

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *AUSTRODIPLOSTOMUM COMPACTUM* (PLATYHELMINTHES, DIGENEA)

Bárbara Scorsim¹, Aparecida de Fátima Cracco², Alessandra Valéria de Oliveira³, Ricardo Massato Takemoto⁴

¹ Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá – UEM. barbarascorsim@gmail.com

² Programa de pós-graduação em Biologia Comparada, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá – UEM. cidacracco@hotmail.com

³ Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA, Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá – UEM. avoliveira@uem.br

⁴ Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA, Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Programa de pós-graduação em Biologia Comparada, UEM. takemotorm@nupelia.uem.br

RESUMO

Austrodiplostomum spp. (Platyhelminthes: Digenea) são endoparasitas de ampla distribuição geográfica na América do Sul e em seu estágio larval parasitam olhos e cérebros de uma grande variedade de peixes, podendo causar danos nestes órgãos. As metacercárias de *Austrodiplostomum* sp. apresentam estruturas morfológicas em fase de desenvolvimento, dificultando a visualização e a identificação das espécies. Assim, ferramentas moleculares podem auxiliar na identificação deste parasita, em estágios larvais. O objetivo desta pesquisa foi utilizar o marcador COI para identificar formas larvais de *Austrodiplostomum* sp. (Digenea: Diplostomoidea) de quatro espécies do gênero *Hypostomus* provenientes do rio Ivaí. As metacercárias apresentaram alta similaridade genética com *Austrodiplostomum compactum* (= *A. ostrowskiae*), indicando que esses organismos pertencem a essa espécie.

1 INTRODUÇÃO

Os trematódeos digenéticos pertencentes ao filo Platyhelminthes, como o gênero *Austrodiplostomum* Szidat & Nani, 1951 (Digenea: Diplostomidae), podem parasitar três hospedeiros durante seu ciclo de vida. Ao adquirirem forma livre nadante, as cercárias abandonam seu primeiro hospedeiro e procuram um peixe suscetível para infectar e evoluírem para metacercárias, forma encontrada nos olhos, cérebro e músculos (encistadas) dos hospedeiros (TRAVASSOS *et al.*, 1928, TAKEMOTO *et al.*, 2009). São quatro as espécies válidas de *Austrodiplostomum* nas Américas, *Austrodiplostomum* sp1. e *Austrodiplostomum* sp2., relatadas no México, *A. mordax* no sul da América do Sul (DE NÚÑEZ, 2017) e *A. compactum*, espécie amplamente distribuída em países como os Estados Unidos, México, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Venezuela, Peru e Brasil (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016, SERENO-URIBE *et al.*, 2019). *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 é considerado sinônimo de *A. compactum* (DE NÚÑEZ, 2017).

No estágio larval, parasitas digenéticos apresentam estruturas morfológicas em fase de desenvolvimento, o que torna difícil a visualização das características morfológicas importantes para identificação das espécies. Nestes casos, Onaca *et al.* (2020) sugerem a utilização de ferramentas moleculares para auxiliar no processo de identificação. Uma das ferramentas considerada eficaz para identificação de digenéticos é o marcador molecular COI. Moszczyńska *et al.* (2009) afirmaram que as sequências de COI apresentaram uma boa resolução em nível de espécie, concluindo, dessa forma, que essa região é um alvo prático para digenéticos. O mesmo ocorreu no estudo realizado por Locke *et al.* (2010), onde sequências de COI foram adequadas para discriminação de espécies de *Diplostomum* spp.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi utilizar o marcador COI para identificar formas larvais de *Austrodiplostomum* sp. (Digenea: Diplostomoidea) de quatro espécies pertencentes ao gênero *Hypostomus* provenientes do rio Ivaí.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para extração de DNA (n=7) total dos parasitas foi utilizado o kit DNeasy® Blood & Tissue de acordo com as instruções do fabricante. O gene da subunidade I da Citocromo C Oxidase (COI) foi parcialmente amplificado. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% e purificados seguindo o protocolo de Rosenthal *et al.* (1993). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento foi realizado na ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o sequenciador automático ABI-3500.

As sequências foram editadas e alinhadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 1999), respectivamente. A identificação das espécies dos parasitas foi realizada através de comparação com dados prévios disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Foram selecionadas e adicionadas às análises moleculares sequências de diferentes espécies de *Austrodiplostomum*, disponíveis no GenBank. O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado foi HKY+G, a partir do critério de informação bayesiano (BIC), usando o programa jModelTest 2 (DARRIBA *et al.*, 2012). Valores de distância genética Kimura-2-parâmetros (K2P) foram calculados usando o programa MEGA 7.0. Para tanto foram formados grupos de indivíduos de acordo com a espécie identificada no banco de dados.

A árvore gênica de máxima verossimilhança foi construída usando o programa RAxML Black Box (KOZLOV *et al.*, 2019). *Hysteromorpha triloba* foi usado como *outgroup* (SOUZA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sete sequências parciais do gene COI (405 pb) foram obtidas após alinhamento e edição, totalizando três haplótipos distintos. Após comparar as sequências obtidas com as sequências genéticas disponíveis no GenBank, obtivemos valores entre 99,01% a 100% de similaridade com *Austrodiplostomum compactum* (distância K2P de 0,1% e 0,4%) e *Austrodiplostomum ostrowskiae* (distância K2P de 0,2% e 0,4%), respectivamente. Em relação às demais espécies de *Austrodiplostomum* disponíveis no GenBank, os valores da distância genética variaram de 0,101 a 0,115.

A árvore genética (Figura 1) mostra que as sequências de *Austrodiplostomum mordax*, *Austrodiplostomum* sp.1, *Austrodiplostomum* sp.2 apresentaram diferenças nucleotídicas importantes em relação as sequências obtidas nesse estudo, estando distribuídas em clados distintos. *A. compactum*, *A. ostrowskiae* e as sequências do rio Ivaí se alocaram em um único clado.

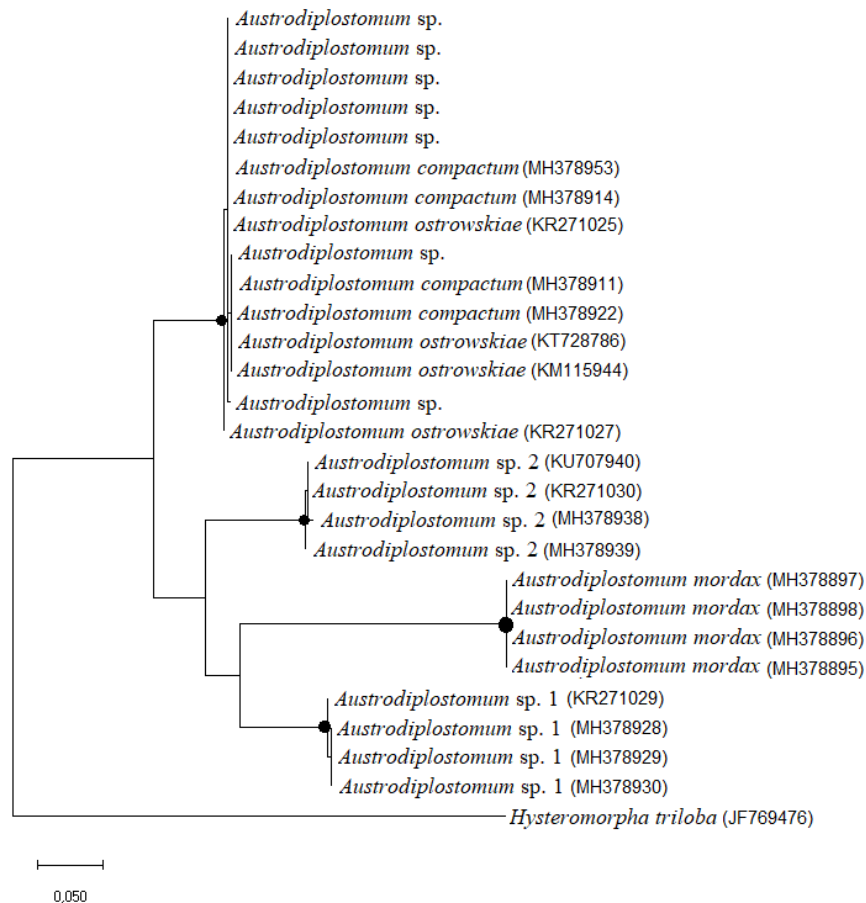


Figura 1: Árvore gênica de máxima verossimilhança construída a partir de sequências do gene COI de *Austrodiplostomum*. *Hysteroforma triloba* foi usado como *outgroup*. Valores de suporte acima de 85 estão representados por círculos.

As análises das sequências parciais do gene COI e as relações observadas na árvore gênica de *Austrodiplostomum* sp. permitem afirmar que o marcador utilizado foi útil para a identificação das metacercárias em nível de espécie, assim como relatado por Moszczyńska et al. (2009) e De Núñez (2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo contribuem para o conhecimento da biodiversidade do rio Ivaí, da distribuição geográfica de *Austrodiplostomum* e de novos hospedeiros endêmicos da região estudada. Devido a presença de metacercárias, o uso de ferramentas moleculares é importante, visto a difícil identificação dos estágios iniciais. Além disso, provavelmente, o rio Ivaí abriga moluscos hospedeiros intermediários deste parasita, sendo necessário a continuidade de estudos com o intuito de monitorar a ocorrência deste parasita.

REFERÊNCIAS

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DAOLLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DE NÚÑEZ, M. O. Redescription of *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) from its Type Host and Locality in Venezuela, and of *Austrodiplostomum mordax* from Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 103, p. 497-505, 2017.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

KOZLOV, A.; DARRIBA, D.; FLOURI, T.; MOREL, B.; STAMATAKIS, A. RAxML-NG: a fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. **Bioinformatics**, 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

LOCKE, S.A.; MCLAUGHLIN, J.D.; LAPIERRE, A.R.; JOHNSON, P.T.; MARCOGLIESE, D.J. Linking Larvae and Adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysterosompha triloba*, and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) Using Molecular Data. **Journal of Parasitology** v. 97, n. 5, p. 846–851, 2010.

MOSZCZYNSKA, A.; LOCKE, S.A.; MCLAUGHLIN, J. D.; MARCOGLIESE, D. J.; CREASE, T.J. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 75–82, 2009.

ONACA, F.M.T.; DA GRAÇA, R.J.; FABRIN, T.M.C.; TAKEMOTO, R.M.; OLIVEIRA, A.V. Molecular characterization and identification of digenetic larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. **Journal of helminthology**, v. 94, p. 1-8, 2020.

ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 173174, 1993.

SERENO-URIBE, A.L.; GÓMEZ, L.A.; DE NÚÑEZ, M.O.; DE LEÓN, G.P.P.; GARCÍA-VARELA, M. Assessing the taxonomic validity of *Austrodiplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) through nuclear and mitochondrial data. **Journal of Parasitology**, v. 105, p. 102-112, 2019.

SOUZA, G.T.R. **Diversidade, especificidade e estrutura genética populacional de parasitos diplostomídeos em peixes dulcícolas neotropicais**. Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) -Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, 2014.

TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C.; LIZAMA, M.A.P.; LACERDA, A.C.F.; YAMADA, F.H.; MOREIRA, L.H.A.; BELLAY, S. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 691-705, 2009.

TRAVASSOS, L.; ARTIGAS, P.; PEREIRA, C. Fauna helminthologica dos peixes de água doce do Brasil. **Archivos do Instituto Biológico**, v. 1, p. 5-68, 1928.