

Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos

JOAQUÍN LÓPEZ SORIANO

#Dipartimento di Endocrinologia, Ospedale di Cisanell
Via Paradisa 2, 56124 Pisa, Italy
E-mail: qlopezs@yahoo.com

Resumen.—**Técnicas de biología molecular aplicadas a la taxonomía y filogenia de moluscos.** El presente artículo describe brevemente los fundamentos de las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas recientemente en el campo de la taxonomía, con especial énfasis en la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), así como algunos ejemplos aplicados de dichas técnicas en el ámbito de la malacología.

Palabras clave.— DNA, Taxonomía molecular, PCR.

Resum.—**Tècniques de biologia molecular aplicades a la taxonomia i filogènia de mol·luscs.** El present article descriu breument els fonaments de les noves tècniques de biologia molecular emprades recentment en el camp de la taxonomia, amb especial èmfasi en la tècnica de la PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa), així com alguns exemples aplicats d'aquestes tècniques en l'àmbit de la malacologia.

Paraules clau.— DNA, Taxonomia molecular, PCR.

Abstract.—**Molecular biology techniques applied to the taxonomy and phylogeny of mollusks.** This article briefly describes the basis of the new molecular biology techniques recently applied in the field of taxonomy, with special mention to the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique, as well as some practical examples of the use of these techniques in the field of malacology.

Key words.— DNA, Molecular taxonomy, PCR.

INTRODUCCIÓN

La taxonomía y filogenia de grupos de organismos constituye sin duda unos de los grandes retos de la biología, dada la enorme variabilidad de seres vivos presentes en la naturaleza. Numerosas técnicas han sido empleadas a lo largo del tiempo para la consecución de este objetivo. Esencialmente, todas las clasificaciones de organismos, tanto a nivel de especie como de grandes grupos taxonómicos, se han basado en el uso de análisis anatómicos y/o morfológicos, dada la evidente correlación entre forma y evolución. Así, muchos grupos y especies de animales se han catalogado en base a la forma del exoesqueleto, extremidades, vísceras, etc., en ocasiones en contra de lo que a primera vista se pudiera pensar por la apariencia externa de dichos

organismos. Igualmente, el registro fósil ha permitido ampliar y mejorar considerablemente estas clasificaciones, con la comparación de organismos actuales con otros extinguidos. Más recientemente técnicas más sofisticadas han permitido elaborar taxonomías y filogenias mediante estudios, por ejemplo, de embriogénesis, mientras que una técnica de gran aceptación en la actualidad sería el empleo de análisis biométricos, que permiten estudios comparativos mucho más complejos mediante la aplicación de criterios matemáticos a los análisis de parámetros cuantificables objetivamente, especialmente para especies y categorías taxonómicas inferiores, además de fósiles; ejemplos de esta última técnica aplicada en malacología pueden hallarse en los diferentes números de esta revista (Alba *et al.*, 2001; López Soriano, 2003).

El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha supuesto un nuevo salto cualitativo para el mundo de la sistemática, dadas las enormes posibilidades que estas técnicas ofrecen, estudiando el bastión último de la variabilidad biológica, que es la variabilidad genética. No obstante, cabe considerar que la mayoría de estas técnicas, al menos las más potentes, se han desarrollado muy recientemente, de manera que tan sólo estamos al principio de esta auténtica revolución que permitirá estudios mucho más exhaustivos de los realizados hasta el presente, sin menoscabo del trabajo que se haya podido realizar hasta el momento con técnicas menos complejas. Las posibilidades de estas nuevas técnicas parecen ilimitadas, si bien no debe caerse en el error de pensar que son de por sí suficientes y definitivas, sino más bien un complemento a todas las otras técnicas empleadas hasta la fecha, que, sin duda, mantendrán su valor y vigencia.

ASPECTOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Los organismos vivos, sean bacterias, plantas o animales, comparten la mayoría de rasgos y características respecto a su composición química. Si bien los seres vivos están constituidos mayoritariamente por elementos inorgánicos (agua, sales minerales), las moléculas que los caracterizan son las orgánicas. Entre las muchas de la naturaleza, los seres vivos presentan todas macromoléculas de al menos cuatro grupos esenciales: ácidos nucleicos, proteínas, grasas y glúcidos/hidratos de carbono. Dada la limitación de espacio, sólo se comentará brevemente en este artículo los aspectos más esenciales sobre el DNA (ácido desoxirribonucleico) para poder comprender la utilidad de las técnicas que se comentarán, remitiendo al lector a libros de biología y bioquímica para más información.

Los ácidos nucleicos (desoxirribonucleico o DNA y ribonucleico o RNA) constituyen la esencia misma de la vida, pues contienen la información necesaria para el funcionamiento de los seres vivos. Esta información está codificada en forma de bases nitrogenadas, básicamente cuatro para el DNA: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), mientras que en el RNA la timina está sustituida por el uracilo

(U). El orden en que se presentan estas cuatro unidades en las cadenas lineales de DNA o RNA, lo que llamamos su secuencia, determina la información contenida por estas macromoléculas, de manera que cada tres bases codifican una "palabra" o unidad de información, que en realidad será el aminoácido de una proteína. Así, hay $4 \times 4 \times 4 = 64$ unidades de información distintas en este código, aunque algunas sean reiterativas (sólo hay unos 25 aminoácidos). De alguna manera, este código es similar a los códigos binarios de informática, en los que la secuencia de ceros y unos determina la información. Cabe tener en cuenta que el DNA forma una doble cadena, de forma que una cadena es complementaria a la otra, pero no igual. Por cada A de una cadena hay una T en la otra, y por cada C de una, una G en la otra, y viceversa. De esta manera, al replicarse el ADN se forman dos moléculas de doble cadena exactamente iguales a la original. El RNA, por su parte, está constituido por una única cadena, complementaria del DNA.

El DNA contiene, pues, la información genética de los seres vivos. Cada célula de un organismo posee dos dotaciones o copias completas de este DNA (una sola en gametos), y por tanto todo el potencial genético del organismo. Sin embargo, no todos los genes son activos en todas las células, pues de lo contrario todas las células serían exactamente iguales, lo cual evidentemente no es así. Para transformar la información en materia, el DNA debe ser "leído" y traducido a RNA por unas proteínas específicas (polimerasas), de manera que una única molécula de DNA dará lugar a muchas (o ninguna) de RNA. Este RNA será finalmente traducido a proteínas, que permitirán dar cuerpo a la información del DNA en forma de enzimas, proteínas estructurales, hormonas, receptores, etc. Como antes, cada molécula de RNA puede dar lugar a numerosas de proteína, produciendo un efecto de amplificación notable. Algunas moléculas de RNA, como el RNA ribosomal y el RNA de transferencia, tienen funciones estructurales y metabólicas *per se*, y no son traducidas a proteínas, lo mismo que buena parte de la secuencia global del DNA, que juega papeles reguladores o incluye fragmentos reiterativos. Todo este proceso de lectura de la información contenida en el DNA es de una complejidad enorme, y en él participan un sinnúmero de

moléculas y procesos regulatorios, por lo que no se entrará a describirlo en detalle.

El DNA está contenido en el núcleo de las células, salvo aquellas que no poseen tal, como las bacterias. Sin embargo, es menos sabido que no sólo hay DNA en el núcleo, sino también en al menos dos orgánulos subcelulares: los cloroplastos (sólo en plantas) y las mitocondrias. De hecho, se cree actualmente que ambos orgánulos no son más que antiquísimas bacterias que llevaron una relación simbiótica mucho más lejos que otras bacterias u organismos, hasta formar parte de hecho de la célula que las hospedaba, que se supone debió ser otra bacteria (Margulis & Bermudes, 1981; Guerrero *et al.*, 1986). Sin embargo, cloroplastos y mitocondrias han mantenido a lo largo de la evolución su DNA (o al menos parte de él) y se replican gracias a este DNA propio de forma bastante independiente del DNA nuclear.

La utilidad del DNA mitocondrial es enorme, pues su frecuencia de mutación es diferente al del DNA nuclear, de manera que puede ser utilizado para estudiar de forma más adecuada el tiempo transcurrido en función de las mutaciones acumuladas. Así, se asume que la cantidad de mutaciones que se acumulan en el DNA mitocondrial es proporcional al tiempo, con lo cual puede estimarse si dos organismos están más o menos emparentados en función de dichas acumulaciones de mutaciones, mientras que esta proporcionalidad es mucho menos evidente con el DNA nuclear, excepción hecha de algunos genes, como los correspondientes al DNA ribosomal. No obstante, esto es sólo relativamente cierto, pues la proporcionalidad entre mutaciones y tiempo transcurrido sólo es aplicable a determinados genes, pero no a todos, lo cual requiere sumo cuidado a la hora de elegir genes para caracterizar filogenias.

De forma similar, las mutaciones del DNA se transmitirán al RNA y a las proteínas. Precisamente el cambio en la secuencia y en consecuencia en ciertas propiedades físicas de las proteínas se ha venido usando tradicionalmente para separar especies o poblaciones intraespecíficas, mediante análisis electroforéticos de diferentes proteínas. Sin embargo, estas técnicas aplicadas sobre proteínas, aunque perfectamente válidas,

son relativamente limitadas, pues la cantidad de mutaciones acumuladas en las proteínas son mucho menores a las del DNA, y su observación no es tan evidente por problemas técnicos que no se comentarán en este artículo.

Así pues, si podemos determinar directamente (por la secuenciación del DNA) o indirectamente (por sus propiedades) las mutaciones que distinguen al DNA de dos individuos de diferentes especies o poblaciones, y además cuantificarlas de alguna manera, dispondremos de una técnica que nos permitirá valorar cuán cerca o cuán lejos están estos individuos filogenéticamente. A más diferencia evolutiva, más mutaciones y más diferencias en la secuencia del DNA cabrá esperar, ya que las mutaciones no son reversibles por su bajísima frecuencia (es decir, una vez producida una mutación, es poco menos que imposible que vuelva a la forma original por la mutación inversa).

Obtener DNA es relativamente sencillo, siendo de hecho una técnica rutinaria en cualquier laboratorio. El DNA de un tejido puede purificarse de otras moléculas, y analizarse mediante técnicas electroforéticas, que permiten su separación en función del tamaño. Así, un fragmento de DNA migrará en un campo eléctrico según su tamaño, con mayor movilidad para los fragmentos menores, y menor conforme aumenta el tamaño, siempre que se utilice un soporte adecuado. Generalmente se analiza en geles de agarosa, que forman una malla intrincada por la que las moléculas encuentran mayor o menor resistencia a su paso por su tamaño más que por su carga eléctrica. Bajo condiciones adecuadas, es posible separar perfectamente fragmentos de DNA de diferente tamaño, con un poder de resolución notable.

LA TÉCNICA DE LA PCR

Una de las técnicas más recientes y a la vez más utilizadas actualmente en biología molecular es la de la PCR, de sus iniciales en inglés de *Polymerase Chain Reaction* (o Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica permite amplificar de forma selectiva fragmentos pequeños de DNA, de manera que partiendo de una pequeña cantidad de DNA podemos multiplicar su número por un factor de varios millones, amplificando específicamente sólo el gen

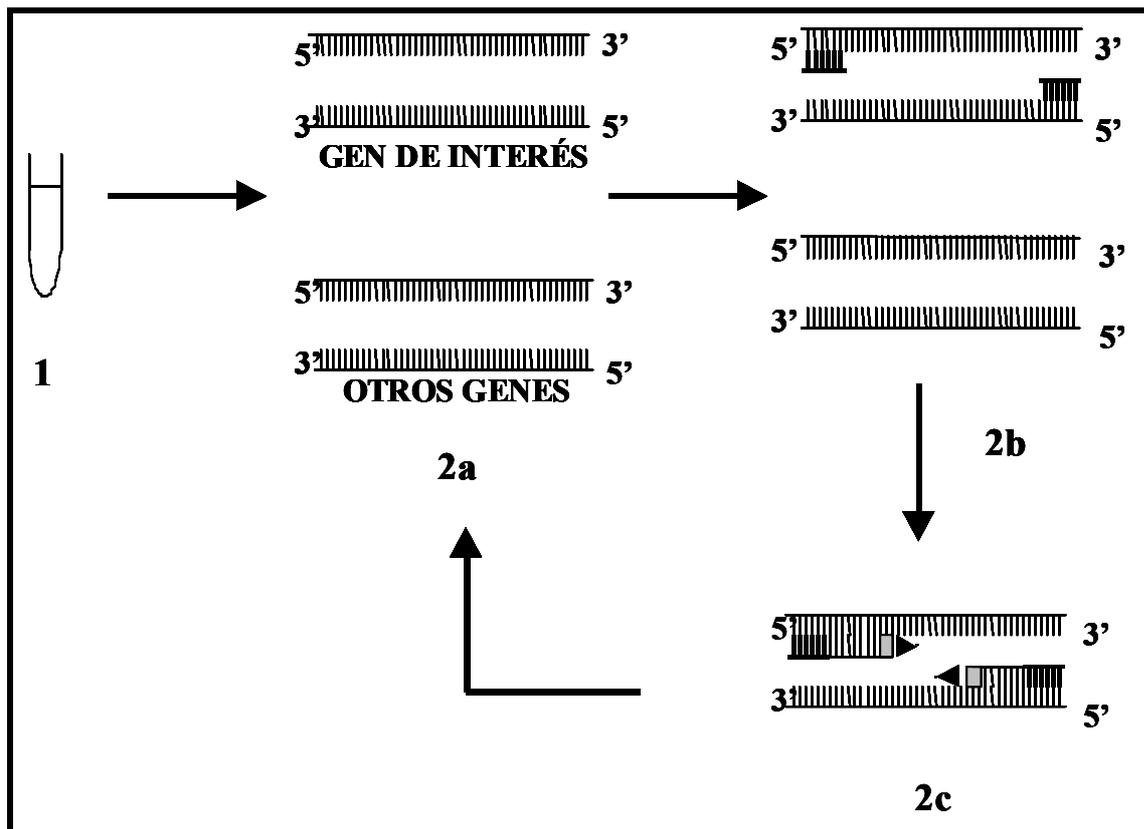


Figura 1. Esquema del fundamento de la técnica de la PCR: 1) Aislamiento del DNA a partir de muestras de tejido fresco por extracción con disolventes orgánicos; y 2) Amplificación del ADN por PCR: a) Desnaturalización del DNA a 95°C, con separación de las cadenas complementarias; b) Anillado a 56-60°C: los cebadores reconocen y se unen específicamente a sus secuencias complementarias; y c) Elongación a unos 70°C: la polimerasa forma la cadena complementaria a partir de fragmentos de doble cadena iniciados por los cebadores, obteniéndose dos copias del gen original. Posteriormente se repiten n veces (de 20 a 30) los pasos 2a, 2b y 2c.

de interés, pero no los demás. Esta técnica se basa en el uso de unos enzimas (polimerasas) aislados de bacterias termófilas, que pueden trabajar a temperaturas de casi 100 °C, a diferencia de la mayoría de enzimas.

En la Figura 1 se esquematiza el proceso de amplificación de la PCR. En primer lugar se trata de aislar el DNA total de un tejido del organismo (en principio sirve cualquiera, pues todos contienen la misma información genética, aunque hay que evitar contaminaciones, por ejemplo de bacterias). Tras unos procesos de extracción y purificación relativamente sencillos, se obtiene DNA parcialmente puro, aunque en muy pequeña cantidad, y por tanto imposible de analizar, al margen de contener decenas de miles de genes. Por tanto, el siguiente paso es amplificar de forma selectiva uno solo de estos genes, que será habitualmente alguno de los contenidos en el DNA mitocondrial o ribosomal. Para ello hay que conocer la

secuencia, o al menos parte de ella, del gen. Entonces hay que proceder (consultando una base de datos) a seleccionar dos fragmentos del mismo de unos pocos nucleótidos, de forma que sean específicos de dicho gen, pues de lo contrario muchos genes serían amplificados. Una vez seleccionados, se construirán artificialmente por síntesis química estos fragmentos u oligonucleótidos, que serán utilizados como cebadores de la reacción (*primers*). Entonces sólo hay que poner en un tubo de ensayo, en las condiciones adecuadas, la mezcla de los diferentes DNAs aislados del organismo, los cebadores, el enzima que replica el DNA (polimerasa) y suficientes nucleótidos como sustratos de la reacción. De esta manera, la polimerasa sólo copiará el DNA para el que disponga de cebador (ésta es una característica del enzima), así que sólo el gen de interés será amplificado, pero no el resto de genes de los millares posibles. Si este proceso de copia se repite de forma controlada un determinado

Tabla 1. Ejemplos de enzimas de restricción y sus secuencias diana reconocidas. Obsérvese que todas las secuencias tienen carácter palindrómico (la secuencia complementaria es la misma que la descrita en sentido inverso). Las letras se corresponden con las iniciales de la bacteria de donde se extrae el enzima (p.e., EcoRI de *Escherichia coli*). Se señala mediante una coma (,) el punto de corte. Adaptado a partir de *Promega Life Science Catalog (2002)*.

Enzima	Secuencia diana
HindIII	A'AGCTT
SalI	AGT'ACT
ClaI	AT'CGAT
NdeI	CA'TATG
SmaI	CCC'GGG
XhoI	C'TCGAG
PstI	CTGCA'G
EcoRI	G'AATTC
EcoRV	AT'ATC
NotI	GC'GGCCGC
HaeIII	GG'CC
KpnI	GGTAC'C

número de ciclos (entre 20 y 30 habitualmente), al final habremos enriquecido la mezcla en nuestro gen de interés en varios millones de veces. Hay que remarcar que el proceso es exponencial: el primer ciclo dará lugar a 2 copias, el segundo al doble, cuatro (2^2), el tercero al doble de cuatro, es decir, ocho (2^3), y así sucesivamente durante un cierto número de ciclos. Una vez amplificado, el DNA puede ser purificado por técnicas sencillas, previo a su análisis.

Una vez amplificado y purificado, existen diferentes opciones en función del tipo de estudio a realizar. Una posibilidad muy evidente es determinar toda o parte de la secuencia, proceso relativamente sencillo hoy en día al emplearse máquinas automáticas, pero bastante caro y no siempre eficaz por su complejidad. Por ejemplo, no es sencillo secuenciar el DNA de mil individuos y luego comparar estas mil secuencias diferentes, que pueden tener más de quinientos pares de bases cada una, pues para realizar este trabajo se requieren ordenadores de gran capacidad y el proceso en conjunto sería extraordinariamente lento y costoso.

Una opción mucho más sencilla es el empleo de enzimas de restricción. Los enzimas de restricción son unos enzimas aislados de bacterias que cortan el DNA de manera selectiva, mediante el reconocimiento de únicamente una secuencia muy específica de apenas 5-10 nucleótidos. Es decir, sólo cortarán el DNA

allí donde se presente la secuencia que reconocen, pero no el resto del DNA. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de estos enzimas y las secuencias que reconocen. Se conocen varios centenares de estos enzimas, que se comercializan para su uso rutinario en investigación.

La ventaja del uso de estos enzimas es que, al cortar por secuencias muy específicas, permiten comparar si dos DNA's de diferentes organismos presentan cambios en su secuencia, aunque no la conozcamos. Así, puede suceder que un individuo de una población A presente la secuencia reconocida por el enzima X, pero en una población B alejada evolutivamente esta secuencia se haya modificado por una sola mutación. Por tanto, este enzima ya no reconocerá la secuencia y no cortará el DNA por ese punto. Si se corta con este tipo de enzimas, el DNA da lugar a fragmentos que pueden identificarse por su tamaño mediante una electroforesis. Así, utilizando uno o varios enzimas de restricción, cada DNA ofrecerá un patrón de fragmentos característico que dependerá de su secuencia. Comparando estos fragmentos se puede deducir si dos DNAs son muy parecidos o muy distintos entre sí, e incluso puede llegar a cuantificarse esta diferencia mediante complejos cálculos estadísticos (dando lugar a las llamadas matrices de parsimonia). De esta manera, analizando sólo parcialmente las secuencias se pueden comparar poblaciones y especies, e incluso construir árboles genealógicos con estimaciones del periodo en que dos especies o grupos divergieron evolutivamente. En la Figura 2 se esquematizan, con un ejemplo hipotético, los patrones de bandas de DNA obtenidos mediante el uso de dos enzimas de restricción para DNA's de tres grupos poblacionales diferenciados.

Hay que tener en cuenta que un gen consta de un número elevado de nucleótidos (o pares de bases, dado el carácter de doble cadena del DNA), entre poco más de 100 y hasta unos pocos miles, de manera que, potencialmente, cada gen puede presentar varias dianas para los diferentes enzimas de restricción conocidos. Usualmente, un gen promedio de 1.500 pares de bases tendrá de varias docenas a un centenar de dianas, de manera que muchas mutaciones pueden ser fácilmente reconocibles, ya que un solo

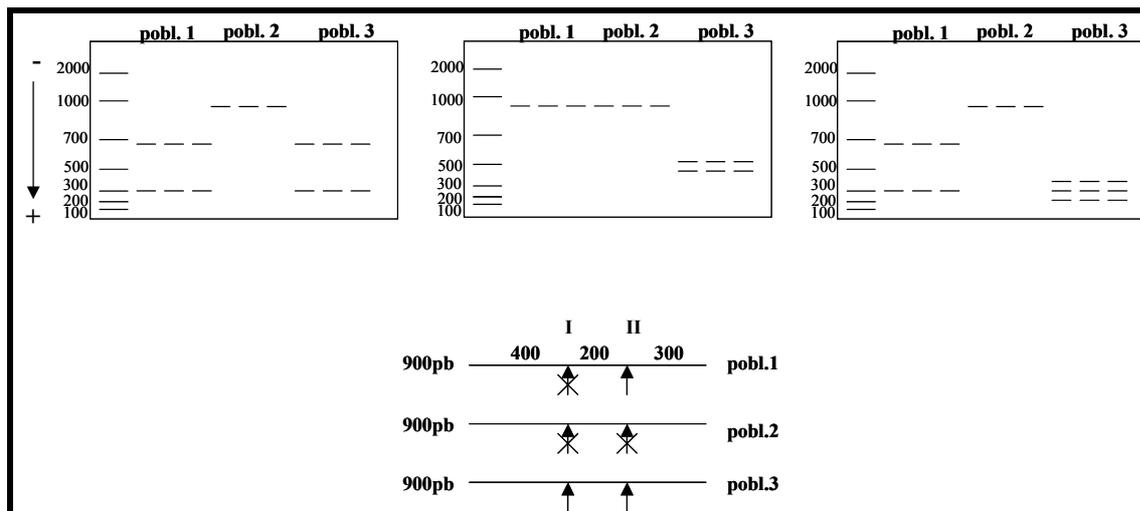


Figura 2. Ejemplo práctico (hipotético) del uso de enzimas de restricción para la caracterización genética de individuos de diferentes poblaciones. Se ilustra el caso de una secuencia de 900 pares de bases cortada por dos diferentes enzimas de restricción para individuos procedentes de tres poblaciones diferenciadas genéticamente. Los fragmentos obtenidos son analizados en un gel de agarosa, observándose que el patrón de bandas obtenido es distinto entre las diferentes poblaciones. El uso de un único enzima (I, centro; II, izquierda) no es suficiente para distinguir más que dos entidades poblacionales, mientras que el uso conjunto de los dos enzimas (I + II, derecha) permite caracterizar hasta tres grupos de individuos genéticamente diferenciados. El carril izquierdo corresponde siempre a fragmentos de DNA patrón de tamaños conocidos. En el diagrama inferior se ilustra el tamaño de los fragmentos obtenidos y los puntos de corte de los dos enzimas.

nucleótido alterado suele bastar para impedir la acción del enzima.

APLICACIONES DE LA PCR EN TAXONOMÍA Y FILOGENIA

La técnica de la PCR permite, pues, amplificar selectivamente fragmentos de DNA. Por tanto, es posible extraer y amplificar material genético de individuos pertenecientes a grupos taxonómicos distintos. Si se acierta en el gen de elección, es posible realizar un análisis comparativo de este gen a lo largo de la evolución. Así, cada grupo taxonómico debería tener un DNA con características propias por el efecto acumulativo de las mutaciones durante su evolución, y grupos diferentes presentarían secuencias diferenciables. De esta manera, es posible realizar comparaciones entre individuos muy alejados filogenéticamente, y comparar si cada grupo (filo, orden, familia, etc.) puede caracterizarse molecularmente. Si esto es así, puede entonces inferirse qué grupos son más próximos entre sí, y cuáles distan más de otros. Por tanto, la técnica puede, potencialmente, establecer qué grupos de organismos están más emparentados unos con otros.

Cabría preguntarse si la técnica es lo suficientemente robusta para diferenciar

individuos muy próximos evolutivamente, pero que no pertenezcan a lo que consideramos la unidad básica de clasificación, esto es, la especie. Numerosos estudios han abordado este problema con resultados satisfactorios, como se comentará detalladamente más adelante. Individuos de poblaciones diferentes con rasgos anatómicos o morfológicos apenas o nada distinguibles pueden pertenecer a especies diferentes, y precisamente sólo el análisis molecular de su DNA puede garantizar la observación de tales diferencias. Luego es ya un criterio subjetivo del científico el separarlas en especies diferentes o no, aunque ninguna técnica pueda nunca aclarar este punto por su subjetividad (a no ser que recurramos al concepto biológico de especie, tratando de medir el grado de aislamiento reproductivo). Sin embargo, está claro que siempre que haya una pequeña diferencia genética entre poblaciones, si ha transcurrido suficiente tiempo para que algunas mutaciones se hayan acumulado en el DNA, las técnicas de Biología Molecular pueden hacerlas evidentes. Ello puede incluso llegar a permitir separar, por ejemplo, individuos por su procedencia geográfica, aun cuando sean ciertamente de la misma especie (como de hecho sucede en humanos con ciertos análisis forenses para identificar personas

fallecidas o desaparecidas). Así, el refinamiento de estas técnicas permitirá algún día poder establecer clasificaciones inter- e intraespecíficas muy detalladas.

Una de las grandes utilidades de estas técnicas consiste en diferenciar y caracterizar especies cuando los habituales criterios anatómicos o morfológicos no son suficientes de por sí (sea por la variabilidad intraespecífica de los mismos, por la existencia de similitudes interespecíficas, por el reducido tamaño de los organismos, por la existencia de dimorfismo sexual, etc.). Precisamente, estas técnicas han sido empleadas exhaustivamente en la caracterización de organismos microscópicos o de reducido tamaño, especialmente en el ámbito de la Microbiología y la Parasitología. Entre los organismos superiores, su uso es todavía bastante más restringido, aunque seguramente se extenderá exponencialmente en los próximos años. En el siguiente apartado se comentarán algunos casos aplicados en el ámbito de la Malacología.

No obstante, siempre hay que tener en cuenta los puntos débiles de cualquier técnica, de manera que no se proceda a un uso indiscriminado de la misma en aspectos para los que no es posible o adecuado usarla. Así, debe tenerse muy en cuenta qué genes pueden o no pueden ser estudiados, y cuáles proporcionarán información adecuada para separar, por ejemplo, una familia de otra, y cuáles sólo podrán ser utilizados para separar poblaciones de la misma especie, pero no tendrán un valor taxonómico. Para ello se requerirán numerosos estudios preliminares que permitan esclarecer qué genes son más adecuados para cada uso, y si los resultados que se desprendan puedan tener o no valor taxonómico. Hay que considerar que muchos genes pueden presentar una tasa de mutación inesperadamente alta sólo en algunos grupos, pero no en otros, con lo que nunca permitirán establecer comparaciones más que a ciertas escalas, o de lo contrario se obtendrán resultados engañosos. Además, hay que considerar que se requiere una cierta cantidad de tejido, lo cual requiere a veces, aunque no siempre, el sacrificio del ejemplar de estudio (similar, por otra parte, al caso de muchos estudios anatómicos), mientras que la técnica sólo es aplicable a muestras biológicas frescas o en excelente

estado de conservación, generalmente de tejidos en alcohol.

ALGUNOS EJEMPLOS APLICADOS A LA SISTEMÁTICA DE MOLUSCOS

A continuación se resumen algunos ejemplos de la aplicación de estas técnicas en el ámbito de la Malacología. Generalmente, los genes utilizados en estos estudios son los mismos que para otros grupos taxonómicos, con especial énfasis en genes mitocondriales y el DNA ribosómico.

Biomphalaria.—El género *Biomphalaria* es uno de los más estudiados entre los moluscos mediante estas técnicas, en especial por ser vector del tremátodo *Schistosoma mansoni*, causante de la enfermedad de la esquistosomiasis, muy extendida en el ámbito tropical y subtropical. Numerosos autores han caracterizado molecularmente este género. Así, Vidigal *et al.* (2001) han analizado dos especies cubanas, *B. havanensis* y *B. obstructa*, diferenciadas por la anatomía de sus órganos genitales y morfología de la concha, aunque su correcta identificación es siempre compleja por la similitud entre ambas y por la alta variabilidad de los caracteres mencionados, además de por su pequeño tamaño. Usando PCR del DNA ribosómico y sólo 4 enzimas de restricción pueden separarse claramente los ejemplares de ambas especies, tanto cubanos como procedentes de otras localidades centroamericanas. La importancia de este estudio radica no sólo en su aplicación taxonómica, sino también en el hecho de que sólo *B. havanensis* es vector de *Schistosoma*, pero no así *B. obstructa*, con lo cual el conocimiento y caracterización de sus distribuciones geográficas permitiría institucionalizar y racionalizar programas para prevenir la entrada o extensión de la enfermedad.

Estudios similares han sido realizados con 6 especies de *Biomphalaria* de Venezuela (Caldeira *et al.*, 2000), que han permitido caracterizar correctamente estas especies, también de grandes similitudes anatómicas y morfológicas. Mediante PCR del DNA ribosómico y usando también sólo 4 enzimas de restricción pueden separarse perfectamente *B. glabrata*, *B. prona*, *B. straminea*, *B. kuhniana*, *B. havanensis* y *B. obstructa*. Precisamente, este estudio rechaza la clasificación por técnicas

morfoanatómicas de individuos de ciertas poblaciones como *B. straminea*, huésped de *Schistosoma*, pues su análisis molecular confirma que en realidad se trataría de ejemplares de *B. kuhniiana*, refractaria a la infección.

Otros estudios muy parecidos han sido realizados por los mismo autores sobre las poblaciones de *Biomphalaria* de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Spatz *et al.*, 2000), utilizando además los perfiles generados por los enzimas de restricción para estudiar similitud genética entre tres especies distintas de este género (*B. oligoza*, *B. peregrina* y *B. orbigny*).

Bulinus.—Otro género de gasterópodos continentales estudiado por la técnica de la PCR es el género *Bulinus*, otro Planorbidae transmisor del mismo trematodo que *Biomphalaria*. De forma similar a lo comentado para este último género, el análisis del DNA ribosómico ha permitido revisar la taxonomía del grupo cuando los criterios de diferenciación basados en la microescultura de la concha y la apariencia y proporciones de los órganos reproductivos masculinos no eran suficientes de por sí. Así, por ejemplo, entre las poblaciones de *Bulinus* cerca del lago Victoria (Kenya) se distinguían tradicionalmente tres especies (*B. africanus*, *B. nasutus* y *B. globosus*) en base a sus características anatómicas y morfológicas, aunque con muchas aparentes formas intermedias (Raahauge & Kristensen, 2000). Igualmente, estudios biométricos habían diferenciado hasta cinco posibles especies en lugar de tres. Sin embargo, el análisis del DNA ribosómico, posteriormente confirmado por el gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I, demuestra que en realidad *B. africanus* y *B. nasutus* serían la misma especie, bien diferenciada de *B. globosus*.

Lymnaea.—Otro elegante estudio sobre moluscos transmisores de enfermedades es el de diferentes especies europeas de *Lymnaea* (Bargues & Mas-Coma, 1997). Este género presenta una gran importancia parasitológica, al ser huésped intermediario de los tremátodos *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Sin embargo, la taxonomía del género es muy compleja, tanto a nivel de especies, muy difíciles de caracterizar por la gran uniformidad interespecífica anatómica y de la forma de su concha, como a nivel supraespecífico,

con disparidad de clasificaciones, desde un solo género y subgénero a varios géneros y subgéneros. El análisis del DNA ribosómico ha permitido a estos autores resolver el problema de su clasificación, imposible por métodos tradicionales, para subdividirlo en cuatro subgéneros distintos: *Radix*, *Galba*, *Leptolymnaea* y *Lymnaea*. De estos, sólo dos tendrían una verdadera importancia parasitológica, pues *F. hepatica* usa como huésped *L. (Galba) truncatula*, y excepcionalmente también *L. (Leptolymnaea) glabra*.

Sistemática de bivalvos.—Diversos estudios han tratado de abordar el origen y evolución de bivalvos a partir del análisis del DNA ribosómico 18S (Steiner & Muller, 1996; Adamkewicz *et al.*, 1997). Cabe destacar que estos estudios han permitido establecer una nueva, aunque muy provisional, clasificación de este grupo, que choca parcialmente con las establecidas previamente por criterios anatómicos y morfológicos. Así, se sugiere que Palaeoheterodonta y Heterodonta serían grupos que habrían surgido al mismo tiempo dentro del grupo Pteriomorpha, contrariamente a lo que tradicionalmente se había venido considerando (Adamkewicz *et al.*, 1997). No obstante, existen algunas lagunas en esta nueva clasificación, lo que demuestra que estas técnicas están todavía en sus primeros estados de desarrollo, y que no puede hacerse un uso indiscriminado de las mismas, por cuanto existen complicados mecanismos evolutivos aún poco comprendidos que dan lugar a tasas de mutación anómalas en diferentes genes o en diferentes grupos de organismos. Precisamente, ciertos autores (Steiner & Muller, 1996) sugieren que las mutaciones en el gen ribosómico 18S se habrían acumulado durante un periodo relativamente corto de 10 millones de años, durante la explosión cámbrica en la que se separaron muchos de los grupos de bivalvos actuales. Por tanto, en los siguientes 550 millones de años se habrían acumulado, si bien a menor velocidad, muchas otras mutaciones que habrían generado un "ruido de fondo" que habría atenuado sensiblemente las diferencias entre grupos en este gen concreto.

Cowry Genetic Database Project.—Uno de los grupos de moluscos más apreciados por los coleccionistas y abordados por los estudiosos de la Malacología es el de los cipreidos

(Cypraeidae). Como consecuencia, el estudio de esta familia se ha incrementado de forma extraordinaria durante las últimas décadas, con el descubrimiento de un gran número de especies y subespecies, así como de numerosas formas geográficas diferentes de difícil asignación sistemática. Sin embargo, quedan muchas dudas acerca de si las clasificaciones empleadas son adecuadas o no, dado que se basan exclusivamente en caracteres morfológicos, muchas veces exclusivamente de la concha, además de la rádula. Es por ello que diferentes científicos han emprendido la tarea de revisar su clasificación mediante el uso de técnicas de biología molecular, mediante el programa conocido por *Cowry Genetic Database Project*, que puede ser consultado a través de su página web, y abierto a la colaboración de coleccionistas de todo el mundo. Actualmente en fase de elaboración, y basado en genes mitocondriales, este estudio podría aportar nueva luz sobre algunos grupos muy poco conocidos de cipreidos, y también sobre aquellos que presentan una gran variabilidad morfológica y presumiblemente genética, como el género *Zoila*, endémico de Australia. Aunque los resultados de este estudio aún no se han publicado, algunos autores sugieren que confirmarían la validez de numerosas nuevas especies (Lorenz, 2002).

Conus y Conotoxinas.—Un intento de clasificación de las especies de *Conus* a partir del análisis genético del DNA mitocondrial 16S ha sido llevado a cabo por Espiritu *et al.* (2001). Estos autores han estudiado más de 80 especies de *Conus*, obteniendo una clasificación provisional en clados, que además confirma el origen monofilético del grupo, y por tanto justifica la no subdivisión en diferentes géneros. También han obtenido una estimación del tiempo geológico en que habrían divergido los diferentes grupos obtenidos, estimación calibrada no obstante con ayuda del registro fósil. Así, el análisis del DNA mitocondrial 16S y la información paleontológica permiten predecir una tasa de sustitución de nucleótidos de entre 0,24 y 0,40% por millón de años, lo que permitiría datar los siguientes eventos:

- Separación de cónidos y túrridos hace 56 Ma (millones de años antes del presente).
- Primera radiación del género *Conus* hace 46 Ma (Eoceno), seguida por una etapa de contracción de la diversidad

del género coincidiendo con un clima más frío durante el Oligoceno.

- Separación de especies generalistas de *Conus* del Pacífico Este de especies indopacíficas del género hace unos 40 Ma.
- Separación de especies de *Conus* piscívoras y moluscívoras (indopacíficas) hace unos 23 Ma (Mioceno).
- Especiación final de especies de *Conus* piscívoras indopacíficas entre 16 y 5 Ma.

Estos análisis moleculares sugerirían que *C. memiae*, *C. californicus*, *C. acutangulus* y *C. distans* se habrían originado durante la primera etapa de especiación, y por tanto serían más "primitivos", mientras que el resto de especies analizadas se podrían clasificar en 17 grupos diferenciados, aunque con algunas especies difíciles de asignar a un grupo u otro. Cabe remarcar que los resultados obtenidos sugieren que la estrategia piscívora habría aparecido al menos en dos episodios evolutivos diferenciados, uno para el grupo de *Conus* del Pacífico oriental y otro para los indopacíficos.

Estos mismos autores y otros (Conticello *et al.*, 2001) han intentado abordar una aproximación única para el caso de *Conus*, que es el estudio molecular de sus toxinas. Los ejemplares del género *Conus* producen una enorme variedad de toxinas como armas ofensivas para la captura de sus presas (López, 2001), estimándose que cada especie tiene la potencialidad de sintetizar hasta 100 toxinas diferenciadas molecularmente, lo que multiplicado por el número de especies de *Conus* conocidas resulta en unas 50.000 moléculas distintas en todo el género. Estas toxinas presentan parte de la secuencia "hiperconservada" (en especial los residuos de cisteína), mientras que por el contrario, el resto de la toxina está "hipermutada", es decir, presenta un número de sustituciones anormalmente alto si se compara con otros genes. Según la mayoría de autores, esta alta frecuencia de mutaciones sería consecuencia de una estrategia evolutiva singular, por la que fenómenos de duplicación, recombinación e hipermutación por una polimerasa tendente a cometer errores (*error-prone*) conferirían un valor adaptativo al depredador (Espiritu *et al.*, 2001; Conticello

et al., 2001). Es remarcable que este fenómeno es muy similar al caso de las inmunoglobulinas, y a moléculas bacterianas involucradas en fenómenos de interacciones interespecíficas (antígenos de superficie, etc.).

La construcción de árboles filogenéticos a partir de las secuencias de las conotoxinas no ha permitido obtener resultados clarificadores, precisamente por la diferente tasa de mutación en las diferentes porciones del gen comentadas anteriormente, aunque sí ha permitido hipotetizar los mecanismos evolutivos que las habrían originado. Así, la selección habría actuado por diferentes causas sobre la especialización por la presa y la necesidad de paralizarla muy rápidamente, en especial en hábitats bentónicos tropicales de altísima biodiversidad y competencia trófica. Esto habría favorecido la duplicación génica y la hipermutación de parte de la secuencia, así como el hecho de que sólo algunas conotoxinas se expresen en altos niveles en el veneno. Precisamente, el hecho de que la toxina sólo se exprese en el tracto glandular del veneno hace que la duplicación y la hipermutación, de otra manera deletéreas y negativamente seleccionadas para la mayoría de genes, constituyan más una ventaja que un inconveniente evolutivo.

En resumen, la altísima variabilidad de las conotoxinas se explicaría por su ventaja en conferir mayor adaptabilidad en un medio cambiante, facilitando una alta especialización por la presa y de esta manera una mayor tasa de especiación, que explicaría el altísimo número de especies del género *Conus* (el mayor entre los invertebrados marinos). De hecho, la generación de nuevas toxinas sería en sí misma un mecanismo de especiación, pues podría facilitar la colonización de nuevos hábitats o eliminar la competencia por la presa con la especie parental, bien por centrarse en nuevas presas o bien por obtener una mayor eficacia en la paralización y captura de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMKEWICZ, S.L.; HARASEWYCH, M.G.; BLAKE, J.; SAUDEK, D. & BULK, C.J. (1997). A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 619-629.

ALBA, M.A.; MAS, M. & TARRUELLA, A. (2001). Análisis biométrico de poblaciones de *Trivia arctica* y *Trivia monacha* de las costas de la Península Ibérica. *Spira*, 1(1): 13-24.

BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S. (1997). Phylogenetic analysis of Lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 569-577.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; MATINELLA, L.; SIMPSON, A.J.G. & CARVALHO, O.S. (2000). Identification of *Planorbids* from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 171-177.

CONTICELLO, S.G.; GILAD, Y.; AVIDAN, N.; BEN-ASHER, E.; LEVY, Z. & FAIZILBER, M. (2001). Mechanisms for evolving hypervariability: the case of conopeptides. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 120-131.

ESPIRITU, D.J.D.; WATKINS, M.; DIA-MONGE, V.; CARTIER, G.E.; CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (2001). Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, 39: 1899-1916.

FLORIDA MUSEUM OF NATURAL HISTORY. *Cowry Genomic Database Project (C.G.D.P.)*. <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries>.

GUERRERO, R.; PEDROS-ALIO, C.; ESTEVE, I.; CHASE, D. & MARGULIS, L. (1986). Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2138-2142.

LÓPEZ SORIANO, J. (2002). Estudio comparativo de dos poblaciones de *Cerithium vulgatum* de las costas catalanas. *Spira*, 1(2): 15-20.

LÓPEZ, J. (2001). Conotoxinas. *Spira* 1(1): 7-11.

LORENZ, F. (2002). *New Worldwide Cowries*. ConchBooks, Hackenheim (Alemania).

MARGULIS, L. & BERMUDEZ, D. (1981). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cells symbiosis theory. *Symbiosis*, 1: 101-24.

RAAHAUGE, P. & KRISTENSEN, T.T. (2000). A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica*, 75: 85-94.

- SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SILVA, M.C.A.; CAPPA, S.M.G. & CARVALHO, O.S. (2000). Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 807-814.
- STEINER, G. & MULLER, M. (1996). What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? *J. Mol. Evol.*, 43: 58-70.
- VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G. & CARVALHO, O.S. (2001). Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 661-665.