

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DIGENÉTICOS PARASITAS DE GASTRÓPODES (MOLLUSCA) DO BAIXO IVAÍ, PARANÁ, BRASIL

Mayara Destro Passere<sup>1</sup>, Rodrigo Junio da Graça<sup>2</sup>, Ricardo Massato Takemoto<sup>3</sup>,  
Alessandra Valéria de Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. Bolsista CAPES. mayarapassere@gmail.com

<sup>2</sup>Doutor, Laboratório de Ictioparasitologia – UEM, Maringá/PR. rjrodrigo@gmail.com

<sup>3</sup>Doutor, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. takemotom@nupelia.uem.br

<sup>4</sup>Orientadora. 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 – PEA, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. avoliveira@uem.br

### RESUMO

Tiarídeos são gastrópodes encontrados em ambientes de água doce lênticos e lóticos. Esses gastrópodes atuam como hospedeiros intermediários de várias espécies de digenéticos, parasitas que necessitam de pelo menos dois hospedeiros para tornarem-se adultos. É importante considerar que existem dificuldades para a identificação desses digenéticos em determinadas fases do ciclo de vida, visto que as larvas possuem um tamanho reduzido e poucas características morfológicas para diagnóstico. O presente estudo tem como objetivo caracterizar molecularmente os digenéticos encontrados em gastrópodes do rio Ivaí utilizando o marcador molecular *COI*. Considerando que não há registros na literatura de estudos envolvendo parasitas e hospedeiros intermediários no rio Ivaí, este estudo torna-se o pioneiro a respeito dessas relações. Foram coletados 80 espécimes de gastrópodes e estes tiveram tecido acondicionado para extração de DNA, assim como os parasitas encontrados. Dos 80 espécimes, 21 encontravam-se parasitados. Quanto aos parasitas, foram encontrados 16 morfotipos. O DNA dos gastrópodes e digenéticos foi amplificado e sequenciado. Para os moluscos foram obtidas 8 sequências, todas alinhadas pela ferramenta BLAST com *Aylacostoma chloroticum*. Quanto aos parasitas, foram obtidas 16 sequências, todavia, não foi possível confirmar a identidade dos digenéticos, visto que a similaridade encontrada entre eles e sequências depositadas no GenBank foi baixa. Os cálculos de distância genética e a árvore gênica construída indicam que ao menos cinco espécies diferentes das depositadas no GenBank estejam presentes na região. Espera-se que a utilização de outros marcadores, como 28S, seja útil para elucidar com mais precisão as espécies de digenéticos encontradas no rio Ivaí.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aylacostoma*; *COI*; Digenea; Estágio larval; Thiaridae.

## 1 INTRODUÇÃO

Thiaridae Gill, 1871 são gastrópodes pantropicais com distribuição desde a América do Sul até Austrália. As espécies pertencentes a esse grupo são encontradas, em sua maioria, em ambientes lênticos e lóticos de água doce (GLAUBRECHT *et al.*, 2009). Os tiarídeos atuam como hospedeiros intermediários de diversas espécies de trematódeos, que utilizam os gastrópodes como um primeiro hospedeiro intermediário, no qual ocorre a reprodução assexuada (SCHOLZ *et al.*, 2000). Esses parasitas possuem um ciclo de vida complexo, sendo necessário pelo menos dois hospedeiros para se tornarem adultos (PAVANELLI *et al.*, 2002).

Considerando as dificuldades para a identificação de espécies de digenéticos em determinadas fases do ciclo de vida, devido ao tamanho reduzido das larvas e poucas características morfológicas para diagnóstico, a biologia molecular torna-se uma ferramenta de extrema utilidade. Embora os ciclos de vida de alguns grupos de trematódeos sejam conhecidos, fases larvais de numerosos táxons ainda não foram totalmente elucidadas (SCHOLZ *et al.*, 2000). Além disso, a difícil observação de caracteres diagnósticos nos estágios larvais acarreta numa identificação pouco precisa ou equivocada dos trematódeos e, dessa maneira, as técnicas moleculares acabam sendo importantes (LOCKE *et al.*, 2015).

O presente estudo tem como objetivo realizar a identificação e caracterização molecular dos digenéticos encontrados em gastrópodes provenientes do baixo rio Ivaí utilizando marcadores moleculares ribossômicos e mitocondriais. Este é o primeiro estudo envolvendo parasitas e hospedeiros intermediários na região.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta dos gastrópodes foi realizada com o auxílio de puçás na porção do baixo rio Ivaí (n = 75) e em uma lagoa temporária (n = 5) formada próxima ao leito do rio, no município de Doutor Camargo, Paraná. Durante a triagem para análise parasitológica, foi retirada a glândula digestiva dos gastrópodes para extrair os parasitas existentes. As larvas foram separadas de acordo com o seu morfotipo e fotografadas. Para a extração de DNA, os gastrópodes coletados tiveram seus tecidos armazenados em álcool absoluto e os parasitas foram acondicionados individualmente em tubos de 1,5 mL com água Milli-Q.

A extração do DNA dos gastrópodes foi feita utilizando o kit DNA A1125 Wizard Genomic DNA Purification da Promega® e para a extração do DNA dos parasitas o kit utilizado foi em colunas DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN®, ambos seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A reação para a amplificação do DNA dos gastrópodes foi realizada com 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/μL, Invitrogen), Tris-KCL (20 mM Tris-HCl pH 8.4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 4 μM de cada *primer*, DNA molde (10 ng) e água Milli-Q para um volume final de 25 μL. A reação para a amplificação do DNA dos parasitas continha 1 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/μL, Invitrogen) e a mesma concentração dos demais reagentes mencionadas anteriormente, com um volume final de 23 μL. Para a amplificação do DNA dos parasitas e dos gastrópodes foram utilizados *primers* específicos para a região *COI*. Os produtos obtidos da amplificação foram purificados e sequenciados.

Para a análises dos dados, os eletroferogramas foram visualizados e editados pelos programas BioEdit e MEGA7, respectivamente. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa MEGA7 utilizando o algoritmo CLUSTAL W. A ferramenta BLAST foi utilizada para a comparação das sequências obtidas com sequências depositadas no GenBank. O programa MEGA7 foi utilizado para realizar o cálculo de distância genética pelo método Kimura-2-parâmetros e as reconstruções filogenéticas utilizando o método Neighbor-Joining. Sequências disponibilizadas no GenBank foram adicionadas às análises para comparação com as sequências obtidas dos espécimes do rio Ivaí.

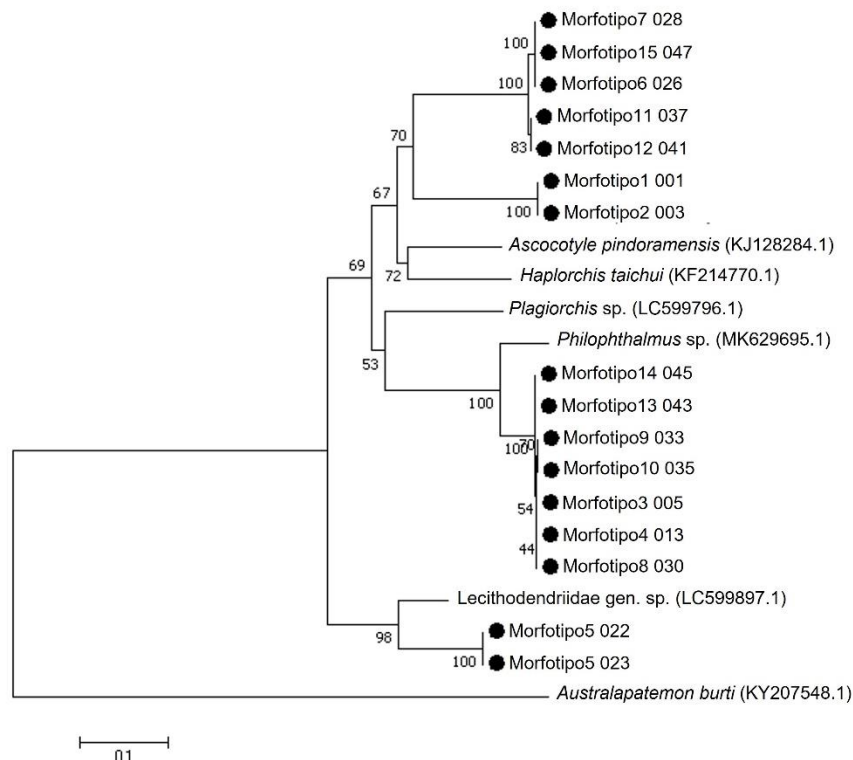
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisados 80 espécimes de gastrópodes, dos quais 21 estavam parasitados por estágios larvais de digenéticos (26,25%). Foram sequenciados 8 espécimes de gastrópodes, desses, seis estavam parasitados e dois não parasitados. Com base nas sequências obtidas e utilizando a ferramenta BLAST, os moluscos foram identificados como *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954, com porcentagens de identidade variando de 94,63 a 100%, com exceção do espécime 20, o qual pode ser uma espécie diferente das demais.

Quatro haplótipos foram obtidos para as sequências dos gastrópodes do rio Ivaí, com valores de distância genética de sequências depositadas no GenBank variando de 0 a 0,5%, exceto o espécime 20, visto que apresentou uma distância média de 5,8% com *A. chloroticum*. Corroborando os valores de distância genética encontrados, na árvore gênica todos os moluscos ficaram posicionados em um grande grupo formado por *A. chloroticum*, confirmando novamente a identificação desses animais, com exceção do molusco 20 que ficou separado dos demais. Não há registros na literatura da ocorrência de *A. chloroticum* na bacia do rio Ivaí.

Os parasitas obtidos foram separados em 16 morfotipos e foram obtidas 16 sequências de *COI*, correspondentes a 15 morfotipos. As cinco espécies disponíveis no GenBank mais próximas às sequências obtidas foram: *Ascocotyle pindoramensis* Travassos, 1929, *Plagiorchis* sp., *Philophthalmus* sp., Lecithodendriidae gen. sp. e *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924), com valores de similaridade variando de 78,37 a 91,34%. Todos os valores de similaridade encontrados são considerados baixos, porém o grupo mais próximo foi *Philophthalmus* sp.

Foram encontrados 7 haplótipos entre as sequências dos parasitas do rio Ivaí. A distância genética entre os 15 morfotipos provenientes dessa região variou de 0 a 39% e em relação às espécies do GenBank os valores de distância chegaram a 44,8%. Na árvore gênica, observou-se que os morfotipos 6, 7 e 15 formaram um clado irmão ao clado formado pelos morfotipos 11 e 12. O clado formado pelos morfotipos 1 e 2 formaram um clado irmão do grande clado composto pelos morfotipos citados anteriormente. Já os morfotipos 3, 4, 8, 9, 10, 13 e 14 formaram um clado que é grupo irmão de *Philophthalmus* sp. O clado formado pelo morfotipo 5 é irmão de Lecithodendriidae gen. sp. (Figura 1).



**Figura 1:** Árvore gênica construída a partir de sequências de DNA de digenéticos, utilizando o marcador molecular *COI*. As sequências marcadas com um círculo preenchido são as obtidas neste estudo. *Australapatemon burti* foi utilizado como grupo externo.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante considerar que nos gastrópodes analisados estão presentes ao menos cinco espécies de parasitas, diferentes das encontradas em bancos de dados genéticos. Além disso, este trabalho torna-se o primeiro a registrar esse gastrópode na região do rio Ivaí utilizando técnicas de identificação molecular assim como é o primeiro registro dos estágios larvais de digenéticos nessa localidade, para esses hospedeiros intermediários. É recomendado a utilização de pelo menos dois marcadores moleculares em estudos envolvendo identificação molecular, combinando marcadores mitocondriais (*COI*) e ribossomais (28S). Dessa maneira, ainda serão realizadas análises envolvendo o gene 28S

e espera-se que seja possível elucidar com mais precisão as espécies de parasitas encontradas nos gastrópodes do rio Ivaí.

## REFERÊNCIAS

GLAUBRECHT, M.; BRINKMANN, N.; PÖPPE, J. Diversity and disparity “down under”: Systematics, biogeography and reproduction modes of the “marsupial” freshwater Thiaridae (Caenogastropoda, Cerithioidea). *In*: Australia. **Zoosystematics and Evolution**, v. 85, p. 199-275, 2009.

LOCKE, S. A. *et al.* Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 841-855, 2015.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes**: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: EDUEM, 2002.

SCHOLZ, T. *et al.* Larval stages of trematodes in Mexican freshwater mollusc: a review of present state and methodology for future research. *In*: SALGADO-MALDONADO, G.; GARCÍA-ALDRETE, A. N.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. (eds.). **Metazoan parasites in the neotropic**: a systematic and ecological perspective. México: Instituto de Biología, UNAM p. 77-100, 2000.