigos experimentais originais, descrição de técnicas e resumos expandidos).

Há espaço também para perspectivas pessoais sobre questões biológicas com relevância social e política (opinião).

A Revista da Biologia é gratuita e exclusivamente on-line. Sua reprodução é permitida para fins não comerciais.

**ISSN1984-5154**

**[www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista)**

## Contato

[revistadabiologia@gmail.com](mailto:revistadabiologia@gmail.com)

### Revista da Biologia

Rua do Matão, trav. 14, 321  
Cidade Universitária, São Paulo  
São Paulo, SP Brasil  
CEP 05508-090

## Volume 18(1)

Publicado em Fevereiro de 2019



## Expediente do volume

### Editor Executivo

Gilberto Xavier

### Editores

Ana Bottallo de Aguiar Quadros  
Bruno Edson Chaves  
Juliana Sobral de Barros  
Karen dos Santos Toledo  
Laila Asth  
Mariana Zanotti Tavares de Oliveira  
Priscila Barreto de Jesus  
Rachel Montesinos  
Rebeca Mascarenhas Fonseca Barreto  
Vinicius Queiroz Araújo

### Editores gráficos

Karen dos Santos Toledo  
Laila Asth  
Priscila Barreto de Jesus

### Consultores científicos

Anônimos

**Ilustrações da capa:** Fungo fotografado na Ilha da Marambaia - RJ, 2017.

Por Karen dos Santos Toledo, bióloga, mestranda em Biologia Animal (UFRRJ), fotógrafa colaboradora e monitora no Núcleo de Fotografia Científica Ambiental - BioCenas (UERJ), e membra do Corpo Editorial da Revista da Biologia (USP).

# Volume 18(1)

## Índice

- Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas** 1  
Filamentous fungi associated with stingless bees  
*João Raimundo Silva de Souza, Maria Inez de Moura Sarquis, Mozanil Correa Pantoja, Pedro de Queiroz Costa Neto, José Odair Pereira, Rosana de Medeiros Sousa Galvão e Maria Ivone Lopes da Silva*
- Sequenciamento de nova geração e entomologia: Novas perspectivas para antigos questionamentos** 6  
Modern sequencing technologies and entomology: New perspectives for old questions  
*Patrícia Regina Ströher*
- Contribuições do Instituto Oswaldo Cruz para o conhecimento da biodiversidade: Novos táxons descritos de 2006 a 2015** 17  
Contributions of the Oswaldo Cruz Institute to the biodiversity knowledge: 2006 to 2015  
*Ana Margarida Ribeiro do Amaral, Camila Dutra e Mello Ribeiro, Vitor Hugo da Silva Martins, Tereza dos Santos e Márcio Felix*
- Biologia Molecular da Doença de Alzheimer** 24  
Molecular Biology of Alzheimer's Disease  
*José Anchieta de Oliveira Filho e José Rodrigo de Nascimento Martins*
- As lendas e a ciência por trás dos répteis gigantes de Araraquara** 31  
Legends and science behind the Araraquara giant reptiles  
*Heitor Francischini, Paula Dentzien-Dias, Virgínia de Gobbi e Marcelo Adorna Fernandes*

# Occurrence of filamentous fungi associated with stingless bees *Melipona* in meliponaries at the metropolitan region of Manaus, Amazonas

Ocorrência de fungos filamentosos associados a abelhas sem ferrão *Melipona* em meliponários da região metropolitana de Manaus, Amazonas

João Raimundo Silva de Souza<sup>1\*</sup>, Maria Inez de Moura Sarquis<sup>2</sup>, Mozanil Correa Pantoja<sup>3</sup>, Pedro de Queiroz Costa Neto<sup>3</sup>, José Odair Pereira<sup>3</sup>, Rozana de Medeiros Sousa Galvão<sup>4</sup>, Maria Ivone Lopes da Silva<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Manaus, Brazil.

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório Coleção de Culturas de Fungos, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola, Manaus, Brazil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Manaus, Brazil.

<sup>5</sup>Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Laboratório de Micologia, Manaus, Brazil.

\*Contato: joaorsdes@yahoo.com

**Abstract.** Microbiota is the set of microorganisms, mainly fungi and bacteria, that are usually associated with tissues and organs of animals or plants. Bee-associated microorganisms can interact with their host in different ways, but the role of ectomicroorganisms still scarce. In order to evaluate the occurrence of filamentous fungi on the body surface of stingless bees (*Melipona* spp.), in artificial beehives of the metropolitan region of Manaus, bees of two meliponaries were studied. All screened bees showed the occurrence of fungi on their body surface, where the genera *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* and *Cladosporium* were more frequent, representing more than 70% of the colonies identified. It remains to be seen whether the fungal microbiota associated with stingless bees is transient, permanent or whether they are performing some specific function.

**Keywords.** *microorganism, filamentous fungi, Melipona, stingless bees.*

Recebido: 04apr17  
Aceito: 02nov17  
Publicado: 27ago18  
Editado por Priscila Barreto e revisado por Anônimo

## Introduction

It is estimated that there can be more than 4000 genera of bees and around 25 to 30000 species distributed in different regions of the world, and Brazil is home of about 25% of these species (Michener, 2000). The stingless bees have around 600 species worldwide. Of the 56 valid genera, 33 are exclusively Neotropical, with 417 described species. In Brazil, there are 244 described species. Of this total, 114 species occur in the Amazon biome (Camargo and Pedro, 2013). The genus *Melipona* occur exclusively from southern South America to the mountains of northern Mexico (Souza et al., 2009a), with about 74 species described (Camargo and Pedro, 2013). However,

despite many *Melipona* species can produce honey in sufficient quantity to be commercially exploited, few are created for this purpose (Silveira et al., 2002). The honey of *Melipona* species presents high medicinal value but have more water than the honey produced by the genus *Apis* Linnaeus, 1758 (bees with sting) and is propitious to fermentation, thus, must be consumed quickly and make its commercialization more complicated (Souza et al., 2004).

The development of a systematic colony breeding process of these bees' species may allow the economic exploitation of their products, which provides an alternative source of income for many local people (Souza et al., 2009a). Brazilian ecosystems, especially the Amazon, have

many conditions that favor the creation of stingless bees. Among them, we can mention: warm climate, diverse flora, which supplies nectar, pollen and resin, flowering distributed throughout the year, different species of honey bees and a large market with a good price for this product (Venturieri, 2008). Although the honey production of stingless bees is lower than that of *Apis mellifera* bee, meliponines have very important advantages over other species, especially because they are much more adapted to the pollination of trees in our forests (Venturieri, 2008).

Pollinators provide valuable services and resources for ecosystems, diseases associated with their disappearance pose a risk to human well-being, both directly and indirectly, by affecting livestock, agriculture and wildlife (Furst et al., 2014). Despite the importance of bees and other pollinators for the maintenance of fauna and flora structure, being responsible for 87.5% of pollination of the Amazonian native flora Ollerton et al. (2011), the abundance of stingless bees' species has decreased due to a negative influence of man on the environment. The fragmentation of natural environment leads to a decrease of shelter supply and foraging sites (decreasing honey production), destruction and/or predation of colonies and a sharp reduction in support capacity of forest reserve areas (Souza et al., 2009a). Other factors that may be influencing the disappearance of stingless bees are competition with African bees, the excessive use of chemicals in agriculture, the predation by other arthropods, and diseases associated with microorganisms such as viruses and fungi as well. All known insect species harbor a rich and complex community of microorganisms such as mites, protozoa, viruses, bacteria and fungi, where they can be found on their body surface or in their interior. However, our knowledge about the native stingless bees' reproduction and associated microbiota still scarce. One of the important aspects about the biology of these insects is the knowledge of the fungal microbiota, which can cause disease to these organisms (Ferraz et al., 2008). Although studies have reported on the microbiota of hives (Santos, 2007; Morais et al., 2013) and honey made by stingless bees in Brazil (Souza et al., 2009b; Matos et al., 2011), few studies have directly examined (Ferraz et al., 2008; Silva et al., 2011) and there are few reports on the relationship of fungi with stingless bees (Ferraz et al., 2008). In this context, a survey was carried out in order to know the diversity and incidence of filamentous fungi on the body surface of stingless bees in Central Amazon.

## Material and Methods

The bees were collected in the season of highest rainfall, in March and during the dry season, in September of 2013, in two meliponaries (bees apiaries), one in the municipality of Manaus (Meliponário Sucupira 3°04'17.15 "S 59°53'10.27" W) and another in the municipality of Iraduba (Sítio dos Tucanos 3°13'02.00 "S 60°13'29.24" W), Amazonas, Brazil. Twenty-four live bees (*Melipona seminigra* end *Melipona interrupta*) were collected per season at each point using forceps. After individual collection, the individual was transferred to individual sterilized

tubes, and packed in a refrigerated thermal box for material preservation. Overall 96 stingless bees were investigated.

Isolation of fungi was performed according to the methodology of King et al. (1979), with modifications. The dead bees were distributed in tubes containing 10 mL of 0.9% NaCl saline solution, vortexed and then 100 µL of the solution was transferred to Petri dishes containing Sabouraud Agar and Potato Agar Dextrose (BDA) with antibiotic solution amoxicillin 100 mg/L, pH 6.8, in triplicate and incubated in BOD at 28 °C for up to 30 days.

The fungi colonies were separated and purified by removing a small fragment of inoculum and transferring to a tube containing 1.0 mL of Tween 80 solution, vortexing until the solution homogenized (São José et al., 1994). Dilution was done serially, transferring 100 µL of the sample suspension into a tube containing 900 µL of sterile saline concentration (dilution 10-1), the dilution was then homogenized and repeated operation in successive dilutions until dilution of 10-3. At the end of the dilution series, 100 µL of the 10-3 dilutions were inoculated in triplicate and incubated at 28 °C for two days. The developing colonies were transferred to tubes, identified and incubated for eight days. The pure samples were collected in Petri dishes for further identification.

The microculture was performed on a slide, according to Riddell (1950) protocol, with modification. Filter paper was used on the bottom of Petri dish, on the paper was placed a pair of coverslips and a 76 x 26 mm sheet sterilized. Two blocks of BDA and or Malt Agar were transferred to the central surface of the slide, at the four ends of the agar block a portion of the colony was inoculated. The two sterile coverslips were deposited on the surface of the agar blocks. Sterilized distilled water was deposited on the bottom of the plate enough for five to seven days.

After fungal growth, the coverslips were carefully removed and placed on a drop of lactophenol-blue dye on the surface of a 76 x 26 mm slide and analyzed by optical microscopy (Onions et al., 1981) for identification of their Sexual and/or asexual structures (Ellis, 1971; Barnett and Hunter, 1972; von Arx, 1974).

We also calculate several assemblage's metrics that provide a more accurate description of the fungal diversity at each meliponarie in both seasons. To compare the dominance of fungi between the different sampling seasons, the data acquired from each site are presented as a percentage of abundance, modified by Ludwig and Reynolds (1988). At where:

$$i = 1, 2, 3, \dots, S$$

$$Pi = \text{percentage of abundance of } i \text{ genera}$$

$$ni = \text{number of colonies of fungi with } i \text{ genera}$$

$$S = \text{number of genera found in all samples}$$

$$Pi = \frac{ni}{\sum_{i=1}^S ni} \times 100$$

To calculate the total  $P_i$  of the bees,  $n_i$  corresponds to the number of fungal colonies of each genus present in the meliponaries in each season. The genera with percentage of abundance ( $P_i$ ) greater than 5% were considered abundant and the others rare ( $P_i < 5\%$ ).

The Shannon Index ( $H'$ ) is a commonly used index that takes into account both abundance and evenness of organisms present in the community.

$$H' = - \sum_{i=1}^S (P_i) (\ln P_i)$$

For greater reliability, we used the Simpson Index ( $D$ ), which measures the likelihood that two individuals randomly selected from one sample belong to the same species. It is an index often used to quantify the biodiversity of a habitat.

$$D = \sum_{i=1}^S P_i^2$$

The Pielou index ( $J$ ) measures the equitability and allows the comparison of the Shannon Weaver index with the distribution of individuals in the observed species that would have maximum diversity.

$$J = \frac{H'}{\ln(S)}$$

We individually tested for differences in number of genera and fungal abundance between localities (Manaus and Iranduba meliponaries) using student T- tests. We also tested for differences fungal abundance between seasons using student T- tests. These analyses, assumes equivalent variances among samples. All data analyses were done in Excel, for windows.

## Results and discussion

We isolated fungi in 100% the bees analyzed. Of the 297 colonies identified morphologically at the genus level, *Penicillium* (71), *Fusarium* (69), *Acremonium* (40) and *Cladosporium* (33) were the most predominant, surpassing 70% of those identified. Among the less frequent ones, *Torula* (2) and *Alysidium* (1) had a lower occurrence, being isolated only in the rainy season in Meliponário de Manaus (Table 1).

Both abundance ( $p = 0.956$ ) and number of genera recorded ( $p = 0.455$ ) were similar between Manaus and Iranduba meliponaries. A similar result was found polling the data from both localities. The abundance of fungal colonies was similar between seasons ( $p = 0.682$ ).

The results obtained in the rainy season and dry season did not show significant variation by the Shannon

	MANAUS		IRANDUBA		Total
	RS	DS	RS	DS	
<i>Penicillium</i>	16.2	37.5	22.5	19.4	71
<i>Fusarium</i>	31.1	11.1	25.8	24.2	69
<i>Acremonium</i>	10.8	2.8	23.6	14.5	40
<i>Cladosporium</i>	2.7	20.8	4.5	19.4	33
<i>Paecilomyces</i>	9.5	6.9	5.6	4.8	20
<i>Verticillium</i>	1.4	4.2	10.1	1.6	14
<i>Moniliella</i>	4.1	2.8	1.1	4.8	9
<i>Aspergillus</i>	4.1	4.2	1.1	1.6	8
<i>Rhizopus</i>	1.4	1.4	3.4	3.2	7
<i>Rhinocladiella</i>	5.4	1.4	0	0	5
<i>Tritirachium</i>	4.1	2.8	0	0	5
<i>Scedosporium</i>	2.7	1.4	1.1	1.6	5
<i>Mucor</i>	1.4	1.4	1.1	1.6	4
<i>Pestalotiopsis</i>	1.4	1.4	0	3.2	4
<i>Torula</i>	2.7	0	0	0	2
<i>Alysidium</i>	1.4	0	0	0	1
Total nº	74	72	89	62	297
Total genus	16	14	11	12	

RS = RAINY SEASON

DS = DRY SEASON

**Table 1.** Abundance (%) of filamentous fungi isolated from stingless bees (*Melipona* spp.) in the rainy and dry seasons of 2013 in the Meliponaries of Manaus and Iranduba, Amazonas-BR

indices ( $H' = 2.15$  and  $2.09$ ), Simpson ( $D = 0.16$  and  $0.17$ ) and Equitability ( $J = 0.04$  and  $0.04$ ) (Table 3), since they were calculated having the genus as a reference taxonomic unit.

The bees sampled during the rainy season represented 54.9% of the isolates, distributed in 16 genera. While the bees surveyed during the dry season represented 45.1% and 14 genera (Table 2). The highest abundance was observed in the rainy season, with emphasis on the genera *Fusarium* (28.2%), *Penicillium* (19.6%) and *Acremonium* (17.8%). In the dry season the genus *Penicillium* (29.1%) was also the most abundant, followed by *Cladosporium* (20.1%) and *Fusarium* (17.2%). The genus *Cladosporium* showed high abundance in the dry season, with a significant increase of 350% in comparison to the rainy season, in another slope, *Fusarium* showed a fall of 50%. Of the rare isolates in the rainy season, *Torula* (1.2%) and *Alysidium* (0.6%) were absent in the dry season (Table 2).

Despite, there was an overall higher number of fungal colonies sampled during the rainy season, decreasing in the following season, the variation between seasons were not significant. Moreira and Siqueira (2002) verified changes in fungal populations according to moisture levels, demonstrating that the higher the humidity, the greater the fungal populations. According to Ishikawa et al. (2012) in the rainy season - it is common to observe great diversity of fungi in the Amazon forest and Braga-Neto et al. (2008) pointed out that in the rainforest in the Ducke Reserve the higher the precipitation, the more fungi are recorded. This high number of fungi in bees in the seasons may be related to the season of greater foraging activity of stingless bees. The bee's external activities are concentrated in the morning, both in the rainy season from March

	MANAUS/IRANDUBA	
	RS	DS
<i>Penicillium</i>	19.6	29.1
<i>Fusarium</i>	28.2	17.2
<i>Acremonium</i>	17.8	8.2
<i>Cladosporium</i>	3.7	20.1
<i>Paecilomyces</i>	7.4	6.0
<i>Verticillium</i>	6.1	3.0
<i>Moniliella</i>	2.5	3.7
<i>Aspergillus</i>	2.5	3.0
<i>Rhizopus</i>	2.5	2.2
<i>Rhinochadiella</i>	2.5	0.7
<i>Tritirachium</i>	1.8	1.5
<i>Scedosporium</i>	1.8	1.5
<i>Mucor</i>	1.2	1.5
<i>Pestalotiopsis</i>	0.6	2.2
<i>Torula</i>	1.2	0
<i>Alysidium</i>	0.6	0
Total nº	163	134
Tota occurrence %	54.9	45.1
Total genus	16	14

RS = RAINY SEASON

DS = DRY SEASON

**Table 2.** Occurrence (%) of filamentous fungi isolated from stingless bees (*Melipona* spp.) in the rainy seasons and dry seasons of 2013 in Meliponaries de Manaus and Iranduba, Amazonas-BR

to June, and in the dry season from September to December (Oliveira et al., 2012).

The high frequency of fungi in the analyzed bees confirms the diversity of these microorganisms on the body surface of these insects. Leão et al. (2012) studying stingless bees have reported that these insects are inhabited by a large diversity of microorganisms, but most of them are still unknown; Lima et al. (2012) and Morais et al. (2013) also highlighted the diversity of fungi associated with stingless bees.

In studies by Ferraz et al. (2008) and Lima et al. (2012), *Penicillium* and *Aspergillus* genus presented a high occurrence, however, in this study the genus *Penicillium* also had a high occurrence, but *Aspergillus* showed less frequency, with the same occurrence in both collection seasons. The genera *Fusarium*, *Acremonium* and *Verticillium* were not isolated by Ferraz et al. (2008) and Lima et al. (2012). Perhaps some factors may have influenced this occurrence: climate, habitat, different regions; or even the few reports of fungi associated with stingless bees.

The genera *Trichoderma*, *Monilia* and *Geotrichum* isolated by Lima et al. (2012); *Curvularia*, *Monilia*, *Nigrospora* and *Trichoderma*, by Ferraz et al. (2008), were not isolated in this study. Even showing low frequency *Moniliella*, *Rhinochadiella*, *Tritirachium*, *Scedosporium*, *Pestalotiopsis*, *Torula* and *Alysidium* had not yet been reported in stingless bees before. *Rhizopus* and *Mucor* were rarely isolated from stingless bees. Only Eltz and Gorke (2002) reported *Rhizopus* on stingless bees.

In many cases, the interaction between stingless bees and fungal microbiota may be viewed as mutualists (Morais et al. 2013), while in others can be classified as commensals. Menezes et al. (2015) report the first record of symbiosis between a stingless bee and cultivated fungus, and Oliveira et al. (1996 and 1999) describe that resins used by solitary or social bees to construct and protect their nests has inhibitory activity against some microorganisms such as bacteria and fungi. Marsaioli et al. (1998) isolated symbiotic filamentous fungi on the body surface of stingless bees, these fungi showed resistance to the nest's antimicrobial activity, but these fungal isolates presented promising antimicrobial activity.

From the fungus perspective, the bees may be facilitating the spore dispersion. Bees can travel a distance of 3 km and visit dozens of flowers from several plant species in search of food (Almeida et al., 2003). Therefore, the dispersion of the high number of fungi isolated from the body surface of these insects in these studies may be favored. The high cost of the molecular tools and the difficulty in morphological identification at the species level, hinders studies with fungi. The importance of knowing the fungal microbiota of stingless bees is fundamental to relate the interaction not yet understood between these organisms.

### Acknowledgments

To the Federal University of Amazonas and to the Pos Graduate Course in Biological Diversity. To Dr. Maria Ivone Lopes da Silva for guidance and support. To Dr. Maria Inez de Moura Sarquis of the Oswaldo Cruz Institute - RJ for the identification of fungi. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Dr. Italo Thiago Silveira Rocha Matos, Dr. José Odair Pereira and Dr. Rozana de Medeiros Souza Galvão for suporte in the Laboratory. To the Foundation of Support to the Research of the State of Amazonas - FAPEAM for the financial support.

		Genus	Simpson (D)	Equitability (J)	Diversity Shannon (H')
<b>MANAUS/IRANDU</b>	RS	16	0.16	0.04	2.15
<b>BA</b>	DS	14	0.17	0.04	2.08

RS = RAINY SEASON

DS = DRY SEASON

**Table 3.** Diversity of filamentous fungi isolated from stingless bees (*Melipona* spp.) in the rainy seasons and dry seasons of 2013 in Meliponaries de Manaus and Iranduba, Amazonas-BR

## References

- Almeida D, Marchini LC, Sodr e GS, d' vila M, Arruda CMF. 2003. Plantas visitadas por abelhas e poliniza o, Série Produtor Rural, Edi o Especial, Piracicaba: ESALQ. 40p.
- Barnett HL, Hunter BB. 1972. Il lustrated genera of imperfect fungi, 3 ed. Minneapolis, Minnesota, USA: Burgess Publishing Co, 241p.
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American Journal of Botany 98(3): 426-438.
- Braga-Neto R, Luiz o RCC, Magnusson WE. 2008. FUNGOS. In: Oliveira ML, Baccaro FB, Braga-Neto R, Magnusson WE (Org.). Reserva Ducke - A biodiversidade amaz nica através de uma grade, Manaus. 1 ed, Attema Design Editorial 1: 31-38.
- Camargo JMF, Pedro SRM. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR. (Orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version.
- Ellis BM. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 608p.
- Eltz T, Bruhl CA, Gorke C. 2002. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. Insects Sociaux 49(1): 28-30.
- Ferraz RE, Lima PM, Pereira CCO, Freitas ND, Feij  FMC. 2008. Microbiota F ngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). Neotropical Entomology 37(3): 345-346.
- Furst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF. 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. Nature 506, 364-366.
- Ishikawa NK, Vargas-Isla R, Chaves RS, Cabral TS. 2012. Macrofungos da Amazônia: importância e potencialidades. Ciência e Ambiente 44: 129-139.
- King AD, Hocking AD, Pitt JI. 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of from foods. Applied and Environmental Microbiology 37(5): 959-964.
- Leão CS, Menezes M, Teixeira JCS, Silva JB. 2012. Filamentous fungus grows inside brood cells of *Melipona* bees and is eaten by larvae. Anais do X Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto. p. 162.
- Lima CBS, Ribeiro F, Gava CA. 2012. Identifica o de fungos encontrados em col nias de manduri (*Melipona asilvai*) em Petrolina-PE. Semana Entomológica da Bahia (SINSECTA), Cruz das Almas-BA 1: 240.
- Ludwig JA, Reynolds JE. 1988. Statistical Ecology: a primer on methods and computing. John Wiley & Sons, New York.
- Matos ITSR, Nunes MT, Mota DA, Laureano MMM, Hoshiba MA. 2011. Qualidade microbiológica do mel de *Melipona* spp. produzido na Amazônia Central (Parintins - AM - Brasil). Revista Verde 6(4): 91-95.
- Marsaioli AJ, Porto ALM, Gonçalves RAC, Oliveira CMA, Manfio GP, Bittrich V. 1998. The Ecosystem of Microorganisms, Bees, and *Clusia* Floral Resin and Oils, from the Chemistry Point of View. Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, Phuket, Thailand.
- Michener CD. 2000. The bees of the World. Baltimore, Johns Hopkins University. 913p.
- Morais PB, São Thiago Cala a OS, Rosa C. 2013. Microorganisms associated with stingless bees. In: Vit, P.; Pedro, S.R.M.; Roubik, D. (Org.). Pot honey: A legacy of stingless bees. 1ed, Springer 1: 173-186.
- Moreira FMS, Siqueira JO. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. UFLA/FAEPE, Lavras. 626p.
- Oliveira FL, Dias VHP, Costa EM, Figueira MA, Sobrinho JE. 2012. Influência das varia es climáticas na atividade de voo das abelhas jandairas *Melipona subnitida* Ducke (*Meliponinae*). Revista Ciência Agron mica 43(3): 598-603.
- Oliveira CMA, Porto ALM, Bittrich V, Marsaioli AJ. 1999. Two polyisoprenylated benzophenones from the oral resins of three *Clusia* species. Phytochemistry 50: 1073-1079.
- Oliveira CMA, Porto ALM, Bittrich V, Marsaioli AJ. 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. Tetrahedron Letters 37: 6427-6430.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? Oikos 120: 321-326.
- Onions AHS, Allsopp D, Eggins HOW. 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology, 7 ed., Edward Arnold (ed.), London: Great Britain. 398p.
- Riddell RW. 1950. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. Mycologia 42(2): 265-270.
- Roubik DW. 2006. Stingless bee nesting biology. Apidologie 37: 124-143.
- Santos AL. 2007. Identifica o da flora microbiana em colmeias de *Meliponina*. Disserta o de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-gradua o em Genética e Bioquímica, Uberlândia, Minas Gerais. 35p.
- São José C, Costa MJ, Almeida MJ. 1994. Isolamento de fungos queratinof licos a partir de Areia de Praias. Revista de Biologia. Lisboa 15: 161-171.
- Silva RT, Carvalho-Zilse GA, Rafael JA. 2011. Insetos associados a col nias de abelhas sem ferr o amazônicas em melipon rio urbano e rural. In: 38  CONBRAVET - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis. Revista de Ciências Agroveterinárias, Número Especial.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB. 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identifica o. Belo Horizonte. Ministério do Meio Ambiente/Funda o Ararauc ria. 253p.
- Souza BA, Carvalho CAL, Alves RMO, Dias CS, Clarton L. 2009a. Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrota. 1 ed. Cruz das Almas-BA: Série Meliponicultura, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia 7, 46p.
- Souza BA, Marchini LC, Dias CTS, Oda-Souza M, Carvalho CAL, Alves RMO. 2009b. Avalia o microbiológica de amostras de mel de trigon neos (*Apidae*: *Trigonini*) do Estado da Bahia. Ciência e Tecnologia de Alimento. Campinas 29(4): 798-802.
- Venturieri GC. 2008. Cria o de abelhas indígenas sem ferr o. 2 ed. Revisada e Atualizada. Belém, PA: EMBRAPA Amazônia Ocidental 2, 60p.
- von Arx JA von. 1974. The genera of fungi sporulating in pure culture. 2 ed. J. Cramer, Vaduz. 351p.

# Sequenciamento de nova geração e entomologia: Novas perspectivas para antigos questionamentos

Modern sequencing technologies and entomology: New perspectives for old questions

Patrícia Regina Ströher<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

\*Contato: patricia.stroher@gmail.com

**Resumo.** Este artigo é uma revisão das novas tecnologias disponíveis para sequenciamento de DNA e sua aplicabilidade nos estudos entomológicos. O texto traz uma perspectiva histórica do assunto, as principais plataformas disponíveis na atualidade e também informações de como estes instrumentos funcionam, discutindo sua utilidade para resolver questões como biogeografia, taxonomia e evolução. No passado, importantes questões evolutivas ficavam com respostas limitadas em várias áreas (incluindo a entomologia), quando o cenário envolvia organismos não-modelo. Os métodos anteriores muitas vezes não possuíam protocolos aplicáveis às peculiaridades de cada indivíduo ou espécie que permitissem recuperar a informação contida em seus genomas a fim de resolver indagações filogenéticas e biogeográficas. Outro ponto interessante do sequenciamento de nova geração e insetos diz respeito à possibilidade de recuperação de DNA antigo, como o contido em exemplares de coleções científicas e museus. Estas novas tecnologias tornam possível o acesso a um novo universo de informações que até então estava inacessível aos pesquisadores.

**Palavras-chave.** *Interdisciplinaridade; organismos não-modelo; DNA fóssil.*

**Abstract.** *This manuscript is a revision of the available new technologies to perform DNA sequencing and its application in entomology studies. A historical view is presented as the currently accessible tools to study biogeography, taxonomy and evolution. In the past, important evolutive questions were limited when non-model organisms were involved. Previous methodologies commonly did not have protocols adapted to single individuals or species in order to be able to recover the information behind their genomes to resolver phylogenetic and biogeographic topics. Other point related with these new sequencing technologies and insects is the possibility of ancient DNA recovery, as the information in scientific collections and museums. These technologies made possible to address a new informational universe that was previously inaccessible.*

**Keywords.** *Interdisciplinary approach; non-model organisms; Fossil DNA .*

Recebido: 09dez16  
Publicado: 27ago18

Editado por Laila  
Asth e revisado por  
Anônimo.

## Introdução

Um campo de estudo ainda jovem e em plena revolução: é assim que podemos falar da Biologia Molecular. Quando analisamos esta área aplicada aos estudos entomológicos (particularmente com a finalidade de resolver questões de sistemática, taxonomia e biogeografia), percebemos que este campo é ainda mais recente, mas que também está em franco crescimento. E justamente neste momento em que a maioria dos pesquisadores começa a quebrar a barreira entre as duas áreas (entomologia e biologia molecular), seguindo uma tendência científica mundial, a interdisciplinaridade, surgem novas tecnologias que os fazem reaprender o conteúdo há tão pouco tempo assimilado (a autora deste texto inclusa). Faz parte da ciência e de ser um pesquisador, aliás, são as constantes novidades e curiosidade com o desconhecido que atraíram muitos destes pesquisa-

dores para a carreira científica, a necessidade de contínua adaptação não é novidade. Os que mais recentemente aliam dados moleculares nas suas pesquisas provavelmente já foram inseridos nas técnicas mais atuais e, portanto, não estão passando por esta fase de transição necessária para quem já trabalhava com tais dados. O “Next-Generation Sequencing” ou “Massively Parallel Sequencing” conhecidos pelas siglas NGS e MPS, respectivamente consistem no sequenciamento de DNA através de milhares de leituras em paralelo gerando milhões de sequências em uma única corrida de um equipamento automatizado. Assim, a intenção deste artigo é fazer uma revisão do sequenciamento de nova geração e sua aplicação, particularmente nos estudos com insetos a fim de colaborar com entomólogos que queiram incorporar esta nova tecnologia em seus projetos.

## Sequenciamento de DNA

Atualmente o sequenciamento de DNA (principalmente em humanos e em outros organismos modelo), permite-nos vislumbrar possibilidades como a medicina personalizada, sequenciamento completo de genomas e reconstrução de genomas fósseis como plenamente plausíveis, mesmo que estes termos em um passado recente fossem considerados enredo de ficção científica.

O sequenciamento de DNA é resultado de esforços de biologia molecular que começaram a se tornar proeminentes na década de 1950. No entanto, as pesquisas com o intuito direto de sequenciamento do material genético só começaram no início da década de 1970 comandadas por Frederick Sanger. A equipe do Professor Sanger em 1977 publicou dois importantes trabalhos (Sanger et al., 1977a; Sanger et al., 1977b) descrevendo todos os procedimentos necessários para se chegar à leitura dos hoje populares quatro nucleotídeos A, C, G e T que compõem o material genético de todos os organismos, bem como, publicaram o primeiro genoma a ser desvendado, o fago phi X17. O princípio desta técnica perdurou por mais de três décadas como a única forma pela qual cientistas sequenciavam DNA em seus laboratórios, mesmo quando o processo manual passou a ser automatizado no fim da década de 1980 e início da década de 1990, o método era essencialmente o mesmo. Trata-se de um sequenciamento enzimático baseado na interrupção da cadeia pela adição de um dideoxinucleotídeo, que nada mais é do que um nucleotídeo com uma modificação química: não possui o grupo hidroxila (OH) 3', não permitindo a ligação do próximo nucleotídeo. Estes nucleotídeos modificados são marcados com P32 que podem ser visualizados através de raios-X. Assim, após a geração dos fragmentos estes eram submetidos a um gel de eletroforese e observados em filmes de raios-X onde tinham suas sequências determinadas (Sanger et al., 1977a). Era um processo manual, com múltiplas etapas, com as leituras realizadas a olho nu e que deixava os cientistas constantemente expostos aos raios-X (Mardis, 2013), mas de tamanha importância para ciência que rendeu o segundo prêmio Nobel em química para Sanger no ano de 1980. O método Sanger começou a ganhar maior escala e popularização nos laboratórios quando em 1986 a empresa Applied Biosystems, Inc. (ABI) iniciou a comercialização de um sequenciador de DNA baseado em fluorescência que foi desenvolvido anteriormente por Smith et al. (1986). Neste aperfeiçoamento do método, a marcação com P32 foi eliminada, gerando uma grande economia de tempo extinguindo várias etapas manuais e com isso aumentando a acurácia ao eliminar uma das fontes de erro. Outro avanço da mesma época que não pode deixar de ser citado foi o desenvolvimento da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis et al., 1986). Esta técnica permite a amplificação de sequências de DNA em milhões de cópias através de reações em ciclos catalisadas por uma enzima polimerase termoestável, assim a quantidade inicial de DNA usada pôde ser bem menor (Mardis, 2013).

Após aproximadamente uma década sem grandes revoluções no sequenciamento de DNA, o lançamento de sequenciadores de capilar teve um grande impacto na área. Estes instrumentos resolveram o problema com relação ao

gel eletroforético ao injetar as amostras diretamente em uma matriz de capilares, proporcionando uma resolução individual dos nucleotídeos. O equipamento de maior sucesso foi o ABI PRISM® 3700, que começou a ser comercializado em 1999. Este modelo, logo seguido de sua versão posterior ABI 3730, foram os principais instrumentos utilizados no sequenciamento do genoma humano e do rato (Mardis, 2013). O projeto genoma humano foi oficialmente declarado finalizado em 2003, dois anos antes do previsto (Chial, 2008), mas teve seu início ainda no ano de 1990 (Watson, 1990), portanto, levou mais de uma década para que as três bilhões de bases fossem decifradas com um orçamento inicial de também três bilhões de dólares (Watson, 2001). Com este grande salto em conhecimento e entusiasmo dos pesquisadores ao redor do mundo em utilizar dados genômicos, logo empresas de biotecnologia perceberam que uma nova forma de sequenciamento mais rápida e menos laboriosa seria necessária para tornar a genômica trivial a todos os organismos. Era o início de uma nova era no sequenciamento de DNA, onde novas tecnologias passaram a ser desenvolvidas não mais por biólogos, mas também por engenheiros, não mais em universidades, mas em empresas. Isto individualmente, resultou em uma revolução que produziu equipamentos capazes de realizarem o mesmo trabalho de trinta mil sequenciadores dos modelos usados no início dos anos 2000, juntos (Schnable, 2010).

## Sequenciamento de nova geração

Em meados de 2005, após quase trinta anos de sequenciamento pelo mesmo método, surgiram os primeiros equipamentos com uma abordagem alternativa à Sanger (Margulies et al., 2009). Uma tecnologia onde o DNA a ser sequenciado é usado para construir uma biblioteca de fragmentos que possuem DNAs sintéticos (adaptadores) ligados covalentemente a eles. Estes adaptadores são sequências universais, específicos para cada plataforma, usados pela polimerase para amplificar os fragmentos das bibliotecas. Este processo ocorre geralmente em uma superfície sólida, seja em vidro plano ou em volta de "beads" (microesferas magnéticas). Em essência, os instrumentos de sequenciamento de nova geração conduzem a amplificação dos nucleotídeos e a detecção (o sequenciamento em si) em uma única etapa, enquanto o método Sanger realiza os dois processos separados (Mardis, 2013). Além do baixo rendimento, o sequenciamento via método Sanger, para obter bons resultados, requer que o DNA amplificado esteja em alta concentração (Polz and Cavanaugh, 1998) e fornece um único padrão de sinal, ou eletroferograma, para cada sequência gerada. Ambas as características diferem da tecnologia de nova geração que pode ser conduzida com baixas concentrações de DNA e produz milhões de sinais em paralelo para a mesma sequência (Shokralla et al., 2014).

Outro contraste entre os dois métodos que vale ser mencionado é o tamanho da sequência produzida. Enquanto o método Sanger (após décadas de refinamento) produz fragmentos com ≈1000 pares de base (pb) (Shendure and Hanlee, 2008), os primeiros sequenciadores de nova geração produziam fragmentos com apenas 150-200 pb (Schuster, 2007). Atualmente, o sequenciamento de nova geração já

capaz de produzir fragmentos com mais de 500 pb (Glenn, 2016). A taxa de erro no sequenciamento de nova geração que no início era mais elevada do que a do método Sanger, foi sendo diminuída juntamente com o aprimoramento das plataformas e atualmente não pode mais ser apontada como uma crítica às novas tecnologias (Shokralla et al., 2014). Mas, uma das principais vantagens do sequenciamento de nova geração ainda não foi mencionada: o custo. Após o investimento inicial com um novo equipamento o custo por megabase é inferior a \$ 0.10 com a possibilidade de sequenciamentos completos de genomas em um período inferior a uma semana (Glenn, 2016). Assim, os custos e prazos são apenas uma fração dos necessários para o sequenciamento via método Sanger.

O pequeno tamanho das sequências produzidas inicialmente aliada à necessidade de compra de novos equipamentos podem ser explicações para a maioria dos cientistas, a princípio, não adotarem o novo método. Mesmo as versões iniciais da plataforma 454 (considerado o primeiro sequenciador de nova geração) que facilmente geravam o equivalente a mesma informação de 50 sequenciadores modelo 3730XL da Applied Biosystems (método Sanger), com apenas um sexto do custo, tiveram reações surpreendentemente reservadas (Schuster, 2007). Na verdade, houve certa resistência da comunidade científica em alterar a forma que há tanto tempo vinha sendo utilizada no sequenciamento de material genético. Este fato pode ser observado pelo reduzido número de artigos que utilizaram a nova tecnologia nos primeiros anos após o lançamento das primeiras plataformas. Ao invés de abraçar a nova tecnologia e rapidamente adaptar-se para aproveitar seu enorme potencial, muitos cientistas acostumados ao método Sanger, levantaram questionamentos com relação à acurácia, tamanho dos fragmentos gerados, custo de infraestrutura ou apenas a objeção de lidar com o grande volume de dados gerados pela nova tecnologia. Este ceticismo, que se iniciou nas agências de financiamento, pode ter sido impulsionado pelo medo de que investimentos substanciais no sequenciamento Sanger poderiam se tornar obsoletos (Schuster, 2007).

Somente agora, mais de uma década após o lançamento do sequenciamento de nova geração, é que estas tecnologias ganham maior popularidade no meio científico. O estranhamento inicial e as preocupações com relação à acurácia e eficiência já foram superados. Cada dia mais cientistas percebem que esta é uma tecnologia que está transformando “o que nós pesquisamos, como nós pesquisamos e quanto irá custar” (Glenn, 2011). Conseqüentemente, muitos centros de genômica têm reduzido gradualmente os seus sequenciadores Sanger e passaram a incorporar a tecnologia NGS (Shokralla et al., 2014). O desafio agora é treinar e formar profissionais para que o sequenciamento de nova geração que já é viável se torne realidade como ferramenta de estudos para outras áreas além da genética e biologia molecular.

## Plataformas

Nesta revisão será usada a mesma nomenclatura proposta por Glenn 2011, em que são chamadas plataformas de 2a geração as que necessitam da amplificação prévia de DNA

para o sequenciamento, 3a geração para as plataformas que sequenciam diretamente e individualmente as moléculas de DNA e simplesmente plataformas de sequenciamento de nova geração, indicadas com a sigla “NGS” para de forma genérica fazer referência aos instrumentos de 2a e 3a geração. As plataformas aqui discutidas serão as que estão disponíveis atualmente e/ou as mais largamente utilizadas, tendo em vista que algumas plataformas que surgiram já estão praticamente extintas ou simplesmente não possuem instrumentos disponíveis para venda, como o sequenciador Helicos (Nikolaki and Tsiamis, 2013). A maioria das plataformas necessita que o DNA seja fragmentado em sequências curtas, entre 200-100 pb, e que a solução contenha primers ou adaptadores, ou seja, a construção de uma biblioteca se faz necessária (Glenn, 2011). Abaixo segue uma breve descrição destes equipamentos:

- 454- A primeira plataforma NGS comercialmente disponível foi lançada no ano de 2005, atualmente faz parte dos equipamentos comercializados pela empresa Roche e seu princípio usa o pirosequenciamento. Esta técnica utiliza beads e inicia o processo com uma única molécula de DNA que é amplificada em uma PCR de emulsão, após, as milhões de beads são transferidas para uma placa. Nesta placa cada bead só encaixa em apenas uma nanofenda onde serão sequenciadas em paralelo. O processo utiliza uma enzima luciferase que produz luz detectável a cada vez que um nucleotídeo é incorporado e assim permite o sequenciamento (Margulies et al., 2005). Em outubro de 2013 foi realizado um anúncio pela empresa Roche comunicando que até meados de 2016 a empresa iria gradualmente descontinuar a venda de equipamentos baseados em pirosequenciamento. Atualmente o sequenciador continua anunciado no website da empresa, mas começam a surgir os primeiros relatos de pesquisadores comunicando que não há mais a possibilidade de adquirir os kits de reagentes para o correto funcionamento do sequenciador.

- Illumina- Inicialmente lançada com o nome de Solexa foi subsequentemente adquirida pela companhia Illumina de onde vem o nome atual. O princípio deste método usa bridge PCR, onde pontes de DNA são criadas e amplificadas em uma superfície sólida, criando agrupamentos chamados de clusters. Os milhões de clusters produzidos possuem, cada um, mais de mil cópias do DNA inicial que serão sequenciados com uma estratégia similar ao método Sanger. A diferença é que apenas terminadores marcados por fluorescência são utilizados e há a garantia de que a cada etapa somente um nucleotídeo é incorporado. A cada incorporação o nucleotídeo é detectado por um dispositivo de leitura que interpreta qual a identidade do mesmo, o sequenciamento ocorre em paralelo em todos os clusters ao mesmo tempo (Morozova and Marra, 2008). No início de 2014 a companhia anunciou um novo sistema, o HiSeq X™ Ten Sequencing System. Este produto quebrou a “barreira do som” da genômica ao se tornar capaz de sequenciar um genoma humano completo por apenas mil dólares gerando seis bilhões de bases por dia, podendo sequenciar mais de 18 mil genomas por ano. Atualmente o portfólio da plataforma Illumina é composto por seis equipamentos que se diferenciam entre si na escala e tamanho das sequências geradas: Illumina MiniSeq,

Illumina MiSeq, Illumina NextSeq 500/550, Illumina HiSeq 1500/2500, Illumina HiSeq 3000/4000 e Illumina HiSeq X Ten.

- SOLiD- No presente esta plataforma é administrada pela Thermo Fisher Scientific, empresa resultante primeiramente pela fusão das companhias Applied Biosystems e Invitrogen, formando a Life Technologies Corporation em 2009. Em 2014 a empresa foi adquirida pela Thermo Fisher Scientific, por este motivo ainda é comum encontrarmos nomes de diferentes empresas associadas a esta plataforma. A tecnologia SOLiD também faz uso das beads, mas aqui elas são inseridas diretamente em chip onde ocorre a leitura das seqüências. Estes chips podem ser divididos em oito áreas, permitindo a análise de oito bibliotecas simultaneamente. Outra diferença é que as bases são determinadas por meio de ligação, ou seja, a enzima utilizada é uma DNA ligase ao invés da conhecida DNA polimerase (Glenn, 2011). Atualmente o alto custo para aquisição e a limitação de aplicações tornam esta plataforma praticamente inviável, sendo considerada um “potencial zumbi” (Glenn, 2016).

- Ion Torrent- É uma plataforma também administrada pela empresa Thermo Fisher Scientific. Sua estratégia de sequenciamento é similar a aplicada pela 454, com o contraste de que esta tecnologia detecta íons de hidrogênio (H<sup>+</sup>) ao invés de sinal luminoso. A utilização de H<sup>+</sup> implica na não necessidade de uso de lasers, câmeras ou marcadores fluorescentes. O lançamento dos primeiros equipamentos ocorreu no final no ano de 2010. No segundo semestre de 2012 foi lançado o sucessor deste equipamento, o Ion Proton que utiliza chips maiores sendo capaz de gerar 10 gigas de informação por corrida (Nikolaki and Tsiamis, 2013). Em setembro de 2015 foi lançado o Ion Torrent – S5 com a possibilidade de uso de três novos chips, permitindo ao pesquisador escolher qual o mais conveniente com a sua necessidade de escala de sequenciamento. Infelizmente os novos chips não são operáveis entre os equipamentos da plataforma “Ion”. Esta tecnologia, em especial o S5, pode ser vista como uma alternativa aos equipamentos Illumina MiniSeq, Illumina MiSeq e Illumina NextSeq 500/550, no entanto, sua baixa representatividade nos laboratórios e a baixa disponibilidade de softwares ainda não o tornaram competitivo (Glenn, 2016).

- PacBio- Foi a plataforma de 3ª geração que alcançou maior notoriedade, a empresa Pacific Biosciences desenvolveu um equipamento capaz de sequenciar moléculas únicas de DNA em tempo real. Isto é possível pela observação imediata da enzima DNA polimerase onde as bases são detectadas no exato momento em que ocorre a síntese, isto é praticável por uma marcação fluorescente (Glenn, 2011). Uma desvantagem dos sequenciadores de 3ª geração é a taxa de erro, superior aos índices das outras plataformas (Quail et al., 2012). No início de 2016 a empresa lançou um novo equipamento chamado Sequel System, um equipamento menor, mais leve que custa metade do valor e com capacidade de sequenciamento sete vezes maior do que o seu antecessor. No entanto, a tecnologia continua muito mais cara do que o Illumina e com maior taxa de erro, mas a promessa de aperfeiçoamento na plataforma a torna muito promissora (Glenn, 2016).

- MinION- Plataforma apresentada pela empresa britânica Oxford Nanopore em 2012, mas sua tecnologia vem sendo desenvolvida desde a segunda metade da década de 1990 (Kasianowicz et al., 1996). Aqui o sequenciamento se faz por meio de sinais elétricos detectados no momento em que os nucleotídeos passam através de nanoporos (Ninomiya et al., 2013). O equipamento todo possui o tamanho similar a um HD externo onde as amostras são inseridas e o sequenciador é acoplado diretamente aos computadores dos pesquisadores. Causou grande entusiasmo na comunidade científica, ao permitir, por exemplo, imaginar o sequenciamento de DNA tão acessível que este poderia ser realizado em campo. Infelizmente, após vários adiamentos, ainda não apresenta data para ser lançado no mercado. Em abril de 2014, alguns cientistas ao redor do globo foram selecionados para testar o equipamento em seus laboratórios e imediatamente surgiram fotos nas mídias sociais da plataforma em uso no dia-a-dia (Nextgenseek, 2014). Após dois anos de uso a plataforma apresenta grandes melhorias, embora sua alta taxa de erro ainda seja considerada como um fator limitante e que possivelmente está impedito sua ampla comercialização (Glenn, 2016). É um produto que gera muita expectativa, mas após quatro anos de espera continua sendo considerado apenas como “uma promessa”.

- GenapSys- Faz parte do portfólio da empresa Sigma-Aldrich, ainda não foi lançado oficialmente e não possui detalhes da sua tecnologia divulgados, mas promete ser uma nova alternativa de sequenciador portátil e atualmente está recrutando pesquisadores para testar a tecnologia (Glenn, 2016).

- Genia- Finalizando os sequenciadores de moléculas únicas, este equipamento é considerado uma combinação das tecnologias da Oxford Nanopore, Illumina e Pacbio (Robison, 2016). Detalhes do funcionamento da tecnologia foram surpreendentemente publicados em acesso aberto recentemente (Fuller et al., 2016). A empresa foi adquirida pela Roche em 2014 e afirma que em breve será possível sequenciar um genoma humano por apenas 100 dólares (GENIA TECHNOLOGIES, 2016).

As plataformas 454, Illumina e SOLiD são as mais populares em laboratórios acadêmicos (Glenn, 2016), estes três equipamentos possuem estratégias distintas quanto ao tamanho de fragmentos produzidos. Enquanto o 454 produz um número de leituras menor em cada corrida com fragmentos maiores, o Illumina e SOLiD produzem um número maior de leituras e fragmentos com tamanhos menores. Aqui cabe uma consideração com relação ao número de pares de base necessários para se considerar uma leitura curta ou longa. Segundo Glenn (2011), são considerados fragmentos curtos aqueles  $\leq 50$  bases consecutivas, fragmentos médios aqueles que possuem  $\geq 51$ , mas  $< 400$  bases consecutivas, fragmentos longos aqueles com  $\geq 400$ , mas  $< 1000$  bases consecutivas e, finalmente fragmentos estendidos aqueles  $> 1000$  bases.

Leituras longas são mais indicadas em casos onde o objetivo é a caracterização de todo o genoma ou transcriptoma, uma vez que fragmentos longos são mais fáceis de serem montados do que fragmentos curtos. No entanto, o baixo custo e o incremento no número de leituras associado os sequenciadores de fragmentos curtos os tornam mais ade-

quados em casos de resequenciamento (quando um genoma completo já está disponível) ou em casos em que a frequência de leituras é importante como estudos de expressão gênica (Glenn, 2011). Mas, é importante lembrar que praticamente todas as plataformas estão aumentando progressivamente o tamanho dos fragmentos gerados, assim muitas das plataformas podem ser usadas para as mesmas aplicações. Então, entre tantas possibilidades, qual escolher? Levando em consideração o tempo, custos e tamanhos de fragmentos, um veredito atual sobre qual é a plataforma mais apropriada para estudos em organismos não modelo, o título fica com a plataforma Illumina. Enquanto a tecnologia da Oxford Nanopore e similares não chegam a todos e ao mercado, Illumina aparece como a plataforma de escolha na maioria dos laboratórios e mesmo quando as mais recentes tecnologias se consolidarem e se tornarem confiáveis, o equipamento Illumina provavelmente continuará dominante, competitivo e estes deverão coexistir por um período (Yoder, 2014).

Se o sequenciamento de nova geração é uma realidade que vem aumentando o tamanho dos fragmentos e baixando os custos criando a sensação de que só existem benefícios, precisamos mencionar que as novas tecnologias também possuem suas desvantagens. O Calcanhar de Aquiles do NGS é sem dúvida o recurso computacional necessário para as análises (El-metwally et al., 2013). A montagem dos genomas surge como um problema, pois é impossível sequenciar diretamente um genoma inteiro em apenas uma leitura usando as tecnologias atuais. Os métodos de sequenciamento quebram as leituras randomicamente e as leem de forma individual, o processo de reconstrução total do genoma requer grande poder computacional para fazer a junção correta dos fragmentos até o nível cromossômico.

Devido a estas limitações em recursos computacionais, a construção dos genomas é a tarefa mais difícil enfrentada pelas novas tecnologias de sequenciamento. Alguns equipamentos geraram um volume de dados tão grande que foram considerados impossíveis de serem totalmente examinados (Egan et al., 2012). A necessidade de computadores tão potentes deve-se também aos milhões de fragmentos curtos produzidos, tendo em vista que estas sequências requerem análises mais intensas para serem agrupadas.

Não bastasse o desafio computacional dos extensos dados gerados, outra dificuldade é o fato destes não serem comunicáveis entre si. Cada plataforma gera seus arquivos em formatos únicos e possuem seus próprios protocolos para montagem e análise dos dados (Metzker, 2009). E quando o sequenciamento é feito de forma terceirizada, muitas vezes, é mais rápido enviar as sequências produzidas, gravadas em dispositivos físicos, via serviço postal tradicional ao invés de fazer o download das sequências via web (Jones et al., 2012). Em língua inglesa o termo Sneakernet é informalmente usado para definir esta transferência de arquivos usando um componente físico, estratégia que também é usada no caso da entrega dos resultados do NGS.

Ferramentas e conhecimento em bioinformática são essenciais para quem deseja lidar com os dados de forma crua, ou seja, assim que eles saem das plataformas de NGS. As ferramentas atuais ainda não possuem interfaces interativas aos usuários, de fácil configuração e independência

do sistema operacional, tornando-se um desafio para os pesquisadores sem profundos conhecimentos em informática (El-metwally et al., 2013). Embora promessas de novos programas que irão permitir avanços técnicos para que as tecnologias de NGS continuem evoluindo e ao mesmo tempo se tornem mais acessíveis e populares tenham sido feitas (Egan et al., 2012), atualmente a grande maioria das análises continuam sendo executadas através de “linha de comando”.

Como é possível usar a maioria das plataformas para a maior parte das aplicações, a economia de dinheiro, o tempo para aquisição dos dados e o tempo necessário para analisar a quantidade de informação gerada são itens importantes para a escolha da plataforma (Glenn, 2011). Com o número de equipamentos disponíveis aumentando e os custos diminuindo, dependerá apenas do nosso conhecimento em relação aos sistemas e da nossa criatividade desenvolver e adaptar estas tecnologias para obtermos dados de nosso interesse de forma eficiente. Ao aplicar estas novas tecnologias aos nossos organismos de estudo, que até pouco tempo estavam fora do alcance deste campo, expandimos também toda uma área de conhecimento. Esta afirmação tem base na ideia de que plataformas de NGS estão ajudando a abrir áreas de investigação biológica inteiramente novas, incluindo a investigação de genomas antigos, a caracterização de diversidade ecológica e a identificação de agentes etiológicos desconhecidos (Mardis, 2008).

### **Sequenciamento de nova geração e organismos não modelo: Entomologia**

As plataformas de nova geração tornaram o sequenciamento mais acessível aos organismos não modelo, como boa parte dos insetos. É uma era em que praticamente qualquer organismo pode ser estudado de forma genômica (Ekblom and Galindo, 2010) e que faz surgir inclusive novas áreas de estudo, como a “ecologia genômica” (Gilad et al., 2009). Com a mudança do reino da genômica de endereço, saindo de estudos baseados em grandes laboratórios com espécies modelo para estudos de populações naturais, as pesquisas podem agora abordar importantes questões ecológicas e evolutivas em uma escala de precisão que soaria irrealista há apenas alguns anos atrás.

O método anterior requer o desenvolvimento de protocolos individualizados para a maioria das espécies, com primers específicos para a PCR (necessária na amplificação preliminar do DNA), além de ajustes finos em tempos e temperaturas. Pela imensa diversidade encontrada em insetos, na grande maioria das vezes não era possível aplicar o mesmo protocolo em diferentes organismos, em alguns casos até mesmo entre espécies muito próximas filogeneticamente. Isto limitava o número de marcadores moleculares que poderiam ser usados em insetos, ficando possível em boa parte dos estudos o uso apenas do DNA mitocondrial, pois este possui um genoma infinitamente menor e mais conhecido do que o nuclear. Isto facilitou o desenvolvimento de alguns primers genéricos que permitem seu uso em diferentes espécies, além das mitocôndrias possuírem múltiplas cópias em cada célula, aumentando a taxa de sucesso na amplificação final. No entanto, o material genético mitocondrial muitas vezes

não contém informação necessária para responder muitas perguntas filogenéticas. Assim, parece até “injusto” que após o sequenciamento de nova geração superar a inércia de praticamente três décadas na área (Schuster, 2007), e que vivendo em plena era genômica alguns pesquisadores continuem a usar a mesma tecnologia que traz resultados semelhantes há tantos anos.

É preciso saber tirar proveito desta nova era de informação a fim de responder os principais questionamentos que envolvem estudos em organismos não modelo. Inicialmente a aplicação mais comum para o NGS nestes casos foi a caracterização de transcriptomas (Ekblom and Galindo, 2010), ou seja, descrever como os genes são expressados em determinados tecidos, estágios de vida ou sob pressão de condições específicas. Um exemplo deste tipo de abordagem é o trabalho de Feldmeyer et al., (2013) utilizando insetos sociais. Este estudo com a espécie *Temnothorax longispinosus* utilizou sequenciamento de nova geração para tentar responder um questionamento que remota a época de Darwin: explicar a evolução das castas sociais, em especial das operárias (Darwin, 1859). A tecnologia NGS permitiu a comparação dos genomas de uma rainha e de três operárias com funções distintas na colônia, com os resultados apontando para cerca de 2500 genes que são diferencialmente expressos entre os indivíduos estudados. A técnica empregada neste caso chama-se RNA-Seq e consiste na detecção e quantificação de RNA em uma amostra em um determinado momento usando uma plataforma NGS (Wang et al., 2009). Mas, um dado não relacionado com o transcriptoma (expressão dos genes) e sim com a bioinformática chamou a atenção neste estudo: menos de 50% das sequências produzidas foram anotadas, um resultado que não era esperado uma vez que já existem diversos genomas de formigas sequenciados e anotados.

Aqui chegamos a um ponto que pode ser frágil quanto ao uso de NGS e sequenciamento completo de genomas em organismos não modelo. Como apenas fragmentos curtos são gerados, para que o genoma possa ser montado e anotado é preciso que já exista um genoma previamente sequenciado de outro organismo filogeneticamente próximo. Este genoma parente serve como referência para que as sequências curtas produzidas pelos equipamentos NGS sejam encaixadas, como em um quebra-cabeça. Assim, o sequenciamento completo de genomas, bem como o desenvolvimento de marcadores é facilitado para os organismos que já possuem parentes filogenéticos com genomas sequenciados. Em insetos, este é o caso principalmente de organismos pertencentes à Diptera (Celniker et al., 2002), Coleoptera (Richards et al., 2008), Lepidoptera (The International Silkworm Genome Consortium, 2008) e Hymenoptera (Gadua et al., 2012). Isto não significa que organismos sem espécies proximamente relacionadas com genomas sequenciados não possam se beneficiar da tecnologia NGS, a estes ainda estão disponíveis outras abordagens capazes de produzir milhares de sequências, com baixo custo em um curto espaço de tempo como o RADSeq (Davey and Blaxter, 2011), cujo detalhes não são o foco desta revisão.

É importante ressaltar que já há alguns anos estas modernas tecnologias de sequenciamento estão sendo consideradas como o novo padrão para alguns pesquisadores na área filogenética (McCormack and Faircloth, 2012), inclusive sendo aplicadas para elucidar questões de filogeografia (O’neil et al., 2013). O uso de NGS permite uma coleta de dados em escalas maiores viabilizando estudos mais robustos sobre a história demográfica de populações e suas variações de aptidão associadas aos ambientes (Steiner et al., 2013).

Outra aplicação do NGS aos estudos entomológicos em especial é a implementação do “DNA barcoding” ou código de barras. Nesta técnica uma pequena parte variável do genoma (usualmente mitocondrial) é sequenciada a partir de amostras não especificadas. A informação contida na sequência é então utilizada para identificar as espécies presentes na amostra (Valentini et al., 2009). O DNA código de barras pode ser usado para detectar espécies crípticas (Janzen et al., 2012; Chacon et al., 2013), para investigar interações ecológicas complexas (Smith et al., 2011) e até para determinar o conteúdo de produtos comerciais (Wallace et al., 2012). Esta abordagem também está sendo empregada com insetos em pesquisas de monitoramento ambiental, como em BRODIN et al., (2012) que mostrou um incremento de 10% para mais de 90% no sucesso em identificação de espécies de Chironomidae (Diptera) em amostras bentônicas do Mar Báltico através do uso de NGS.

Uma vez que as tecnologias de NGS estão se tornando acessíveis para vários cientistas, tornam-se possíveis também trabalhos que possibilitem inferências puramente ecológicas e/ou evolutivas através destes tipos de dados (Fukatsu, 2012). Como referência a estas aplicações pode-se citar a pesquisa com uma espécie de Pyrrhocoridae (Hemiptera) e a caracterização de sua microbiota intestinal. A conclusão principal foi que a maioria das bactérias está localizada na região anóxica do sistema digestivo, levando a considerações importantes com relação ao mutualismo e à coevolução destes organismos (Sudakaran et al., 2012). O estudo conseguiu avaliar diferentes regiões do trato digestivo dos insetos, em diferentes fases de desenvolvimento, de diferentes regiões geográficas e que se alimentaram de distintas dietas. Esta enorme quantidade de sequências que revelou em detalhes a microbiota destes insetos seria praticamente impossível de ser produzida utilizando apenas técnicas tradicionais.

É importante também ressaltar a importância da tecnologia em estudos médico-veterinários relacionados aos insetos, como sequenciamento do genoma da mosca tsé-tsé (Attardo et al., 2014). A *Glossina morsitans* é o vetor para a famosa doença do sono e que constitui um flagelo para as populações da África Subsaariana, o tratamento é longo e complicado e sem ele a doença é geralmente fatal (Welburn et al., 2009). A decodificação deste material genético permitirá o reconhecimento de genes responsáveis pelo desenvolvimento inseto, contribuindo para elaborar novas estratégias de controle. O genoma levou uma década para ser concluído e custou \$10 milhões, o projeto teve início em um período pré-NGS, mas mesmo assim chegou

a usar as novas tecnologias em fases subsequentes (Attardo et al., 2014). Como o sequenciamento do genoma ficou mais rápido e barato o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos fomentou o sequenciamento de outras cinco espécies de *Glossina* que foi realizado em menos de dois anos, permitindo inclusive estudos de caracterização de potenciais genes alvo no controle da mosca (Macharia et al., 2016).

Em termos de conservação, análises genômicas que antes eram limitadas aos organismos modelo agora podem ser aplicadas a espécies ameaçadas a fim de estimar recentes acontecimentos demográficos, variação genética e a estrutura das populações (Steiner et al., 2013). Tendo em vista que o fluxo gênico entre unidades de conservação é um fator muito importante em termos de manutenção destas populações, uma técnica como NGS que traz uma grande quantidade de informações, em um curto período de tempo e com baixo custo é uma ferramenta importante para mensurar estas conexões.

### DNA Histórico e Coleções Científicas

O campo de estudos com DNA antigo começou a ganhar ânimo na metade da década de 1980 quando ocorreu a extração e sequenciamento do DNA do Quagga, um equídeo da África do Sul que foi extinto no século XIX (Higuchi et al., 1984), seguido do anúncio do sequenciamento do material genético de uma múmia egípcia (Pääbo, 1985). Estes trabalhos utilizaram clonagem bacteriana para amplificar pequenas sequências de DNA (as amostras foram retiradas da pele destes espécimes) e mostraram que a origem da maioria do material genético extraído era de micróbios ou fungos. Apenas uma pequena porcentagem do DNA pertencia aos organismos em estudo e eram compostos principalmente de DNA mitocondrial (Rizzi et al., 2012). Alguns anos mais tarde o desenvolvimento da PCR deixou mais acessível à amplificação de DNA antigo, resultando em uma rápida diversificação e crescimento da área (Pääbo et al., 1989) e (Thomas et al., 1989). No entanto, devido à enorme capacidade da PCR em amplificar mesmo poucas cópias de material genético que estejam na amostra, a contaminação com DNA moderno acabou se tornando um problema importante (Rizzi et al., 2012).

Até recentemente, análises com DNA antigo eram na maioria das vezes restritas a fragmentos curtos, geralmente provenientes do genoma mitocondrial. Alguns avanços foram realizados em termos técnicos para aumentar o tamanho dos fragmentos, mas nenhuma inovação havia revolucionado a estudo com material genético antigo como o surgimento do NGS fez (Knapp and Hofreiter, 2010). Assim que a primeira plataforma foi lançada em 2005, já foi quase que imediatamente implementada na pesquisa com DNA fóssil. Apenas alguns meses após a introdução do NGS, Poinar et al., (2006) publicaram um artigo com 13 milhões de pares de base de DNA provenientes do genoma nuclear do extinto mamute. Isto representou um incremento de 480X no número de bases produzidas a partir de um exemplar fóssil em relação ao estudo que havia conseguido maior

quantidade de informação genética até então (Knapp and Hofreiter, 2010).

O acesso a grande diversidade genômica armazenada em coleções científicas criaria oportunidades sem precedentes para estudos evolutivos, filogenéticos e de genética de populações (Staats et al., 2013). Porém, várias complicações surgem ao se manipular material antigo, e existem problemas técnicos que são específicos deste campo de estudo. Estes empecilhos muitas vezes são acentuados em espécimes de museus, onde a qualidade do DNA varia muito entre as amostras e os níveis de contaminação são geralmente altos (Millar et al., 2008). Mas, a principal dificuldade consiste na produção de quantidades suficientes de sequências de DNA autênticas para que se possa chegar a resultados conclusivos. Este obstáculo é consequência de processos de degradação do DNA post mortem, que podem levar a erros na leitura ou na destruição física da molécula, aumentando as chances de sequências contaminantes exógenas serem amplificadas (Rizzi et al., 2012). Porém, a qualidade do DNA recuperado parece ser mais influenciada pelo modo como os espécimes são tratados e armazenados nas coleções do que simplesmente pelo tempo que se passou deste a coleta (Mason et al., 2011). Especificamente com relação às coleções entomológicas é sabido que métodos tradicionais usados para sacrificar os organismos, como o acetado de etila e substâncias similares, são responsáveis por danos ao material genético (Dillon et al., 1996). Estas adversidades já estavam presentes nas tentativas de sequenciamento de material antigo via método Sanger, mas agora podem ser mais facilmente contornadas via NGS. Trabalhos que utilizaram sequenciamento de nova geração em exemplares provenientes de museus mostraram que a quantidade e a qualidade das sequências geradas de espécimes antigos não foram inferiores às sequências produzidas de tecidos frescos das mesmas espécies (Staats et al., 2013).

Uma característica comum a todas as plataformas de NGS faz com que organismos coletados no passado, inclusive os insetos pertencentes às coleções entomológicas, se tornem propícios a este método de sequenciamento: a fragmentação do material genético. Com relação aos espécimes de museus a variação no tamanho dos fragmentos é gigantesca, mas em material genético fóssil geralmente são menores do que 150 pares de base, com alguns chegando a apenas 50 pares de base (Knapp and Hofreiter, 2010). A conexão entre este tipo de amostra e o NGS acontece porque as principais plataformas de NGS requerem como etapa inicial a fragmentação do DNA após a extração, seja de forma mecânica ou química (Mardis, 2013). Justamente a degradação do passar do tempo, que fragmentava o DNA de espécimes fósseis ou dos depositados em coleções, e que na maioria das vezes impossibilitava o sequenciamento via o método tradicional, agora é uma característica que não os inviabilizam mais. Aliás, este passo de fragmentação é inclusive descartado no NGS quando as amostras são de espécimes antigos (Knapp and Hofreiter, 2010). Assim, o NGS é considerado ideal para este tipo de pesquisa, uma

vez que fornecem sequências para todas as moléculas de DNA no extrato, independentemente do seu tamanho, e a probabilidade de preferência por moléculas contaminantes atuais é menor (Knapp and Hofreiter, 2010).

O advento das plataformas de NGS tornou possível pela primeira vez amostrar o DNA nuclear antigo do mamute (Poinar et al., 2006) e do Homem de Neandertal (Green et al., 2006), ambos com milhares de anos. Se estes trabalhos com resultados favoráveis fazem muitos imaginar um mundo cinematográfico de possibilidades, um trabalho mais recente, que tentou acessar o DNA fóssil de insetos impregnados em resina, nos mostrou que em alguns casos, nem mesmo a tecnologia NGS pode ser suficiente para trazer o passado à tona (Penney et al., 2013). O trabalho da equipe de pesquisadores ingleses comprovou que a existência de DNA em amostras fossilizadas em resina é altamente improvável. Os resultados do início da década de 1990 que haviam conseguido extrair DNA de âmbar de milhões de anos e que não puderam ser replicados (Austin et al., 1997), hoje são tratados como exemplos clássicos de contaminação das amostras por DNA moderno (Hebsgaard et al., 2005). Como citado anteriormente, nos protocolos tradicionais o DNA era amplificado via PCR, que preferencialmente irá amplificar qualquer molécula de DNA moderna, não danificada e que esteja como contaminante no extrato antigo gerando falsos positivos ao serem confundidos com DNA fóssil genuíno (Brown and Brown, 2011). A degradação do DNA é influenciada por vários fatores como o conteúdo de água e oxigênio, temperatura ambiente e tempo decorrido desde a morte do organismo (Lindahl, 1993). Assim, intuitivamente, poderíamos imaginar que o rápido envolvimento em resina, resultando em uma morte quase instantânea e gerando um ambiente anóxico, promoveria uma preservação do material genético do inseto, mas por razões físico-químicas ainda desconhecidas isto não ocorre (Penney, et al., 2013). Certamente os processos de preservação e fossilização não são uniformes (nem mesmo na fossilização em resina) e o resultado negativo em uma fonte de material fóssil não pode ser vista como uma negativa para todas as outras formas fósseis ou desencorajar futuras pesquisas. Dados teóricos e empíricos indicam que fragmentos de DNA podem estar presentes em material geológico bem preservado com até 100 mil anos de idade e sugerem que alguns materiais com até um milhão de anos poderiam fornecer sequências (Hebsgaard et al., 2005), nestes cenários novas tecnologias de NGS são essenciais para acessarmos tais dados.

Se no presente as novidades para o DNA fossilizado em âmbar não são tão animadoras, o mesmo não se pode dizer para amostras de coleções científicas e em especial para coleções entomológicas que possuem resultados estimulantes, ainda mais por possuírem uma riqueza incomparável de biodiversidade e de dados de distribuição geográfica protegidos em seu interior. A informação contida nestas coleções está se tornando cada vez mais acessível à medida que mais museus dispõem seus catálogos na web e os curadores destas coleções

permitem estudos moleculares com amostras mais raras. No entanto, como a maioria dos exemplares em coleções científicas são insubstituíveis, tentativas de extração de DNA destrutivas geralmente são desencorajadas. Neste sentido existem grandes progressos já realizados com o desenvolvimento de métodos não destrutivos de recuperação de DNA proveniente de insetos em museus (Gilbert et al., 2007) e (Thomsen et al., 2009), incluindo amostras do século XIX que foram fixadas de forma tradicional (Chapco and Litzenger, 2004). Quanto à contaminação existem também algumas recomendações técnicas que são importantes e que podem ser aplicadas de forma simples. São lavagens prévias dos exemplares a fim de eliminar fungos e outros microrganismos que possam ter se desenvolvido na superfície dos espécimes, além do uso de pipetas com filtro exclusivas e laboratórios distintos para extração e o processamento do material genético (Staats et al., 2013).

Resultados promissores com DNA antigo de outros grupos ou com material genético fóssil nos permitem presumir toda sua aplicabilidade latente às coleções entomológicas, como a possibilidade de estudar as relações genéticas entre organismos extintos e seus familiares contemporâneos. A preservação de muitos indivíduos, todos provenientes de uma única localidade, coletados anteriormente por naturalistas, oferece uma oportunidade única para acompanhar as mudanças em uma população ao longo do tempo (Rizzi et al., 2012). Além disso, o NGS de DNA histórico permite recuperar informações genéticas essenciais de antigos espécimes tipo e, portanto, abre também uma nova fronteira para a pesquisa taxonômica (Staats et al., 2013). Com relação às espécies extintas, espécimes de museus podem representar “fósseis em alfinetes” (Larsen, 2005), e sequências recuperadas destes exemplares podem ajudar no posicionamento destes táxons nas filogenias (Penney et al., 2013). Esta abordagem também seria útil para o estudo de faunas extintas e endêmicas de ilhas, não apenas para entender suas relações evolutivas, mas também para elucidar sua história biogeográfica.

Um ponto adicional a favor da utilização de insetos depositados em coleções científicas é a dificuldade na coleta de insetos em determinadas regiões do planeta, seja por limitações orçamentárias, conflitos armados ou até por leis restritivas de conservação da vida selvagem em determinados ambientes (Kothamasi, 2009). Algumas espécies são tão raras que não há garantia alguma de que serão coletadas novamente durante uma nova expedição de campo. Outra vantagem potencial de dados provenientes de material genético de insetos em museus seria a geração de um conjunto de dados para examinar os efeitos moleculares de eventos de poluição que ocorreram no passado, tal como testes com bombas atômicas e de outras formas de radiação ou exposição a substâncias químicas (Penney et al., 2013), como foi explorado mais recentemente em um estudo com borboletas após o acidente nuclear de Fukushima (Hiyama et al., 2012).

Até recentemente, quase todos os estudos genéticos realizados em espécimes antigos tinham como alvo

regiões do genoma mitocondrial. As expectativas futuras são de que por meio da tecnologia NGS o sequenciamento completo de genomas antigos, tanto mitocondriais como nucleares, sejam possíveis, inclusive com exemplos de sucesso em insetos (Staats et al., 2013). A identificação, estimativa e eliminação de sequências contaminantes em amostras antigas são questões que ainda precisam ser discutidas e melhor resolvidas (Rizzi et al., 2012), mas é inegável que as novas tecnologias abriram uma janela de acesso a faunas antigas de formas que não podiam ser consideradas possíveis em um passado não tão distante. O sequenciamento de nova geração pode trazer a pesquisa com DNA antigo para o centro da biologia evolutiva e torna-la uma parte crucial da genética moderna. Afinal de contas, o que melhor poderia ajudar a compreender a evolução do que visualizar seu andamento em tempo real? (Knapp and Hofreiter, 2010).

### Perspectivas futuras

Com os contínuos avanços tecnológicos desta área, é arriscado especular muito adiante no futuro. No entanto, pode ser assegurado que uma das grandes vantagens das tecnologias de NGS para entomologia e campos afins, é a pequena quantidade de material genético necessário para se iniciar o sequenciamento. Isto torna estas tecnologias adequadas para estudos com espécies ameaçadas de extinção, onde é necessária uma amostragem não invasiva, bem como para exemplares de coleções científicas que requerem métodos não destrutivos de extração do DNA. Há inclusive esforços que visam ir ainda mais longe e abrem a possibilidade de análises baseadas em sequências de células individuais (Yan et al. 2013). Além disso, podemos esperar que tecnologias disponíveis no momento continuem melhorando sua capacidade de produção de sequências juntamente com a diminuição da taxa de erro, dando maior qualidade a montagem dos genomas.

O incremento da velocidade e decréscimo dos custos na geração de dados moleculares está transformando vários campos da biologia. As tecnologias de NGS estão revolucionando a ecologia ao derrubar as barreiras entre ecologia, biologia molecular, genética e genômica (Tautz et al., 2010). O futuro parece muito promissor e é muito interessante que cada vez mais pesquisas adicionem dados moleculares aos seus resultados. Certamente estas novas tecnologias de sequenciamento irão contribuir para que a informação contida no material genético dos organismos se difunda como ferramenta aos cientistas.

Cientistas que se entusiasmarem com as possibilidades apresentadas neste texto e que não se intimidarem com os desafios ainda existentes, podem decidir por utilizar estas novas tecnologias de sequenciamento. No entanto, precisarão de cautela para não desperdiçar recursos. Raramente laboratórios isolados de zoologia ou ecologia terão uma demanda tão grande de sequências genéticas conforme a capacidade destes novos equipamentos. Assim, o ideal é realizar parcerias com laboratórios que já disponham destes sequenciadores, a fim de otimizar o uso e não obter um patrimônio que em pou-

cos anos estará ultrapassado em termos de tecnologia. Uma alternativa é a terceirização do sequenciamento, atualmente existem muitas empresas no mercado que realizam o sequenciamento de forma comercial. Aos que pretendem adquirir os novos sequenciadores vale lembrar que é preciso considerar os custos com mão de obra altamente especializada para a operação e manuseio que são específicas de cada plataforma. É preciso também considerar os custos com a manutenção dos instrumentos, gasto que muitas vezes não é levado em consideração quando da aquisição deste tipo de equipamento e que geralmente possui um suporte técnico oneroso.

### Agradecimentos

Agradeço ao Professor Dr. Marcio R. Pie pelas positivas sugestões neste manuscrito e fundamental incentivo durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho. Sou grata ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração em Entomologia) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e aos seus professores que estiveram presentes durante toda a minha formação científica. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado número 140262/2013-0, e agradeço a bolsa doutorado-sanduíche no exterior concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) número 99999.002880/2014-08. O apoio financeiro de ambas as agências foi essencial para o desenvolvimento deste artigo e pesquisa desenvolvida durante a revisão.

### Referências

- Attardo G, Abila, PP, Auma JE, Baumann AA, Benoit JB, Brelsfoard CL, et al., 2014. Genome sequence of the Tsetse fly (*Glossina morsitans*): Vector of African Trypanosomiasis. *Science* 344(6182): 380–386.
- Austin JJ, Ross AJ, Smith AB, Fortey RA, Thomas RH. 1997. Problems of reproducibility - does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264(1381): 467–474.
- Brodin Y, Ejdung G, Strandberg J, Lyrholm T. 2012. Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). *Molecular Ecology Resources* 13(06): 996–1004.
- Brown KA, Brown TA. 2011. *Biomolecular archaeology: An introduction*. Malden, MA: Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd).
- Celniker S E, Wheeler DA, Kronmiller B, Carlson JW, Halpern A, Patel S. et al., 2002. Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biology* 3(12):research0079.1–0079.14
- Chacón I, Janzen D, Hallwachs W, Sullivan J, Hajibabaei M. 2013. Cryptic species within cryptic moths: New species of *Dunama schaus* (Notodontidae, Nystaleinae) in Costa Rica. *ZooKeys* 264: 11–45.
- Chapco W, Litzenger G. 2004. A DNA investigation into the mysterious disappearance of the Rocky Mountain grasshopper, mega-pest of the 1800s. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30(3): 810–814.
- Chial H. 2008. Human genome project: Sequencing the human

- genome. *Nature Education* 1(1):219.
- Darwin C. 1859. *The origin of species (by means of natural selection)*. London: John Murray.
- Davey J W, Blaxter ML. 2011. RADSeq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9(5-6):416–423.
- Dillon, N, Austin AD, Bartowsky E. 1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology* 5(1):21–24.
- Egan A N, Schlueter J, Spooner DM. 2012. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany* 99(2):175–185.
- Eklom R, Galindo J. 2010. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107(1): 1–15.
- El-Metwally S, Hamza T, Zakaria M, Helmy M. 2013. Next-generation sequence assembly: Four stages of data processing and computational challenges. *PLoS Computational Biology* 9(12): e1003345.
- Feldmeyer B, Elsner D, Foitzik S. 2013. Gene expression patterns associated with caste and reproductive status in ants: Worker-specific genes are more derived than queen-specific ones. *Molecular Ecology* 23(1):151–161.
- Fukatsu T. 2012. Next-generation sequencing sheds light on intricate regulation of insect gut microbiota. *Molecular Ecology* 21(24):5908–5910.
- Fuller C W, Kumar S, Porel M, Chien M, Bibillo A, Stranges PB, et al. 2016. Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(19):5233–5238.
- Gadau J, Helmkamp M, Nygaard S, Roux J, Simola DF, Smith CR, et al. 2012. The genomic impact of 100 million years of social evolution in seven ant species. *Trends in Genetics* 28(1):14–21.
- Genia Technologies. 2016. <http://www.geniachip.com/technology/>
- Gilad Y, Pritchard JK, Thornton K. 2009. Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies. *Trends in Genetics* 25(10):463–471.
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M. 2007. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE* 2(3):e272.
- Glenn TC. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* 11(5):759–769.
- Glenn T. 2016 NGS field guide: Overview. <http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2016>
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons J F, et al. 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444(7117):330–336.
- Hebsgaard MB, Phillips MJ, Willerslev E. 2005. Geologically ancient DNA: Fact or artefact? *Trends in Microbiology* 13(5):212–220.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312(5991): 282–284.
- Hiyama A, Nohara C, Kinjo S, Taira W, Gima S, Tanahara A, Otaki JM. 2012. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2:570.
- Janzen DH, Hallwachs W, Harvey DJ, Darrow K, Rougerie R, Hajibabaei M, et al. 2012. What happens to the traditional taxonomy when a well-known tropical saturniid moth fauna is DNA barcoded? *Invertebrate Systematics* 26(6):478.
- Jones DC, Ruzzo WL, Peng X, Katze MG. 2012. Compression of next-generation sequencing reads aided by highly efficient de novo assembly. *Nucleic Acids Research* 40(22): e171.
- Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(24): 13770–13773.
- Knapp M, Hofreiter M. 2010. Next generation Sequencing of ancient DNA: Requirements, strategies and perspectives. *Genes* 1(2):227–243.
- Kothamasi D, KIERS ET. 2009. Emerging conflicts between Biodiversity conservation laws and scientific research: The case of the Czech Entomologists in India. *Conservation Biology* 23(5):1328–1330.
- Larsen TB. 2005. Hazards of butterfly collecting – fossil on a pin. *The entomologist's record and journal of variation* 117:109–111.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422):709–715.
- Macharia R, Mireji P, Murungi E, Murilla G, Christoffels A, Aksoy S, Masiga D. 2016. Genome-wide comparative analysis of Chemosensory gene families in Five Tsetse fly species. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(2):e0004421.
- Mardis ER. 2008. Next-generation DNA Sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9(1):387–402.
- Mardis ER. 2013. Next-generation Sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6(1):287–303.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Mason VC, Li G, Helgen KM, Murphy WJ. 2011. Efficient cross-species capture hybridization and next-generation sequencing of mitochondrial genomes from noninvasively sampled museum specimens. *Genome Research* 21(10):1695–1704.
- McCormack JE, Faircloth BC. 2012. Next-generation phylogenetics takes root. *Molecular Ecology* 22(1):19–21.
- Metzker ML. 2009. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11(1):31–46.
- Millar CD, Huynen L, Subramanian S, Mohandesan E, Lambert DM. 2008. New developments in ancient genomics. *Trends in Ecology & Evolution* 23(7):386–393.
- Morozova O, Marra MA. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92(5):255–264.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263–273.
- Nikolaki S, Tsiamis G. 2013. Microbial diversity in the era of Omic technologies. *BioMed Research International* 2013: 1–15.
- Ninomiya M, Ueno Y, Shimosegawa T. 2013. Application of deep sequence technology in hepatology. *Hepatology Research* 44(2):141–148.
- Penney D, Wadsworth C, Fox G, Kennedy SL, Preziosi RF, Brown TA. 2013. Absence of ancient DNA in sub-fossil insect inclusions preserved in “Anthropocene” Colombian Copal. *PLoS ONE* 8(9): e73150.
- Poinar, HN. 2006. Metagenomics to Paleogenomics: Large-scale Sequencing of mammoth DNA. *Science* 311(5759):92–94.
- Pääbo, S. 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314(6012):644–645.
- Pääbo S, Higuchi R, Wilson A. 1989. Ancient DNA and the poly-

- merase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *The Journal of biological chemistry* 264(17):9709–12.
- Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13(1):341.
- Richards S, Gibbs R, Weinstock G, Brown S, Denell R, Beeman R, et al. 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452(7190):949–55
- Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli, D. 2012. Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44(1):21.
- Robison K. 2016. Omics! Omics! <http://omicsomics.blogspot.com.br/2016/04/genia-publishes-platform-progress.html>
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes J C, et al. 1977a. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature* 265(5596):687–695.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977b. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12):5463–5467.
- Schnable J. 2010. Even faster Sequencing. <http://www.jamesandthegiantcorn.com/2010/01/13/even-fastersequencing/>
- Schuster SC. 2007. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5(1):16–18.
- Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10):1135–1145.
- Shokralla S, Gibson JF, Nikbakht H, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabaei M. 2014. Next-generation DNA barcoding: Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources* 14(5): 892–901.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell C R, et al. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321(6071): 674–679.
- Smith MA, Eveleigh ES, McCann KS, Merilo MT, McCarthy PC, Van Rooyen K I. 2011. Barcoding a quantified food web: Crypsis, concepts, ecology and hypotheses. *PLoS ONE* 6(7): e14424.
- Staats M, Erkens RHJ, van de Vossen B, Wieringa JJ, Kraaijeveld K, Stielow B, et al. 2013. Genomic treasure Troves: Complete genome Sequencing of Herbarium and insect museum specimens. *PLoS ONE*, 8(7):e69189.
- Sudakaran S, Salem H, Kost C, Kaltenpoth M. 2012. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology* 21(24):6134–6151.
- Tautz D, Ellegren H, Weigel D. 2010. Next generation molecular ecology. *Molecular Ecology* 19: 1–3.
- The International Silkworm Genome Consortium. 2009. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology* 38(12):1036–45.
- Thomas R H, Schaffner W, Wilson AC, Pääbo S. 1989. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340(6233):465–467.
- Thomsen PF, Elias S, Gilbert MTP, Haile J, Munch K, Kuzmina S, et al. 2009. Non-destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS ONE*, 4(4):e5048.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24(2):110–117.
- Wallace, LJ, Boilard SMAL, Eagle SHC, Spall JL, Shokralla S, Hajibabaei M. 2012. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of natural health products. *Food Research International* 49(1):446–452.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1):57–63.
- Watson JD. 1990. The human genome project: Past, present, and future. *Science* 248(4951):44–49.
- Watson JD. 2001. The human genome revealed. *Genome Research* 11(11):1803–1804.
- Welburn SC, Maudlin I, Simarro PP. 2009. Controlling sleeping sickness – a review. *Parasitology* 136(14):1943.
- Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, et al. 2013. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(9):1131–1139.
- Yoder J. 2014. 2014 NGS field guide: Resistance is futile (mostly, at least for a while). <http://www.molecularecologist.com/2014/03/2014-ngs-field-guide-resistance-is-futilemostly-at-least-for-a-while/>

# Contribuições do Instituto Oswaldo Cruz para o conhecimento da biodiversidade: Novos táxons descritos de 2006 a 2015

Contributions of the Oswaldo Cruz Institute to the biodiversity knowledge: New taxa described from 2006 to 2015

Ana Margarida Ribeiro do Amaral<sup>1,\*</sup>, Camila Dutra e Mello Ribeiro<sup>1</sup>, Vitor Hugo da Silva Martins<sup>1</sup>, Tereza dos Santos<sup>1</sup>, Márcio Felix<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plataforma de Apoio à Pesquisa e Inovação do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*Contato: anamaral@ioc.fiocruz.br

**Resumo.** Novos táxons descritos por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz de 2006 a 2015 foram catalogados com base na *Web of Science*. Dados como filós estudados, coleções de depósitos dos holótipos e identificação de hospedeiros, dentre outros, foram contabilizados e analisados. Em dez anos, 107 artigos científicos foram publicados, com a descrição de 175 novos táxons dos domínios Bacteria e Eukaryota, sendo 12 gêneros e 163 espécies, incluindo quatro fósseis. A grande maioria das espécies descritas ocorre no Brasil. Dos seis filós registrados, Arthropoda é o mais representado. Oitenta holótipos foram depositados em coleções do Instituto Oswaldo Cruz. Os resultados mostram a continuidade da produção em taxonomia nessa instituição, historicamente atuante na pesquisa em biodiversidade desde 1901.

**Palavras-chaves.** *Taxonomia; Espécie nova; Gênero novo; Web of Science; Análise de artigos científicos; Cienciometria*

**Abstract.** New taxa described by researchers from the Oswaldo Cruz Institute in the years 2006 to 2015 were catalogued based on *Web of Science*. Data as studied phyla, holotype repositories, and identification of hosts, among others, were accounted and analyzed. In ten years, 107 papers were published with descriptions of 175 new taxa from the domains Bacteria and Eukaryota, being 12 genera and 163 species, including four fossil ones. Most of described species occurs in Brazil. Arthropoda is the most representative of the six registered phyla. Eighty holotypes were deposited in collections of the Oswaldo Cruz Institute. The results show the continuity of the taxonomic production in this institution, which is historically active in biodiversity research since 1901.

**Keywords.** *Taxonomy; New species; New genus; Web of Science; Research articles analysis; Scientometrics.*

Recebido: 10fev17  
Aceito: 11dez17  
Publicado: 27ago18

Editado por  
Rachel Montesinos  
e revisado por  
Anônimo

## Introdução

Diversidade biológica significa variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; incluindo a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (CDB, 2000). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2015), o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, uma vez que detém mais de 20% do número total de espécies da Terra, o que eleva o país ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos.

Frente a este panorama, é fundamental que

sejam estruturadas ações que visem o cumprimento das obrigações da Convenção sobre a Diversidade Biológica (ONU, 1992), assinada pelo Brasil e mais de 160 outros países em 1993. A Convenção está estruturada sobre três bases principais – a conservação da diversidade biológica, o uso sustentável da biodiversidade e a repartição justa e equitativa dos benefícios provenientes da utilização dos recursos genéticos – e se refere à biodiversidade em três níveis: ecossistemas, espécies e recursos genéticos (MMA, 2015).

A descrição de novos táxons é de fundamental relevância para o conhecimento da biodiversidade. Pelo fato do Brasil ser um país biologicamente

megadiverso, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas nessa área, que contribuem para o diagnóstico da sua biota e, conseqüentemente, da biota mundial. Tais informações são fundamentais para a preservação e conservação de espécies e ecossistemas, e para o combate à biopirataria e exploração indevida do patrimônio genético.

O Instituto Oswaldo Cruz (IOC) tem grande tradição em estudos taxonômicos. Desde o início do século XX já contribuía para a descrição de novas espécies, principalmente de grupos relacionados à transmissão de agentes etiológicos. Destaca-se a publicação do próprio Dr. Oswaldo Cruz (Cruz, 1901), na qual ele descreve o mosquito *Anopheles lutzii* Cruz, 1901 (Insecta: Diptera: Culicidae), primeira espécie nova proposta por um pesquisador da instituição, que resultou no depósito dos primeiros tipos em suas coleções biológicas, especificamente na Coleção Entomológica do IOC (Figura 1). As expedições realizadas pelos pesquisadores do IOC no início do século XX deram grande impulso às coleções e à taxonomia, proporcionando a descrição de inúmeros gêneros e espécies novos realizadas por renomados cientistas da época, como Adolpho Lutz, Costa Lima e Lauro Travassos (Costa *et al.*, 2008). A grande quantidade de espécimes-tipo depositados nas coleções do IOC é de extrema relevância taxonômica. Tais exemplares são referência para as espécies descritas e fundamentais para inúmeros estudos em diferentes áreas da biologia. Neste trabalho são analisados diferentes aspectos relacionados às descrições de novos táxons por pesquisadores do IOC no período de 2006 a 2015, como filas estudadas, países de ocorrência das espécies, coleções de depósito dos holótipos, revistas com maior número de publicações e seus respectivos Fatores de Impacto, referências bibliográficas mais citadas, colaborações existentes, entre outros. Nesta análise busca-se traçar um perfil dos estudos taxonômicos realizados na instituição e da sua importância para o conhecimento da biodiversidade no Brasil.



**Figura 1.** Síntipos de *Anopheles lutzii* Cruz, 1901 (Insecta: Diptera: Culicidae) depositados na Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz. Esta foi a primeira espécie nova descrita por um pesquisador da instituição, o próprio Dr. Oswaldo Cruz, originando também o primeiro depósito de espécimes-tipo em suas coleções biológicas. Foto: Rodrigo Méxas (IOC, 2011).

## Material e Métodos

Foram identificados novos táxons descritos por pesquisadores do IOC no período de dez anos (2006 a 2015), a partir de uma revisão bibliográfica empregando-se buscas nas bases de dados de produtividade institucional do IOC (Coleta – Sistema Integrado de Coleta de Dados) e do *Web of Science*. Nesta base, as palavras-chave utilizadas foram “Oswaldo Cruz”, e “*new species*”, nos campos “Tópico” e “Título”. A busca identificou 493 registros na opção “Tópico” e 107 registros na opção “Título”. Os artigos foram analisados utilizando-se o programa computacional *Vantage Point 9.0*.

Todos os 107 artigos identificados foram criteriosamente lidos e os dados considerados relevantes foram registrados, como grupos taxonômicos (filos e ordens) aos quais os táxons descritos pertencem, coleções de depósito dos holótipos, hospedeiros (quando existentes), métodos utilizados na descrição dos táxons e distribuição geográfica. Foi realizado um levantamento dos Fatores de Impacto (FI) das revistas nas quais os artigos foram publicados, empregando-se a base de dados *ISI Web of Knowledge*, considerando-se o período 2006-2015. Quadros informativos e gráficos foram gerados com o emprego dos programas computacionais *Microsoft Excel 2010* e *Vantage Point 9.0*.

## Resultados e Discussão

### Novos táxons

Foram identificadas 107 publicações com autores do IOC envolvendo descrições de novos táxons no período analisado (2006-2015). Ao todo foram descritos 175 táxons, sendo 12 novos gêneros e 163 novas espécies (Figura 2). Foram descritas quatro espécies de insetos fósseis da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), grupo que possui atualmente vetores das leishmanioses, a partir de material encontrado em âmbar na República Dominicana. São elas: *Micropygomyia dorafeliciangeliae* Andrade Filho, Galati & Peçanha Brazil, 2009; *Pintomyia dominicana* Andrade Filho, Galati & Peçanha Brazil, 2009; *Pintomyia paleotownsendi* Andrade Filho, Falcão, Galati & Peçanha Brazil, 2006; e *Pintomyia paleotrichia* Andrade Filho, Peçanha Brazil, Falcão & Galati, 2007. Com relação aos 12 gêneros descritos, seis pertencem ao filo Arthropoda, quatro ao filo Platyhelminthes e dois ao filo Nematoda.

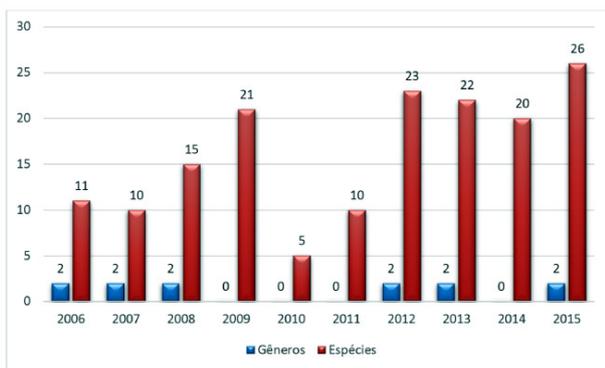
As 163 espécies descritas pertencem aos seguintes filas (Figura 3): Arthropoda (110), Platyhelminthes (30), Nematoda (15), Chordata (6), Acanthocephala (1) e Proteobacteria (1), sendo este o único microrganismo descrito. Os 12 gêneros novos pertencem aos seguintes filas (Figura 3): Arthropoda

(6), Platyhelminthes (4) e Nematoda (2).

### Hospedeiros

Das 163 espécies descritas, 58 foram coletadas em hospedeiros, sendo estes também identificados (Tabela 1). O filo Platyhelminthes foi o que apresentou o maior número de registros, com 30 espécies sendo encontradas em peixes e apenas uma em réptil. Já o filo Nematoda apresentou dez registros em mamíferos, quatro em peixes, um em réptil e um em anfíbio. Arthropoda teve um registro em mamífero e oito em aves. Acanthocephala teve apenas um registro em mamífero e Proteobacteria um registro em muco de cnidário. A predominância de registros de hospedeiros para peixes se deve ao fato do IOC ter um grupo de pesquisa voltado para o estudo de helmintos parasitos de peixes.

A identificação da espécie do hospedeiro é importante como informação biológica. Em



**Figura 2.** Número de gêneros e espécies descritos por pesquisadores do IOC anualmente, de 2006 a 2015.

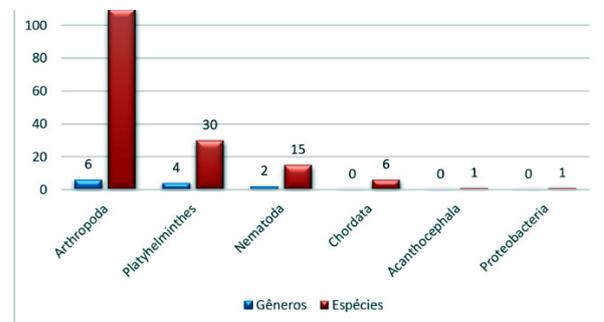
termos de saúde pública, por exemplo, um determinado parasito pode vir a representar uma ameaça se infectar humanos. O conhecimento do seu ciclo de vida, incluindo a presença em hospedeiros, facilita pesquisas e tomadas de decisão quanto às medidas a

serem empregadas na prevenção e combate a doenças causadas pelo parasito.

### Distribuição geográfica

Em relação à distribuição geográfica dos 11 novos gêneros descritos do Brasil, observa-se a seguinte ocorrência por regiões: Norte (4) (Platyhelminthes – 3, Nematoda – 1); Nordeste (1) (Arthropoda); Centro-Oeste (1) (Nematoda); Sudeste (4) (Arthropoda – 3, Platyhelminthes – 1); Sul (1) (Arthropoda). Das 163 espécies novas descritas, 136 foram registradas no território brasileiro, com a seguinte distribuição por regiões: Norte (40) (Arthropoda – 28, Nematoda – 8, Platyhelminthes – 4); Nordeste (16) (Arthropoda – 13, Chordata – 3); Centro-Oeste (13) (Arthropoda – 10, Nematoda – 2, Acanthocephala – 1); Sudeste (49) (Arthropoda – 30, Platyhelminthes – 10, Nematoda – 6, Chordata – 2, Proteobacteria – 1); Sul (18) (Platyhelminthes – 13, Arthropoda – 4, Chordata – 1).

O Sudeste do Brasil se destaca em relação ao número de novos táxons ocorrentes por região, com 30,6% do total descrito, seguido da Região Norte, com 20,9%. Tais valores podem ser explicados pelo estudo da fauna de biomas de alta diversidade biológica ocorrentes nessas regiões, respectivamente a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica. A existência de um grande número de especialistas e de institui-



**Figura 3.** Número de gêneros e espécies descritos por pesquisadores do IOC de 2006 a 2015, organizados por filum.

**Tabela 1.** Número de espécies de parasitos descritos por pesquisadores do IOC no período de 2006 a 2015 e seus respectivos hospedeiros.

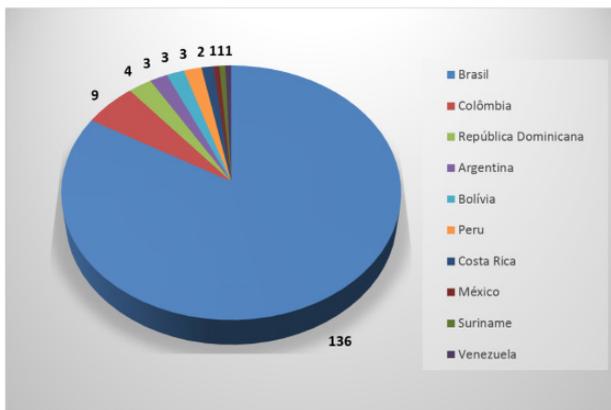
Hospedeiros	Parasitos (organizados por filo)					
	Platyhelminthes	Nematoda	Arthropoda	Acanthocephala	Proteobacteria	Total
Peixes	30	4	0	0	0	<b>34</b>
Mamíferos	0	10	1	1	0	<b>12</b>
Aves	0	0	8	0	0	<b>8</b>
Répteis	1	1	0	0	0	<b>2</b>
Anfíbios	0	1	0	0	0	<b>1</b>
Cnidários	0	0	0	0	1	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>58</b>

ções de pesquisa que historicamente estudam a biodiversidade nessas regiões pode ter também determinado esses resultados.

Um novo gênero e 27 novas espécies foram registrados em outros países da América Latina (Figura 4). Os que apresentaram mais registros de novas espécies foram: Colômbia (9) (Arthropoda); República Dominicana (4) (Arthropoda); Argentina (3) (Arthropoda – 2, Platyhelminthes – 1); Bolívia (3) (Arthropoda); e Peru (3) (Arthropoda – 2, Platyhelminthes – 1).

#### Instituições de depósito dos holótipos

Os 163 holótipos foram depositados em 17



**Figura 4.** Número de espécies descritas por pesquisadores do IOC de 2006 a 2015, organizadas por países da América Latina em que foram registradas.

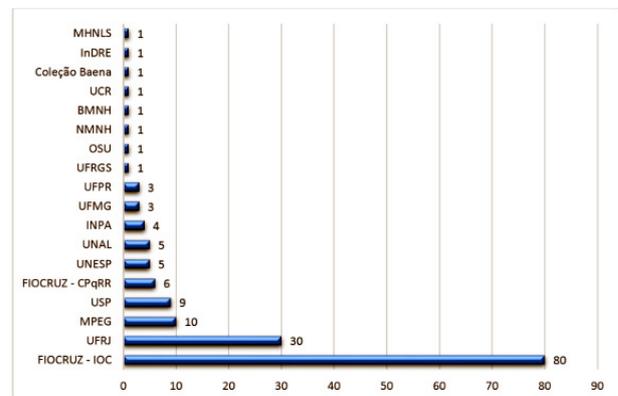
instituições (Figura 5), sendo que a Fundação Oswaldo Cruz recebeu 86 holótipos, pouco mais da metade, quase a totalidade (80) em coleções do Instituto Oswaldo Cruz. Destaca-se também a Universidade Federal do Rio de Janeiro, que recebeu o depósito de 30 holótipos em suas coleções biológicas.

Em relação às espécies novas da fauna brasileira, quase todos os holótipos foram depositados em instituições nacionais, apenas com exceção de um holótipo de Chordata (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution – Washington, DC) e um de Arthropoda (Ohio State University – Columbus). A instituição que recebeu o maior número de depósitos é o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com 70 holótipos (Arthropoda – 25, Platyhelminthes – 27, Nematoda – 14, Chordata – 3, Acanthocephala – 1).

Das 27 espécies descritas que ocorrem em outros países da América Latina, 18 holótipos estão depositados em instituições brasileiras: Fundação Oswaldo Cruz (15) (Instituto Oswaldo Cruz – 10, Centro de Pesquisas René Rachou – 5); Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia (2); Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Zoologia (1). Oito holótipos estão depositados em outros

países da América Latina e dois em coleções da Espanha e da Inglaterra.

É interessante destacar que o material de *Lonchophylla inexpectata*, com holótipo depositado na Ohio State University, foi coletado em 1908. Exemplares de oito espécies foram coletados entre 1940 e 1956, e de 40 espécies foram coletados entre 1961 e 1999. Esses dados demonstram que os exemplares depositados em coleções nem sempre estão identificados corretamente, ou mesmo nunca foram identificados. Sendo assim, é importante investir na formação de taxonomistas para estudo, identificação e descrição da biodiversidade, promovendo a catalogação adequada dos acervos biológicos, patrimônios de inigualável valor científico.



**Figura 5.** Número de holótipos por instituição de depósito, referente às espécies descritas por pesquisadores do IOC de 2006 a 2015. Acrônimos: BMNH – The Natural History Museum (Londres); FIOCRUZ-CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte); FIOCRUZ-IOC – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro); InDRE – Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (Cidade do México); INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Manaus); MHNLS – Museo de Historia Natural La Salle, Fundación La Salle de Ciencias Naturales (Caracas); MPEG – Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém); NMNH – National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (Washington, DC); OSU – Ohio State University (Columbus); UCR – Universidad de Costa Rica (San José); UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte); UFPR – Universidade Federal do Paraná (Curitiba); UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre); UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro; UNAL – Universidad Nacional de Colombia (Bogotá); UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (São José do Rio Preto); USP – Universidade de São Paulo (São Paulo).

#### Métodos e técnicas empregadas

Foram contabilizados os diferentes métodos e técnicas empregados no estudo dos novos táxons (Figura 6). As técnicas tradicionais são ainda as mais utilizadas: desenhos em nanquim ou grafite com auxílio de câmara clara (por ser de baixo custo, além de propiciar bons resultados em relação à percepção da morfologia das estruturas) e microscopia óptica ou estereoscópica. O uso de microscopia confocal de varredura a laser está relacionado ao tamanho muito pequeno dos exemplares de determinados grupos taxonômicos. Métodos ainda pouco utilizados no universo de publicações considerado foram: análises moleculares em geral, código de barras de DNA (COI *barcode*), morfometria geométrica e análise filogenética.

#### Periódicos

Foi realizado o levantamento das revistas nas quais os novos táxons foram publicados, totalizando 30 diferentes periódicos, sendo oito nacionais e 22 internacionais:

América (16 revistas): Brasil (8) - Anais da Academia Brasileira de Ciências; Biota Neotropica; Iheringia, Série Zoologia; Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; Neotropical Entomology; Neotropical Ichthyology; Revista Brasileira de Entomologia; Zoologia. Estados Unidos da América (7) - American Museum Novitates; Comparative Parasitology; Journal of Arachnology; Journal of Insect Science; Journal of Mammalogy; Journal of Medical Entomology; Journal of Parasitology. México (1) - Revista Mexicana de Biodiversidad.

Europa (13 revistas): Alemanha (1) - Parasitology Research. Bulgária (1) - ZooKeys. Eslováquia

(1) - Helminthologia. França (1) - Parasite. Holanda (3) - Acta Tropica; Systematic Parasitology; Veterinary Parasitology. República Tcheca (2) - Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae; Folia Parasitologica. Reino Unido (4) - International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; Journal of Natural History; Parasites & Vectors; Studies on Neotropical Fauna and Environment.

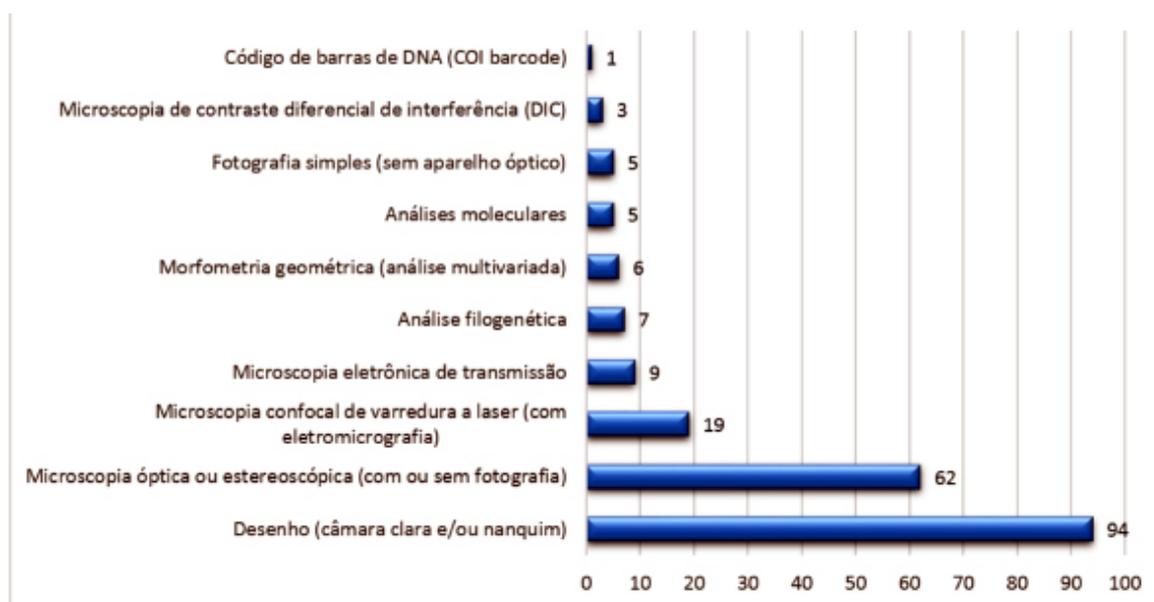
Oceania (1): Nova Zelândia (1) - Zootaxa.

As cinco revistas com o maior número de artigos publicados pelo IOC de 2006 a 2015 foram (Figura 7): Zootaxa (39), Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (18), The Journal of Parasitology (8), Comparative Parasitology (5) e Revista Mexicana de Biodiversidad (3). Juntas, essas revistas respondem por 73 das 107 publicações contabilizadas (68%). A revista Zootaxa apresentou publicações em todos os anos avaliados e a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz apenas não publicou em 2014 e 2015.

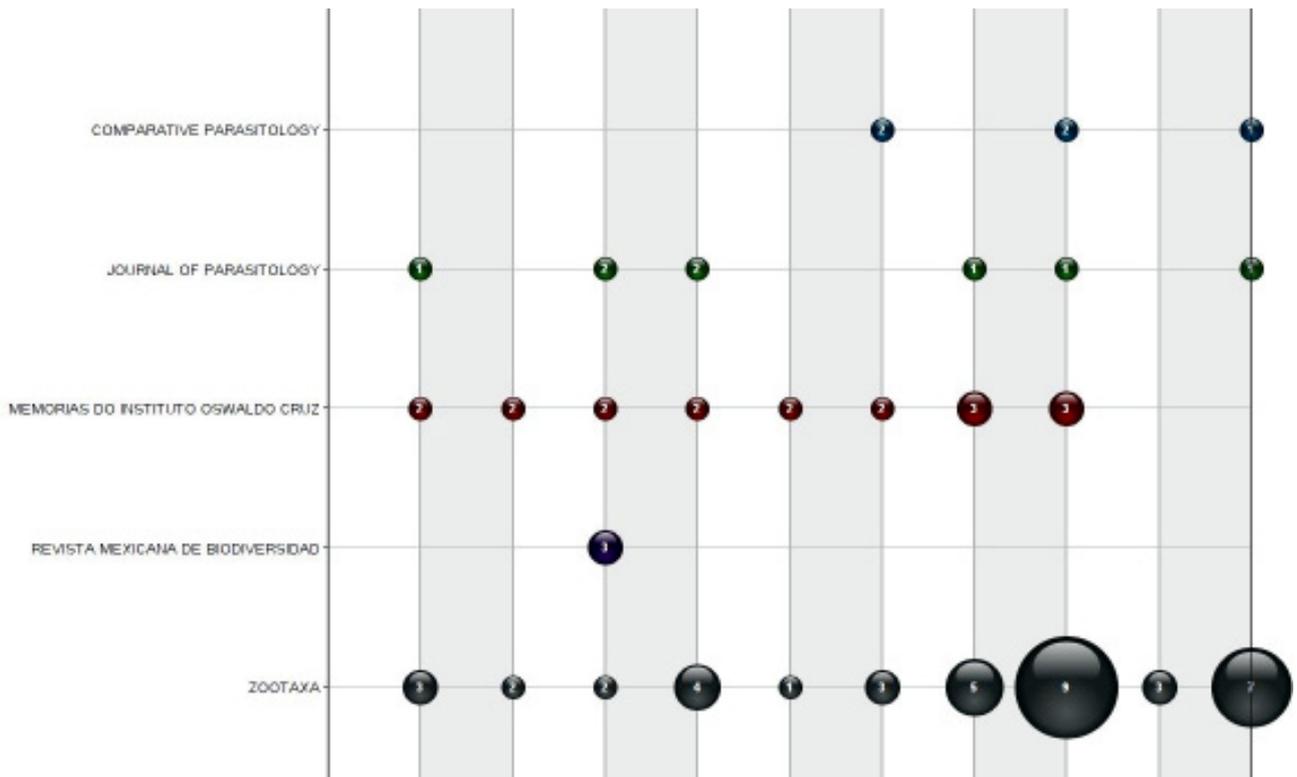
Foi realizado também o levantamento da média dos Fatores de Impacto (FI) das revistas no *Journal Citation Reports* do *ISI Web of Knowledge* (2016), compreendendo o período 2011-2015. Os cinco artigos científicos mais citados nesse período foram:

1º) Costa J, Felix M. 2008. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(1): 87-90 (46 citações – FI 1,723).

2º) Percequillo AR, Hingst-Zaher E, Bonvicino CR. 2008. Systematic review of genus *Cerradomys* Weksler, Percequillo and Voss, 2006 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini) with



**Figura 6.** Técnicas e métodos utilizados no estudo de novos táxons por pesquisadores do IOC no período de 2006 a 2015, contabilizados por artigo publicado.



**Figura 7.** As cinco revistas científicas que mais publicaram artigos com novos táxons descritos por pesquisadores do IOC, no período de 2006 a 2015.

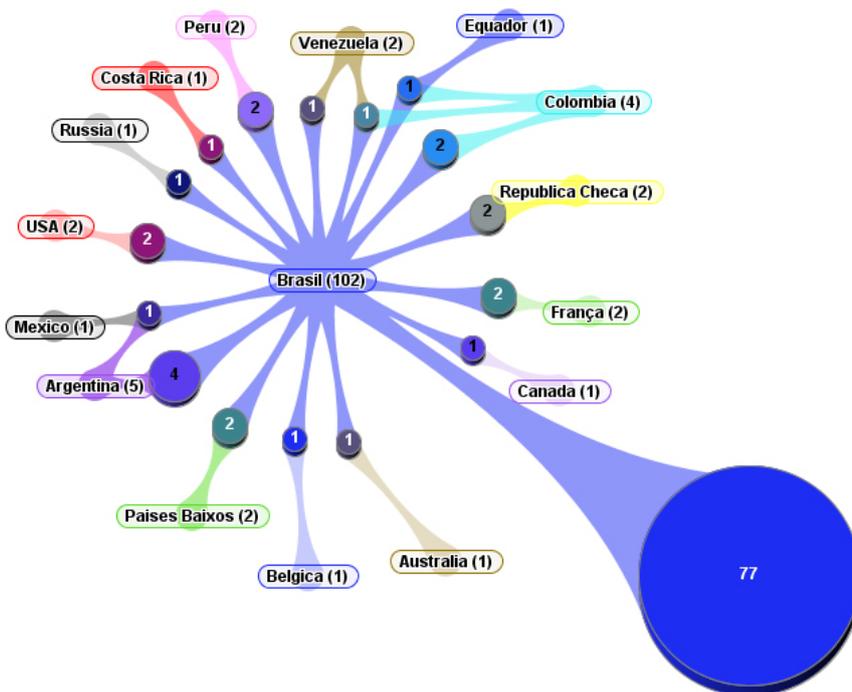
description of two new species from Eastern Brazil. American Museum Novitates 3622: 1-46 (30 citações – FI 1,252).

3º) Galvão C, Angulo VM. 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. Zootaxa 1241: 61-68 (29 citações – FI 0,910).

4º) Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Gal-

vão C. 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 1443: 55-64 (27 citações – FI 0,910).

5º) Knoff M, Felizardo NN, Iñiguez AM, Maldonado Jr. A, Torres E JL, Magalhães Pinto R, Gomes DC. 2012. Genetic and morphological characterisation of a new species of the genus *Hystero-*



**Figura 8.** Correlação entre países no estudo de novos táxons descritos por pesquisadores do IOC (2006-2015) (ADUNA – Vantage Point).

*thylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the neotropical region, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(2): 186-193 (24 citações – FI 1,723).

Dentre as revistas que publicaram artigos de pesquisadores do IOC, as cinco com maior média de FI no período 2011-2015 (últimos cinco anos avaliados) foram: *Parasites & Vectors* (3,413), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2,782), *Acta Tropica* (2,682), *Veterinary Parasitology* (2,479) e *Journal of Mammalogy* (2,304).

### Colaborações

Dos 107 artigos publicados com descrições de novos táxons por pesquisadores do IOC no período analisado, 25 possuem colaboração internacional, compreendendo ao todo 15 países diferentes (Figura 8). Os artigos tiveram a participação de 196 pesquisadores, sendo 34% pertencentes ao IOC. As parcerias com as dez instituições que mais colaboraram nos estudos de novos táxons realizados pelo IOC (2006-2015) são apresentadas na Figura 9, o que contabiliza um total de 60 artigos. A Universidade Federal do Rio de Janeiro é a instituição que mais colaborou com o IOC no período estudado.

### Conclusão

Levando-se em consideração o histórico das pesquisas no IOC, com foco em organismos de importância médica, é natural que os filos mais representados neste estudo sejam Arthropoda, Platyhelminthes e Nematoda. Fica evidente também que a pesquisa em taxonomia, desenvolvida na instituição desde o seu início, continua em franca atividade, sendo descritos, em média, 16 novos táxons por ano, considerando-se a década compreendida no período de 2006 a 2015. Neste último ano, foi registrado o maior número de descrições publicadas, sendo 26 novas espécies e dois novos gêneros.

Cabe destacar a formação de taxonomistas realizada em laboratórios do IOC, ponto fundamental para a continuidade dos estudos em biodiversidade e atendimento às demandas oriundas da Convenção sobre Diversidade Biológica. Destaca-se o incremento das coleções biológicas do Instituto Oswaldo Cruz, com o depósito de 80 holótipos, o que evidencia a relevância científica desses acervos e o conceituado papel da instituição na pesquisa em biodiversidade.

A classificação de artigos científicos através do Fator de Impacto das revistas nas quais eles são publicados não necessariamente reflete a relevância das pesquisas em taxonomia. Apesar das políticas

internacionais estimularem a descrição da biodiversidade, os periódicos voltados para este escopo geralmente possuem FI baixo, o que é contraditório e desfavorece o fomento para esta temática, tornando-a, inclusive, menos prestigiada em comparação com outras áreas no meio científico.

### Referências

- Costa J, Cerri D, Sá MR, Lamas CJE. 2008. Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz: resgate de acervo científico-histórico disperso pelo Massacre de Manguinhos. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 15(2): 401-410.
- Cruz OG. 1901. Contribuição para o estudo dos culicídeos do Rio de Janeiro. *Brazil-Medico* 15(43): 423-426.
- Ministério do Meio Ambiente. 2015. Biodiversidade brasileira. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> >. Acesso em 05 de novembro de 2016.
- Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica> >. Acesso em 09 de novembro de 2015.
- ONU, 1992. Convenção sobre a diversidade biológica. Organização das Nações Unidas. Rio de Janeiro, Brasil.

# Biologia Molecular da Doença de Alzheimer

## Molecular Biology of Alzheimer's Disease

José de Anchieta de Oliveira Filho\* <sup>1</sup>, José Rodrigo Nascimento Martins\* <sup>2</sup>

\*Graduando do bacharelado de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

Contato: <sup>1</sup>anchieta-13@hotmail.com; <sup>2</sup>martins.jrn@gmail.com

**Resumo.** A doença de Alzheimer é caracterizada por uma intensa neurodegeneração em áreas cerebrais responsáveis pela memória e cognição, principalmente o hipocampo. Em 2015 afetou mais de 46.8 milhões de pessoas em todo o mundo, estima-se que até 2050 esse número triplique. As principais modificações moleculares observadas são a hiperfosforilação da proteína tau e disfunção no transporte axonal, além do acúmulo do peptídeo beta-amiloide, alteração crucial para o desenvolvimento da patologia. Essa última resulta em diversos eventos patológicos, como: ativação dos receptores NMDA; alteração funcional nos receptores de insulina; antagonismo com os receptores do fator de crescimento nervoso e Frizzled; e lesão mitocondrial. Neste artigo são abordadas as principais alterações moleculares envolvidas na DA enfatizando alvos terapêuticos para tratamento dessa patologia.

**Palavras-chave.** Biologia do Alzheimer; Sinalização do Alzheimer; GSK-3 $\beta$ .

**Abstract.** The Alzheimer's disease is characterized by an intense neurodegeneration in cerebral areas responsible for memory and cognition, mainly the hippocampus. In 2015 the AD affected more than 46.8 million people worldwide, it is estimated that by 2050 this number will triple. The main modifications observed in AD are a result of several molecular changes, such as tau protein hyperphosphorylation and axonal transport dysfunction, along with the accumulation of amyloid-beta peptide, a critical change in the pathology's development. This last one results in several pathological events, like: activation of NMDA receptors; functional alteration of insulin receptors; antagonism with nerve growth factor and Frizzled receptors; and mitochondrial damage. In this article the main molecular changes involved in AD are discussed in detail, emphasizing therapeutic targets for treatment of this pathology.

**Keywords.** Alzheimer's Biology; Alzheimer's signaling; GSK- 3 $\beta$ .

Recebido: 09dez16  
Publicado: 02nov18

Editado por Karen  
S. Toledo e revisado  
por Anônimo.

### Introdução

A doença de Alzheimer (DA), primordialmente descrita em 1906 na paciente Auguste Deter pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer, é a patologia neurodegenerativa mais frequente associada à idade, frequentemente relacionada com manifestações associadas a uma deficiência progressiva, principalmente na memória e nas capacidades cognitivas. Segundo dados do World Alzheimer's Report de 2015, a DA afetou 9.4 milhões de pessoas nas Américas e 46.8 milhões em todo o mundo. Estima-se que em 2050 em todo o mundo 131.5 milhões de pessoas serão acometidas pela DA, sendo 68% em países de média e baixa renda.

As causas para o desenvolvimento da DA são

bastante complexas, envolvendo fatores genéticos, moleculares e fatores externos. Por motivos não completamente elucidados, esta patologia ocorre através de um processo de intensa neurodegeneração que se inicia em áreas cerebrais fundamentais, principalmente para a memória, como o hipocampo e córtex frontal. Após anos, a morte neural se estende para praticamente todas as regiões do cérebro, afetando o indivíduo a ponto de desenvolver distúrbios de linguagem, apraxia, dificuldade em tomada de decisões, quadro clínico observado em fase terminal da doença.

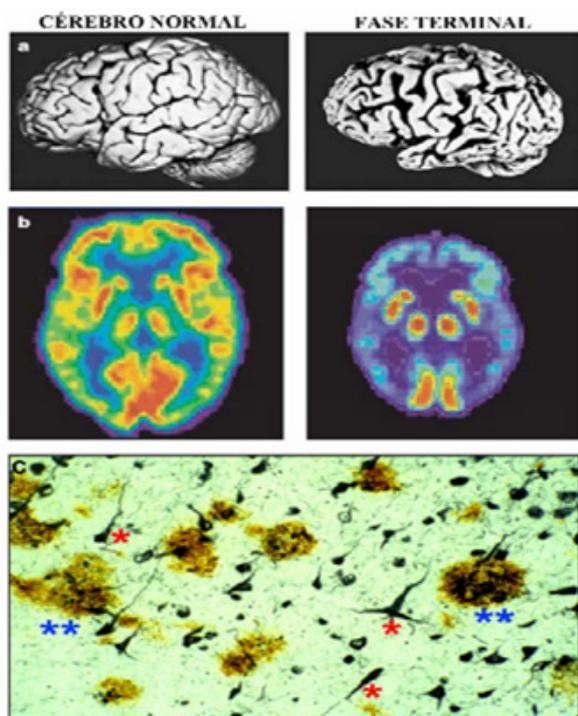
Diante da alta ocorrência de casos de DA, em escala mundial, o estudo da biologia molecular desta patologia é de grande importância para desenvolvimento de métodos diagnósticos ainda no seu esta-

do inicial e principalmente à formulação de terapias, curativas ou paliativas que ainda são escassas e ineficientes. Este artigo tem objetivo de fazer revisão literária das principais causas, em nível molecular, da DA.

#### Patologia da DA

A DA é uma doença neurodegenerativa, na qual é observada principalmente atrofia do hipocampo, responsável pelo quadro clínico de perda progressiva da formação e invocação de memórias. No seu estágio terminal pode acometer também áreas do córtex cerebral, afetando assim outras funções, como a capacidade de realizar movimentos precisos, escolher palavras, além da sensibilidade dos sentidos. Mesmo com essa diferença morfológica não se pode diagnosticar com precisão a DA, pois o indivíduo saudável pode apresentar modificações morfológicas semelhantes, porém provenientes de outras causas distintas da DA (Nelson et al., 2007).

Macroscopicamente se observa a hipotrofia generalizada do cérebro através da diminuição dos



**Figura 1.** Alterações anatômicas e histopatológicas da doença de Alzheimer. A- Comparação entre um cérebro saudável ou não acometido pela DA (à esquerda) e um cérebro acometido pela DA (à direita). B- Imagens de PET Scan, demonstrando a captação de glicose no cérebro de uma pessoa saudável (à esquerda) e um cérebro acometido pela DA (à direita), (cores vermelha e amarela revelam altos níveis de captação de glicose). C- Cortes histopatológicos post-mortem (coloração por prata) de cérebro de paciente com DA demonstrando emaranhados neurofibrilares (\* cor vermelha) e placas amiloides (\*\* cor azul) circundadas por neuritos distróficos. Adaptado de Mattson (2004). Fonte: Decker, 2010.

sulcos (Figura 1-a), ao passo que microscopicamente observam-se algumas modificações histopatológicas que são associadas à patologia em questão, como depósitos de proteínas (Figura 1-c). Além disso, através de testes, como o PET scan (Hanyu et al., 2005), é possível visualizar grande diminuição na captação da glicose no cérebro, refletindo assim sua atividade, sendo possível visualizar o declínio da mesma causado pela neurodegeneração (Figura 1-b) (Viola e Klein, 2015).

Alois Alzheimer, pioneiro nos estudos, notou a presença de inclusões fibrosas dentro do citoplasma de neurônios piramidais. Estas inclusões fibrosas são denominadas de emaranhados neurofibrilares (ENFs) e até hoje são considerados uma lesão microscópica crucial para diagnosticar a patologia (Alzheimer, 1907). Essas lesões microscópicas são compostas principalmente pela Proteína Associada à Microtúbulos (MAPTAU), ou de forma simplificada, proteína TAU. Elas são responsáveis por manter a estabilidade e flexibilidade dos microtúbulos, principalmente nos axônios, assim, garantindo o transporte de vesículas por longas distâncias (Monteiro e Kandratavicius, 2011).

Outra alteração histopatológica observada em neurônios de pacientes com DA são as placas senis (ou neuríticas), também consideradas cruciais para diagnosticar a patologia (Nelson et al., 2007). As placas senis são originadas pelo acúmulo de um peptídeo com 36-43 aminoácidos, denominado de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), um subproduto originado das vias de clivagens da Proteína Precursora de Amiloide (APP, do inglês Amyloid Precursor Protein), essa via é conhecida como via amiloidogênica (Gra Menendez et al., 2002).

Em 1999 Eva Braak e Heiko Braak propuseram uma sequência de progressão da doença baseada em análises minuciosas post-mortem, de regiões cerebrais de 83 pacientes de idade avançada. Este estadiamento separa a progressão da doença em seis estágios, de acordo com o grau das lesões proporcionados, principalmente pelos emaranhados neurofibrilares nas diferentes regiões do cérebro. Apesar de o estadiamento ter sido feito sem associação com dados clínicos, além de nem todos os portadores de DA evoluírem conforme o descrito, se faz útil para a avaliação do estágio de desenvolvimento da doença (Braak e Braak, 1987; Schultz et al., 1999).

Nos estágios 1 e 2 há início de lesões no córtex entorrinal e no hipocampo, em dados clínicos podem aparecer os primeiros sintomas clínicos, como pequena redução da memória, sem redução das capacidades normais. Nos estágios 3 e 4, há o envolvimento do lobo límbico e do neocórtex e evidências clínicas como redução da memória de longo prazo e outros processos cognitivos, há também pequena dificuldade em reconhecer pessoas. Por fim, nos estágios 5 e 6,

há completo envolvimento do neocórtex, e perda total da sequência lógica da fala, déficit motor, alteração do ciclo de sono/vigília, irritabilidade e agitação, levando a dependência total de um cuidador que reflete a perda da capacidade de tarefas rotineiras (Braak e Braak, 1987; Schultz et al., 1999).

#### *Peptídeo $\beta$ -amiloide*

O peptídeo A $\beta$  é produzido da clivagem proteolítica da APP, uma glicoproteína transmembranar amplamente produzida por todos os tipos celulares, uma das mais abundantes do sistema nervoso central (SNC). A APP é uma proteína integral de membrana tipo I, no qual tem um grande domínio extracelular, uma porção hidrofóbica transmembrana e um pequeno domínio C-terminal voltado para meio intracelular, denominado domínio intracelular da APP. Estudos genéticos apontam que a sequência genética da APP está localizada no cromossomo 21 e contém 18 éxons. Sabe-se que oito isoformas da APP são geradas por splicing, alcança um tamanho de 695 a 770 aminoácidos. A APP mais expressa no cérebro é constituída de 695 aminoácidos (APP695) e é produzida principalmente pelos neurônios (Meneghetti, 2014).

Funcionalmente, as isoformas da APP podem ser classificadas pela presença ou ausência de um domínio inibidor de serino protease tipo Kunitz (KPI) quando apresentam ou não o éxon 7, respectivamente. Ademais, evidências demonstram o aumento da expressão das APP-KPI em indivíduos com DA, bem como sua relação com o aumento da produção do A $\beta$  (Preece et al., 2004; Bordji et al., 2010).

A APP sofre processamento por diversas enzimas diferentes, secretases e proteases, podendo seguir dois caminhos: o processamento amiloidogênico e não-amiloidogênico. No processamento não-amiloidogênico, a APP é sequencialmente clivada pela  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. A  $\alpha$ -secretase faz a clivagem do APP no meio da sequência de aminoácidos liberando um grande domínio solúvel nomeado de sAPP $\alpha$  e um fragmento associado a membrana contendo 83 aminoácidos (CTF83). O fragmento CTF83 é clivado pela  $\gamma$ -secretase para liberar peptídeo P3 e o domínio APP intracelular (AICD, do inglês APP intracelular domain), sendo ambos degradados rapidamente. Alternativamente, a geração do peptídeo A $\beta$  acontece no processamento amiloidogênico através da clivagem da APP pela enzima  $\beta$ -secretase (BACE1, ou  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1), formando um domínio extracelular denominado de forma secretada da APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) e um fragmento C-terminal associado a membrana contendo 99 aminoácidos (CTF99), que contém a sequência do A $\beta$  e o AICD. Logo em seguida, a enzima  $\gamma$ -secretase cliva o fragmento CTF99 entre os amino-

ácidos 38 e 43 liberando o A $\beta$  no meio extracelular (Meneghetti, 2014).

Os A $\beta$  que são produzidos a partir do processamento da APP variam no tamanho, sendo a maior produção de uma sequência contendo 40 aminoácidos, denominada de A $\beta$ 1-40, seguida da produção do peptídeo com 42 aminoácidos na sua estrutura apresentando uma formação equivalente a 10% do total sintetizado. A forma monomérica da A $\beta$  parece não exercer toxicidade alta. Porém, pode ocorrer o agrupamento das formas monoméricas formando intermediários solúveis denominados de oligômeros, protofibrilas e fibrilas. Estes apresentam uma atividade bloqueadora da potenciação de longa duração (LTP), processo relacionado à aprendizagem e plasticidade neural (Larson e Lesné, 2011). Na ocorrência de um distúrbio na produção e degradação da A $\beta$ , provocando um acúmulo significativo, este excesso pode ser um fator inicial da DA, desencadeando uma série de eventos celulares e moleculares que culminam na disfunção sináptica e, por fim, na neurodegeneração. Serão abordadas nesta revisão as principais alterações moleculares da DA, principalmente relacionadas ao peptídeo A $\beta$ .

#### *Proteína tau*

A tau pertence à classe de proteínas associadas aos microtúbulos (MAP, do inglês Microtubule associated protein) que em condições normais, não patológicas, regulam a estabilidade, a dinâmica e a organização espacial dos microtúbulos (MTs). A tau é altamente expressa no cérebro, acredita-se que devido ao seu papel no transporte axonal de organelas e vesículas, que podem conter neurotransmissores. Em situações patológicas, no caso da DA e outras doenças conhecidas como taupatias, a proteína tau torna-se altamente fosforilada, perdendo sua estabilidade e função fisiológica. A tau quando se encontra fosforilada desprende-se do MT, acarretando na desestabilização e redução na dinâmica do mesmo. A proteína tau em condições normais encontra-se nos axônios, mas na DA acumula-se, principalmente, no corpo celular e dendritos de neurônios, este acúmulo forma filamentos helicoidais pareados (PHF- do inglês Paired helical filaments) que acarretam na formação de oligômeros da tau, os ENFs (Meneghetti, 2014).

A atividade da proteína tau é regulada, após a transição, por mecanismos de fosforilação e desfosforilação. Na DA, a hiperfosforilação resulta de um aumento na atividade de quinases, na diminuição da atividade das fosfatases, ou ainda por ambos os mecanismos citados. Esse processo parece ser desencadeado pelo acúmulo de A $\beta$ , aumentando a formação de agregados na região dos dendritos dos neurônios (Brion et al., 1993; Maas et al., 2000). A proteína tau possui mais de 30 sítios de fosforilação, dos quais mui-

tos são formados por resíduos de serina ou treonina seguido de uma prolina, assim, sendo fosforilados por proteínas quinases dependentes de prolina (PK). Várias outras proteínas quinases (PK) podem fosforilar a proteína tau, dentre estas destaca-se a glicogênio sintase quinase 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), que é considerada a principal quinase com função de manter a estabilidade da proteína tau. Dentre as fosfatases, a proteína fosfatase 2A (PP-2A) é descrita como a principal fosfatase com atividade sobre a tau. (Gong et al., 2006). Outras quinases como a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase dependente de ciclina 5 (cdk5), as proteínas quinase ativadas por estresse (SAPKs), estão ligadas a apoptose celular (Meneghetti, 2014). Todas estas proteínas estão ligadas à perda da atividade da tau.

#### *Sinalização celular e ações do A $\beta$*

O entendimento do caminho, sinalização, do A $\beta$  nos neurônios é de extrema importância para o entendimento da DA e estudos de terapias curativas ou paliativas. Na literatura vários mecanismos são descritos que convergem nas evidências encontradas na patologia da DA. Mesmo com tantos estudos moleculares publicados ainda é difícil estabelecer com clareza todos os mecanismos envolvidos na doença.

Os peptídeos A $\beta$  são capazes de ativar diversos receptores presentes nos neurônios, alguns já descritos na literatura. Destacam-se os receptores de glutamato NMDA (Decker et al., 2010). Além deles vários outros receptores são apontados como capazes de ligarem-se às formas de A $\beta$ , são alguns: o receptor do fator de crescimento nervoso (NGF, do inglês Nerve growth factor), a proteína celular príon (PrPc, do inglês Cellular prion protein), os receptores Frizzled, contribuindo para as alterações fisiológicas que levam a morte celular, além dos receptores de insulina (Meneghetti, 2014).

Estudos realizados por Ittner Lars (2010) demonstram a relação direta entre A $\beta$  e a hiperfosforilação da proteína tau levando a toxicidade e acarretando diversas respostas intracelulares. A relação citada se dá pela convergência de várias vias de sinalização que levam principalmente ao aumento do cálcio (Ca $^{2+}$ ) intracelular por uma afinidade do A $\beta$  pelo canal para Ca $^{2+}$  NMDA, o qual é ativado por glutamato, aspartato e seu agonista exógeno NMDA. Outras formas que o A $\beta$  permite o influxo de cálcio é a ativação indireta do NMDA pelo PrPc e/ou rompimento direto da membrana plasmática (Zempel et al., 2010).

#### *Efeitos do A $\beta$ sobre a concentração do Ca $^{2+}$ intracelular*

O aumento do Ca $^{2+}$  intracelular tem uma vasta ação na célula, pois o mesmo atua como segundo mensageiro intracelular mediando vários processos,

além de, quando em excesso, estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas para a célula. Um destes processos é a formação do complexo CaMKI que quando formado ativa MERK2, via neural que contribui para a diferenciação neural (Zempel et al., 2010). O complexo CaMKI excessivamente ativado pelo complexo Ca $^{2+}$ /calmodulina contribui para a patologia, através do aumento de Ca $^{2+}$  intracelular. De acordo com o papel fundamental na secreção de neurotransmissores exercido pela CaMKI, alterações causadas pelo acúmulo de Ca $^{2+}$  ocasionam falhas na LTP, relacionada com a memória e aprendizado (Fukunaga et al., 1993; Hinds et al., 1998). O Ca $^{2+}$  pode ativar diferentes proteínas quinases (PK) que promovem a hiperfosforilação da proteína tau (Zempel et al., 2010).

#### *Interação entre o A $\beta$ e as proteínas mitocondriais*

A mitocôndria é uma estrutura fundamental para o funcionamento celular. A alteração nesta organela pode gerar uma disfunção mitocondrial que é uma das prováveis causas da neurodegeneração, já que é responsável pela produção energética, metabólica e regulação de segundos mensageiros como ROS e Ca $^{2+}$ , e deste modo promove a morte celular por apoptose. Alguns estudos demonstram que o peptídeo A $\beta$  é responsável por alterações mitocondriais (Santos et al., 2010).

Foi relatado por Santos e colaboradores (2010) uma interação antagonista do peptídeo A $\beta$  com a translocase de membrana externa 40 (TOM 40) e a translocase do interior da membrana 23 (TIM 23) da mitocôndria. O peptídeo A $\beta$  quando presente na mitocôndria pode ter um efeito inibitório sobre o complexo mitocondrial IV (C IV), responsável pela redução do estresse oxidativo da mitocôndria e produção de oxidases alternativas responsáveis por produção de ROS e resposta a infecção. Além destas alterações pode-se verificar a diminuição de algumas enzimas do ciclo do ácido tricarbóxico (Santos et al., 2010). Estes eventos somados causam a disfunção mitocondrial, levando a apoptose.

#### *Modulação de receptores pelo A $\beta$*

Os receptores de NGF são responsáveis pela proliferação e morte das células. No caso da DA, estudos demonstram uma relação do peptídeo A $\beta$  com a morte celular, responsável pelo receptor p75NTR. É sugerido que o peptídeo A $\beta$  interage com receptor p75NTR e TrkA, responsável pela via de proliferação neuronal. É sugerido que a interação com TrkA seja antagonista, pois o mesmo ativa a enzima quinase de atividade kit (Akt) responsável pela regulação da apoptose (inibição da caspase 9, pró-apoptótica), crescimento celular e modulação negativa da GSK-3 $\beta$ ,

ou seja, em seu estado inativo aumenta a atividade da GSK-3 $\beta$  levando à hiperfosforilação da tau, além de desregular a caspase 9 levando à morte celular (Sakono e Zako, 2010).

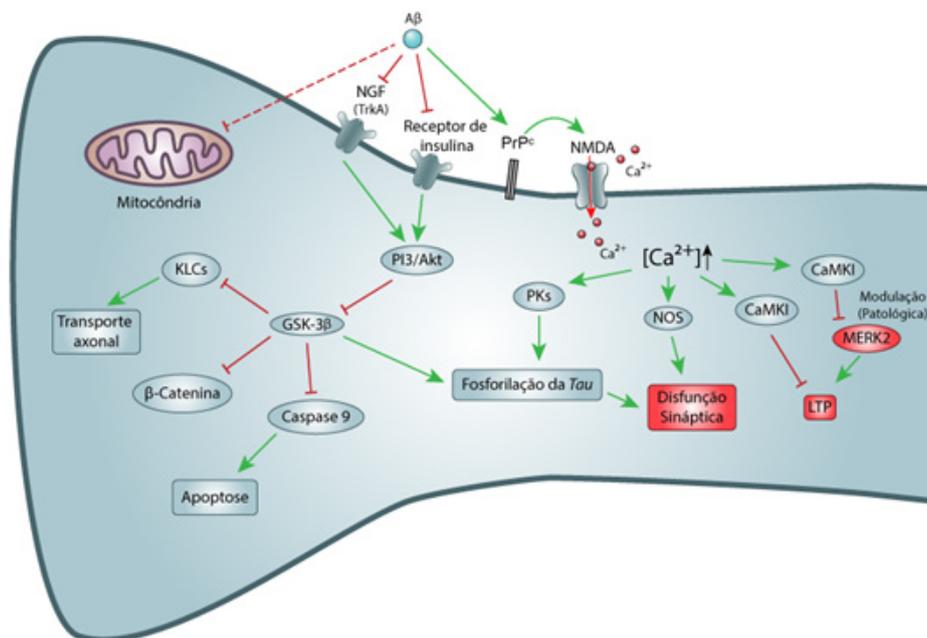
Os receptores de insulina são fundamentais para o funcionamento celular, pois os mesmos são responsáveis por diversas funções que regulam o crescimento e manutenção celular. Em estudos realizados por Felice e colaboradores (2009) foi observada a degradação de receptores de insulina na presença do A $\beta$  e seguida de degeneração dos dendritos dos neurônios, acarretando na morte celular e perda de sinapse, observada na DA. É sugerido que o A $\beta$  seja responsável pela inibição destes receptores inativando todas as vias de sinalização intracelular, inclusive a ativação da Akt que modula negativamente a GSK-3 $\beta$ , além de promover a degradação dos receptores acarretando em disfunção na homeostase de nutrientes como a glicose (Felice et al., 2009; Zhao et al., 2007).

A família de receptores Frizzled é caracterizada por receptores acoplados a proteína G (GPCR) que desencadeiam três vias de sinalização. Com foco na DA, sua principal ação está associada à inibição destas vias ocasionada pela ligação do A $\beta$  nestes receptores. A relação principal entre estas vias e a patologia em questão é relacionada à via Wnt/ $\beta$ -catenina, pois a

mesma, quando ativada, inibe a atividade da GSK-3 $\beta$  que libera a  $\beta$ -catenina ativadora da família de fatores promotores de células T/linfócitos importantes para a sobrevivência e homeostase neural. Esta via bloqueada pelo A $\beta$  aumenta a atividade GSK-3 $\beta$  resultando na degradação da  $\beta$ -catenina, além de hiperfosforilação da proteína tau. (Huang e Klein, 2004).

É claramente observada a relação das vias descritas nesta revisão com a estimulação da GSK-3 $\beta$ . Esta, além de relacionada com a fosforilação da proteína tau, de acordo com estudos feitos por Morfini e colaboradores (2002) realizam também a fosforilação das cadeias leves de cinesina (KLCs, do inglês Kinesin Light Chains), responsáveis pelo acoplamento da vesícula, ou organela, no transporte axonal, pelas GSK-3 $\beta$  levando ao desacoplamento das vesículas às proteínas motoras.

É importante ressaltar que nenhum destes mecanismos age de forma isolada na DA. Todas as modificações moleculares observadas em estudos e na literatura convergem para a neurodegeneração ou para a disfunção sináptica. Para ter uma visão mais abrangente sobre as modificações moleculares foi elaborado um esquema que interliga as vias de sinalização e as modificações moleculares relacionadas à DA, ilustrado resumidamente na figura 2.



**Figura 2.** Resumo simplificado das vias de sinalização celular que levam a mudanças moleculares relacionadas com a DA. A seta verde representa ativação ou modulação da atividade, a seta vermelha indica inativação ou modulação negativa. Todas as vias demonstradas têm ligação com a DA. O modelo não é totalmente detalhado, entre as modulações estão envolvidas outras vias intermediárias. Beta-amiloide (A $\beta$ ); cadeias leves de cinesina (KLCs); glicogênio sintase quinase 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ); potenciação de longa duração (LTP); proteína quinase I dependente de calmodulina (CaMKI); proteínas quinases (PKs); receptor do fator de crescimento nervoso (NGF); sintase de óxido nítrico (NOS).

### Considerações Finais

O acúmulo do peptídeo A $\beta$  é relacionado com a DA, os estudos evidenciam sua interação com várias vias de sinalização. Esta interação culmina em várias alterações patológicas as quais acarretam em morte celular além das várias modificações estruturais da célula.

Dentre as principais alterações patológicas de interesse no desenvolvimento de novos fármacos para a DA encontram-se as placas neuríticas e os depósitos de proteína tau, responsáveis em grande parte pelas manifestações patológicas da DA. As placas neuríticas podem vir a ser depuradas, ou terem sua formação mitigada, através de fármacos que atuem principalmente na agregação do A $\beta$ . Outra maneira de realizar tal mitigação pode ser através da diminuição seletiva do A $\beta$ , através da inibição das enzimas proteolíticas atuantes em sua via de formação, como a  $\beta$ -secretase e a  $\gamma$ -secretase, ou através da potenciação da  $\alpha$ -secretase, polarizando a clivagem da APP para a via não-amiloideogênica.

Com base na literatura é possível afirmar que a hiperfosforilação da proteína tau resulta na desestruturação dos microtúbulos causando disfunção no transporte axonal. A relação entre este evento e a GSK-3 $\beta$  é visível, pois as vias de sinalização convergem no aumento da atividade desta proteína. Assim, novos fármacos podem vir a atuar diretamente sobre a deposição ou fosforilação da proteína tau, através da inibição de quinases, especialmente a GSK-3 $\beta$ . Além desses, outra alternativa terapêutica para a DA é a utilização de inibidores do canal NMDA, diminuindo assim a toxicidade mediada pelo aumento no Ca $^{2+}$  intracelular observada nessa patologia, como por exemplo a ativação das quinases.

Por fim, estudos moleculares visam entender o funcionamento molecular na condição patológica da DA. Estas informações em conjunto visam o desenvolvimento de terapias paliativas ou curativas, pois os fármacos visam interagir com as vias de sinalização para evitar a ação patológica e minimizar os efeitos cognitivos deletérios observados na patologia.

### Referências

- Alzheimer A. 1907. Ueber eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 177-179.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. 2010. Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- Production. *Journal of Neuroscience*, 30(47), pp.15927-15942.
- Braak H, Braak E. 1987. Argyrophilic grains: characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. *Neuroscience Letters*, 76(1), 124-127.
- Brion J, Smith C, Couck A, Gallo J, Anderton BH. 1993. Developmental Changes in  $\tau$  Phosphorylation: Fetal  $\tau$  Is Transiently Phosphorylated in a Manner Similar to Paired Helical Filament- $\tau$  Characteristic of Alzheimers Disease. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2071-2080.
- Decker H, Jürgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Ferreira ST. 2010. N-Methyl-d-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers. *Journal of Neurochemistry*, 115(6), 1520-1529.
- Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Klein WL. 2009. Protection of synapses against Alzheimers-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1971-1976.
- Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D. 1993. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 7863-7867.
- Gong C, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2006. Dysregulation of Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in Alzheimers Disease: A Therapeutic Target. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006, 1-11.
- Gra Menéndez S, Padrón Pérez N, Llibre Rodríguez JJ. 2002. Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(4), 253-261.
- Hanyu H, Shimizu S, Hirao K, Kanetaka H, Iwamoto T, Chikamori T, Abe K. 2005. Comparative value of brain perfusion SPECT and [ $^{123}$ I]MIBG myocardial scintigraphy in distinguishing between dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 33(3), 248-253.
- Hinds HL, Tonegawa S, Malinow R. 1998. CA1 Long-Term Potentiation Is Diminished but Present in Hippocampal Slices from  $\alpha$ -CaMKII Mutant Mice. *Learning & Memory*, 5(4), 344-354.
- Huang, H., & Klein, P. S. 2004. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, 5(7), 234.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2010). Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimers disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 65-72.
- Larson ME, Lesné SE. 2011. Soluble A $\beta$  oligomer production and toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 120, 125-139
- Maas T, Eidenmüller J, Brandt R. 2000. Interaction of Tau with the Neural Membrane Cortex Is Regulated by Phosphorylation at Sites That Are Modified in Paired Helical Filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 15733-15740. doi:10.1074/jbc.m000389200
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000): 631-639.
- Meneghetti AB. 2014. Avaliação dos Mecanismos envolvidos na Toxicidade de Oligômeros de Peptídeo  $\beta$ - amiloide em Cultura Organotípica de Hipocampo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Monteiro MR, Kandratavicius L, Leite JP. 2011. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 17(1), 17-23.
- Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST. 2002. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *The EMBO Journal*, 21(3), 281-293.
- Nelson PT, Jicha GA, Schmitt FA, Liu H, Davis DG, Mendiondo MS, Markesbery WR. 2007. Clinicopathologic Correlations

- in a Large Alzheimer Disease Center Autopsy Cohort: Neuritic Plaques and Neurofibrillary Tangles “Do Count” When Staging Disease Severity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(12), 1136–1146.
- Preece P, Virley D, Costandi M, Coombes R, Moss S, Mudge A, Jazin E, Cairns N. 2004. Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer’s disease brain. *Molecular Brain Research*, 122(1), pp.1-9.
- Sakono M, Zako T. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *FEBS Journal*, 277(6), 1348-1358.
- Santos, RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI, Zhu X. 2010. Alzheimer’s disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(6): p. 570-81.
- Schultz C, Ghebremedhin E, Braak E, Braak H. 1999. Sex-Dependent Cytoskeletal Changes of the Human Hypothalamus Develop Independently of Alzheimer’s Disease. *Experimental Neurology*, 160(1), 186-193.
- Decker H. 2010. Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo  $\beta$ -amilóide. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Viola KL, Klein WL. 2015. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer’s disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 183-206.
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E. 2010. A Oligomers Cause Localized Ca<sup>2+</sup> Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *Journal of Neuroscience*, 30(36), 11938-11950.
- Zhao W, Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Klein WL. 2007. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *The FASEB Journal*, 22(1), 246-260.

# As lendas e a ciência por trás dos répteis gigantes de Araraquara

Legends and science behind the Araraquara giant reptiles

**Heitor Francischini<sup>1\*</sup>; Paula Dentzien-Dias<sup>2</sup>; Virgínia de Gobbi<sup>3</sup> e Marcelo Adorna Fernandes<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Geociências, Laboratório de Paleontologia de Vertebrados, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>2</sup>Laboratório de Geologia e Paleontologia, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

<sup>3</sup>Museu de Arqueologia e Paleontologia de Araraquara, MAPA.

<sup>4</sup>Laboratório de Paleocologia e Paleocnologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

\*Contato: heitorfrancischini@hotmail.com

**Resumo.** Imersa em lendas e mitos sobre a presença de uma gigantesca serpente que habita o seu subterrâneo, a cidade paulista de Araraquara possui um dos mais ricos e diversos registros de pegadas fósseis do mundo. Este registro revela que as rochas que a sustentam foram outrora um grande deserto habitado por outro tipo de réptil: os dinossauros. Até hoje é possível encontrar em suas calçadas pegadas destes e de outros animais pré-históricos.

**Palavras-chaves.** *Dinossauros; pegadas; Cretáceo; Formação Botucatu; paleontologia.*

**Abstract.** Immersed in legends and myths about the presence of a giant snake that inhabits its underground, Araraquara has one of the richest and most diverse records of fossil footprints in the world. This record reveals that the rocks that support this city were once a large desert inhabited by another type of reptile: the dinosaurs. Up to this day, it is still possible to find footprints of these and other prehistoric animals on the sidewalks. **Keywords.** *Dinosaurs; footprints; Cretaceous; Botucatu Formation; paleontology.*

Recebido: 06jul17  
Aceito: 07out18  
Publicado: 23nov18

Editado por Ana  
Bottallo Quadros  
e revisado por  
Anônimo

A Vila de São Bento de Araraquara foi fundada em agosto de 1817 na região central do Estado de São Paulo, há pouco mais de 200 anos (Figura 1). Desde então, existem diversos rumores sobre a presença de répteis habitando o subsolo desta cidade paulista. A cidade nasceu e cresceu ao redor da Igreja Matriz de São Bento (Fig. 1A), construída na então Sesmaria do Ouro por Pedro José Neto e sua família. As obras desta igreja, no entanto, não terminaram até hoje. Isso porque no ano de 1897 dois homens foram assassinados em um episódio conhecido como “o linchamento dos Britos”, derivado de uma disputa política entre os que defendiam a Proclamação da República e os que defendiam a manutenção da Monarquia (Françoso, 2015a). Após uma briga, o jornalista e monarquista Rosendo de Souza Brito teria assassinado o coronel republicano Antônio Joaquim de Carvalho, o que levou à prisão juntamente com seu

tio, Manoel de Souza Brito (Telarolli, 2003; Martinez Córrea, 2008; Françoso, 2015a,b). Posteriormente, teria havido uma invasão na cadeia pública (naquela época localizada em frente à Igreja Matriz) por parte de pessoas que buscavam vingança pela morte do coronel, e os Britos teriam sido cruelmente linchados e postos em exposição na praça da Igreja (Telarolli, 2003; Martinez Córrea, 2008; Françoso, 2015a). O Padre Antônio Cezarino, responsável pela Igreja Matriz, teria amaldiçoado os envolvidos neste trágico evento. A partir de então, nasceria uma serpente que habitaria o subterrâneo da Igreja Matriz e que permaneceria dormente sob a cidade (Françoso, 2015b).

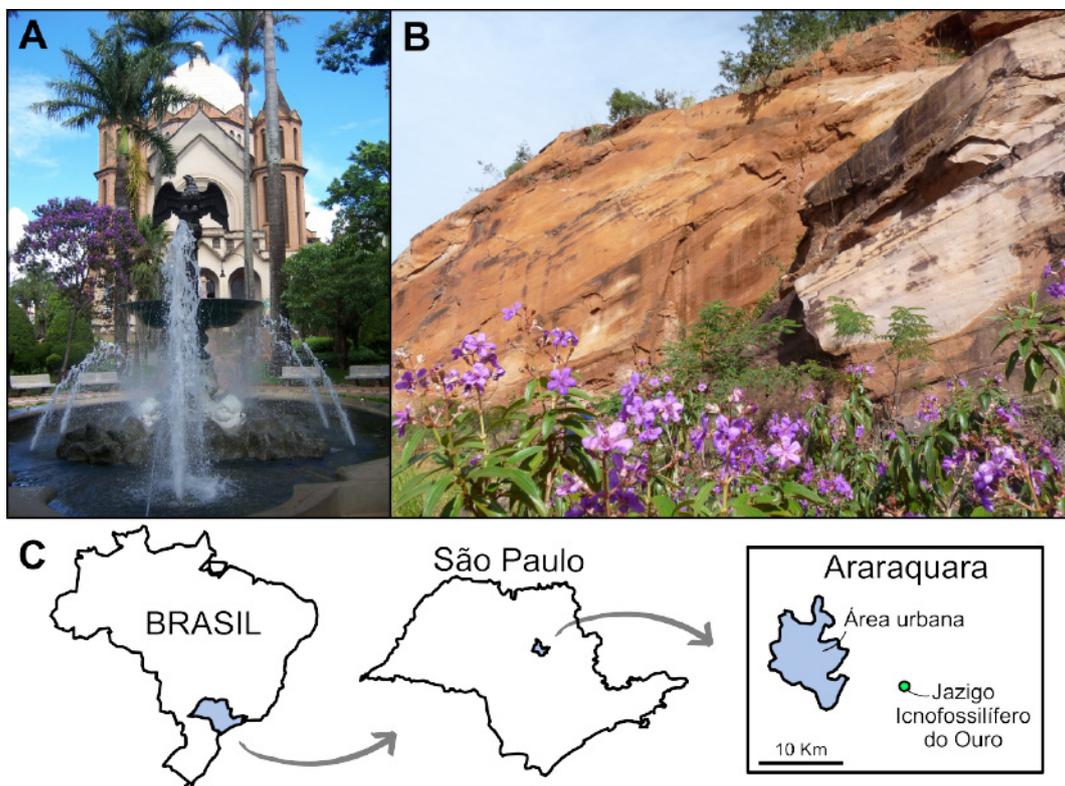
Uma das versões desta lenda conta que a cabeça de tal réptil estaria localizada debaixo do altar da Igreja e a ponta de sua cauda alcançaria o local onde os Britos foram enterrados (o antigo Cemitério dos Britos, hoje Cemitério das Cruzes, no bairro Jar-

dim Paraíso), a aproximadamente 5 km de distância. Outras versões contam que o corpo da serpente poderia alcançar a Igreja do Carmo, e os menos contidos dizem que a cauda do réptil chegaria à Catedral de São Carlos, cidade vizinha que dista mais de 40 km do centro de Araraquara. A serpente, adormecida, esperaria por vingança e cresceria no subsolo araraquarense até que despertaria para destruir toda a cidade. O momento exato desta tragédia começaria com o término da construção da Igreja Matriz (para mais detalhes sobre esta lenda, suas variações e significados etnográficos, ver Françaço, 2015b).

Curiosamente, nestes 200 anos de história, a igreja nunca terminou de ser construída e seu projeto original passou por diversas reformas. Uma das versões da lenda diz que a serpente se move assim que as obras se aproximam do final, criando novas rachaduras no templo (Françaço, 2015b). Imersos nas diversas versões da lenda, os responsáveis pelas obras da Igreja modificaram por várias vezes o projeto original, de maneira a dar à cúpula da Igreja um formato de águia, o qual salvaria Araraquara da total destruição. Por medidas de segurança, a fonte da Praça da Matriz também possui uma escultura desta ave (Fig. 1A). Ainda, por coincidência ou não, o pa-

droeiro da cidade é São Bento da Núrsia. Este santo é conhecido pela relação com serpentes e aves, e as inscrições em sua Cruz-Medalha possuem referências a répteis amaldiçoados (“*Non draco sit mihi dux*”, não seja o meu guia o dragão) e vingança (“*Ipse venena bibas*”, bebas do teu próprio veneno). Estes elementos da mitologia católica poderiam ter servido de base para o surgimento da lenda araraquarense (Françaço, 2015b).

A despeito da popularidade desta lenda entre os araraquarenses, não existem evidências da presença da famosa e gigantesca serpente sob o solo da cidade. É conhecido entre os geólogos que Araraquara está assentada sobre camadas de basalto e arenito (Figura 1B; Soares, 1975; Scherer, 2000). A origem destas rochas, também conhecidas como Grupo São Bento (em referência à antiga Vila e seu padroeiro), está relacionada com a deposição de um enorme deserto de areia que cobria uma área de 1,2 milhão de km<sup>2</sup> (Soares, 1975). Os arenitos (conhecidos como Arenito Botucatu) são rochas derivadas das areias das dunas deste imenso deserto e podem ser encontradas nos atuais territórios da Argentina, Paraguai, Uruguai, Namíbia e África do Sul, além de oito estados brasileiros (GO, MG, MS, MT, PR, RS, SC e SP;



**Figura 1.** Araraquara e o Jazigo Icnofossilífero do Ouro. **A.** A Igreja Matriz de São Bento em sua versão mais atual e sua fonte em forma de águia. Neste mesmo local, os Britos teriam sido assassinados em 1897. **B.** Visão geral dos arenitos eólicos da Formação Botucatu na Pedreira São Bento. **C.** Localização geográfica do Jazigo Icnofossilífero do Ouro, onde estão localizadas as pedreiras.

Scherer, 2000). As areias deste deserto foram acumuladas pelo vento, que realocou e depositou cada grão em grandes dunas, tais como as do atual deserto de Saara, na África (Scherer, 2000). Já as camadas de basalto encontradas sempre acima das camadas de arenito têm origem magmática, ou seja, são derrames de lava que, em contato com a atmosfera, resfriaram e endureceram. Dados geocronológicos (obtidos da datação absoluta das rochas usando isótopos de argônio) indicam que o início da deposição destas lavas e, conseqüentemente, o fim da deposição das dunas de areia, ocorreu há aproximadamente 137



**Figura 2.** O padre e paleontólogo ítalo-brasileiro Giuseppe Leonardi. **A.** Na Pedreira São Bento, estudando as pegadas nos arenitos de uma antiga duna. **B.** Em sua mais recente expedição (à direita) à pedreira São Bento, no ano de 2013. **C.** Estudando as lajes de arenito nas calçadas de Araraquara.

milhões de anos, no período geológico conhecido como Cretáceo (Turner et al., 1994).

O Cretáceo é o período geológico que compreende a história da vida na Terra entre 145 e 66 milhões de anos, mas ficou mais conhecido pelos gigantescos animais que habitaram o nosso planeta naquele momento (e também nos dois períodos anteriores, o Triássico e o Jurássico): os dinossauros. Este grupo de animais surgiu durante o período Triássico (de 251 a 201 milhões de anos atrás), mas foi durante o Cretáceo que os dinossauros atingiram um tamanho descomunal. Dentre os gigantes, talvez o mais popular seja o tiranossauro (*Tyrannosaurus rex*), um dinossauro bípede e carnívoro do grupo dos terópodes. Já dentre os herbívoros, os saurópodes foram os maiores animais que já habitaram a Terra, alguns deles podendo pesar quase 70 toneladas (Carballido et al., 2017).

Atualmente, mais de 20 espécies de dinos-

sauros já foram descritas no Brasil e este número só tende a crescer (Anelli, 2010; Bittencourt e Langer, 2011). Diversas espécies foram encontradas em cidades do interior paulista, como o *Gondwanatitan faustoi* e o *Brasilotitan nemophagus* (e.g. Kellner e Azevedo, 1999; Machado et al., 2013), mas a região de Araraquara não possui (até o presente) restos corporais de dinossauros, como dentes e ossos fossilizados. Por outro lado, pegadas destes animais são muito abundantes nos arenitos utilizados no calçamento das vias públicas da cidade (Leonardi, 1980; Fernandes et al., 2008).

Araraquara possui inúmeras pedreiras (atualmente quase todas inativas) que exploram comercialmente o arenito para sua utilização em pavimentação de calçadas, quintais, praças, dentre outros (Leonardi, 1980; Leonardi e Godoy, 1980; Leonardi e Carvalho, 2002; Leonardi et al., 2007). Uma vez que os arenitos são rochas derivadas da areia das dunas do referido deserto cretácico, eles preservaram os vestígios dos animais que viveram neste ambiente. Desta forma, é muito comum encontrar lajes de arenito com pegadas fossilizadas de animais já extintos (dentre eles, dinossauros, mamíferos e invertebrados, como aranhas, escorpiões e besouros) ao se caminhar pelo centro de Araraquara (Leonardi, 1980; Fernandes et al., 2008).

Na década de 1970, este curioso acervo paleontológico a céu aberto chamou a atenção de um especialista no assunto (Figura 2). Em 1976, o padre e paleontólogo italiano (naturalizado brasileiro em 1979) Giuseppe Leonardi chegou a Araraquara com o intuito de encontrar tais pegadas fósseis e estudá-las (Caloni, 2010). Ao notar a abundância destes vestígios fósseis, Leonardi chegou a mencionar em uma das tantas entrevistas que era possível encontrar de cinco a dez lajes contendo pegadas fósseis a cada quadra caminhada (Fig. 3; Caloni, 2010). Era o lugar ideal para que um paleoicnólogo (paleontólogo especialista em pegadas e outros vestígios de animais preservados no registro fóssil) realizasse suas pesquisas.

Ao buscar a origem destas lajes, Leonardi encontrou a Pedreira São Bento (então em atividade) e outras seis pedreiras (Califórnia, Cerrito Novo, Cerrito Velho, Corpedras, Santa Águeda e São Domingos, todas em Araraquara), que funcionavam extraindo lajes de arenito das antigas dunas e, em todas elas, pegadas de dinossauros eram muito abundantes (Leonardi, 1980; Leonardi e Godoy, 1980). Todas estas pedreiras estão localizadas muito próximas umas das outras e representam os antigos campos de dunas do Cretáceo. A região, então, passou a ser denominada “Jazigo Icnofossilífero do Ouro”, devido à sua

importância científica e em alusão à antiga Sesmaria (Fig. 1C; Leonardi e Carvalho, 2002). Durante todo o período em que Leonardi ficou em Araraquara, o paleontólogo coletou inúmeras lajes com pegadas, que hoje estão distribuídas em diversos museus e universidades Brasil afora.

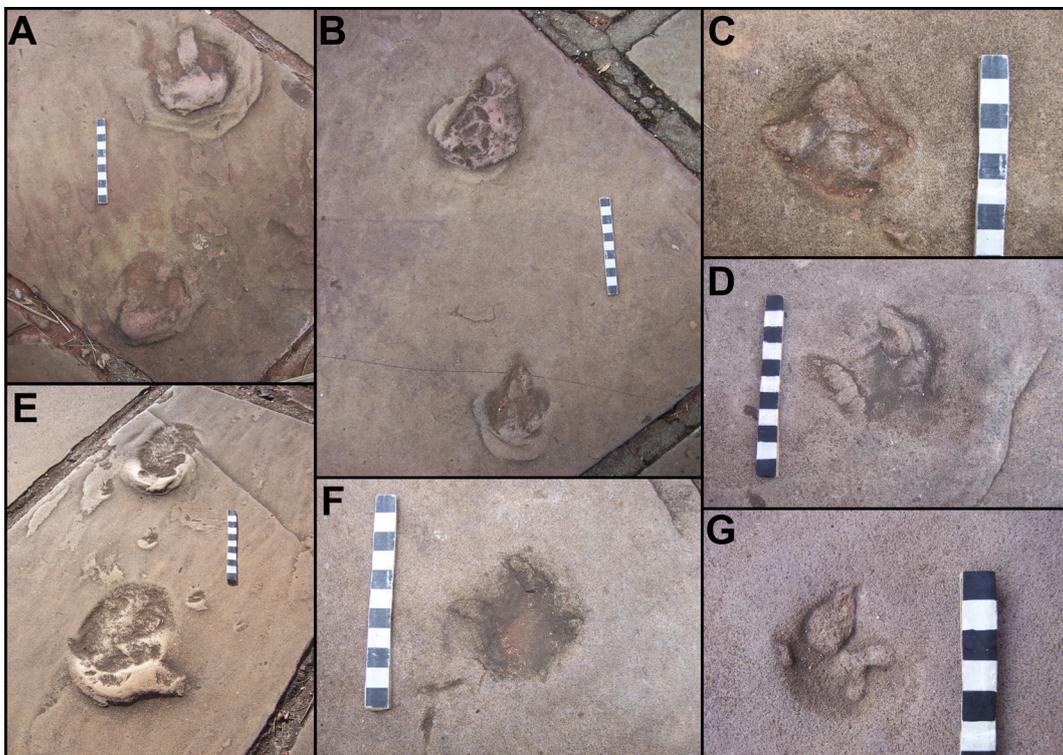
O padre cientista, no entanto, intrigou-se pelo fato de os dinossauros de Araraquara terem deixado pegadas tão pequenas, uma vez que, em outros lugares do mundo, eles teriam atingido tamanhos colossais. Uma das hipóteses levantadas por ele era de que se tratava de uma fauna de pequeno porte, uma vez que o deserto quente e seco não forneceria recursos suficientes, como água e alimento, para que animais de grande porte pudessem habitá-lo (Leonardi *et al.*, 2007).

Recentemente, publicamos um trabalho em que pudemos inferir o tamanho dos dinossauros de Araraquara com base em suas pegadas (Fig. 4; Francischini *et al.*, 2015), e o resultado revelou que a maioria dos animais não passava de meio metro de altura. Com isto, pudemos endossar a hipótese levantada pelo Padre Leonardi. Outro resultado importante foi a completa ausência de pegadas de dinossauros saurópodes (herbívoros quadrúpedes que possuíam longos pescoços e caudas, como o

*Gondwanatitan* mencionado anteriormente). Como estes animais eram muito grandes, eles não poderiam sobreviver em um ambiente tão hostil e, além disso, afundariam se tentassem cruzar as dunas de areias do deserto de Araraquara (Francischini *et al.*, 2015). Sendo assim, podemos dizer que, apesar de não serem conhecidos ossos e dentes de dinossauros no município, as pegadas por eles deixadas reforçam a ideia de que o ambiente e o clima da região durante o Cretáceo eram muito diferentes dos encontrados em outras localidades do mundo no mesmo período (Francischini *et al.*, 2015), o que chama a atenção para a excepcionalidade da fauna de dinossauros de Araraquara.

Ainda é possível andar por Araraquara e encontrar lajes de arenito nas calçadas da cidade. Todavia, com o crescimento da cidade e a falta de preservação deste patrimônio, as lajes estão desaparecendo ou sendo destruídas (Fig. 5). Muitos moradores desconhecem a presença de pegadas de dinossauros nestas rochas e/ou não sabem reconhecê-las. Por isso, acabam por preenchê-las com cimento (Fig. 5A), pintá-las (Fig. 5B) ou mesmo por descartá-las como entulho durante uma reforma.

Neste sentido, o Museu de Arqueologia e Paleontologia de Araraquara (MAPA) oferece estru-



**Figura 3.** Pegadas de dinossauros (A-G) encontradas nas calçadas de Araraquara. As mais bem preservadas estão localizadas na Praça do Parque Infantil (Av. Padre Duarte, entre as ruas São Geraldo e Prof. Jorge Corrêa), no centro de Araraquara. Escalas em centímetros.



**Figura 4.** Reconstrução artística do deserto que cobria Araraquara há 137 milhões de anos e os dinossauros que o habitavam. Toda esta reconstrução foi realizada unicamente com base no estudo das pegadas fósseis da região. Retirada de Francischini et al. (2015). Arte de Voltaire Paes Neto.

ra e pessoal qualificado para o ensino e a divulgação científica sobre a importância deste patrimônio científico, cultural e arquitetural de Araraquara (Fig. 5C).

Somente com o devido investimento em educação este patrimônio estará a salvo e terá a sua importância científica resguardada, o que permitirá que o povo araraquarense se aproprie do conhecimento científico derivado da pesquisa das pegadas fósseis da cidade tal como faz com seu patrimônio cultural e folclórico representado pela lenda da serpente adormecida sob a Igreja Matriz de São Bento.

A Paleontologia, como atividade científica, tem como um de seus preceitos a busca racional pelo conhecimento e, conforme novos dados ou evidências surgem, modifica seus paradigmas de modo a tentar explicar melhor os fenômenos e os agentes da natureza, sejam os atuais ou os de tempos remotos. Não podemos deixar de lembrar que Araraquara não possui somente 200 anos de história. Antes de sua fundação por Pedro José Neto, habitaram na região índios e, ainda mais antigamente, animais que hoje já se encontram extintos. De qualquer modo, as lendas locais e a Ciência indicam que Araraquara possui uma “vocação” para histórias envolvendo padres e répteis ferozes. Cabe ao povo manter viva a sua tradição folclórica sem deixar que o patrimônio científico caia no esquecimento.

### Agradecimentos

Agradecemos às equipes do Museu de Arqueologia e Paleontologia de Araraquara (MAPA) e do Laboratório de Paleontologia de Vertebrados da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFR-



**Figura 5.** A conservação das pegadas fósseis de Araraquara. **A.** Um par de pegadas de dinossauros já preenchidas por cimento. **B.** O Padre Giuseppe Leonardi fotografa uma laje com pegadas que foi pintada. **C.** A fachada do Museu de Arqueologia e Paleontologia de Araraquara (MAPA), onde são realizadas atividades de educação patrimonial e divulgação científica.

GS) por todo o suporte concedido. Também somos gratos aos dois revisores anônimos e à editora Dra. Fabiana Rodrigues da Costa (UFABC), cujos comentários e sugestões contribuíram para o enriquecimento do texto. Agradecemos ao Dr. Giuseppe Leonardi, por todo seu trabalho realizado na cidade e pela concessão de algumas de suas fotos. A pesquisa que embasa este texto foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com uma bolsa concedida a HF (Processo: 140581/2014-6).

## Referências

- Anelli, LE. 2010. O Guia Completo dos Dinossauros do Brasil. São Paulo: Editora Peirópolis. 224p.
- Bittencourt, JS, Langer, MC. 2011. Mesozoic dinosaurs from Brazil and their biogeographic implications. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83(1): 23–60.
- Caloni, B. 2010. Giuseppe Leonardi: um cidadão do Pangea. *O Imparcial*, Araraquara, 22 ago. p.1–4.
- Carballido, JL, Pol, D, Otero, A, Cerda, IA, Salgado, L, Garrido, AC, Ramezzani, J, Cúneo, NR, Krase, MJ. 2017. A new giant titanosaur sheds light on body mass evolution among sauropod dinosaurs. *Proceedings of the Royal Society B* 284(1860): 20171219.
- Fernandes, MA, Francischini, H, Carvalho, IS 2008. Paleocnologia Urbana: o patrimônio fossilífero de Araraquara, estado de São Paulo, Brasil. *Memórias e Notícias* 3: 455–462.
- Françoso, LM. 2015a. Linchaquara – o assassinato dos Brito. *Cadernos de Campo* 19: 61–85.
- Françoso, LM. 2015b. A Modernidade é uma Serpente. 134p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.
- Francischini, H, Dentzien-Dias, PC, Fernandes, MA, Schultz, CL. 2015. Dinosaur ichnofauna of the Upper Jurassic/Lower Cretaceous of the Paraná Basin (Brazil and Uruguay). *Journal of South American Earth Sciences* 63: 180–190.
- Kellner, AWA, Azevedo, SAK. 1999. A new sauropod dinosaur (Titanosauria) from the Late Cretaceous of Brazil. *National Science Museum Monographs* 15: 111–142.
- Leonardi, G. 1980. On the discovery of an abundant ichno-fauna (vertebrates and invertebrates) in the Botucatu Formation s.s. in Araraquara, São Paulo, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 52(3): 559–567.
- Leonardi, G, Carvalho, IS. 2002. Jazigo Icnofossilífero do Ouro – Araraquara (SP). In Schobbenhaus, C, Campos, DA, Queiroz, ET, Winge, M, Berbert-Born, M (Eds.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. Brasília: DNPM. p.39–48.
- Leonardi, G, Carvalho, IS, Fernandes, MA. 2007. The desert ichnofauna from Botucatu Formation (Upper Jurassic–Lower Cretaceous), Brazil. In Carvalho, IS, Cassab, RCT, Schwanke, C, Carvalho, MA, Fernandes, ACS, Carvalho, MSS, Arai, M, Oliveira, MEQ (Eds.) *Paleontologia: Cenários de Vida*. Rio de Janeiro: Interciência. p.379–391.
- Leonardi, G, Godoy, LC. 1980. Novas pistas de tetrápodes da Formação Botucatu no Estado de São Paulo. In *Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Geologia*, Balneário Camboriú, 5. p.3080–3089.
- Machado, EB, Avilla, LS, Nava, WR, Campos, DA, Kellner, AWA. 2013. A new titanosaur sauropod from the Late Cretaceous of Brazil. *Zootaxa* 3701(3): 301–321.
- Martinez Corrêa, AM. 2008. Araraquara 1720–1930: um capítulo da história do café em São Paulo. São Paulo: Cultura Acadêmica. 321p.
- Scherer, CMS. 2000. Eolian dunes of the Botucatu Formation (Cretaceous) in southernmost Brazil: morphology and origin. *Sedimentary Geology* 137: 63–84.
- Soares, PC. 1975. Divisão estratigráfica do Mesozóico no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Geociências* 5: 229–251.
- Telarolli, R. 2003. Para uma história de Araraquara: 1800 a 2000. Araraquara: Editora da Universidade Estadual Paulista, Laboratório Editorial. 232p.
- Turner, S, Regelous, M, Hawkesworth, C, Montovani, M. 1994. Magmatism and continental break-up in the South Atlantic: high precision  $^{40}\text{Ar}$ - $^{39}\text{Ar}$  geochronology. *Earth and Planetary Science Letters* 121: 333–348.