

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTÁGIOS LARVAIS DE DIPLOSTOMÍDEOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MOLUSCOS DA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ

Flávia Mayumi Tanaka Onaca (PIC /UEM), Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, Ricardo Massato Takemoto, Rodrigo Junio da Graça (Co-orientador), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora), e-mail: avoliveira@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia,
Genética e Biologia Celular/Maringá, PR.

Genética, Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: COI, Digenea, 28S.

Resumo:

Na planície de inundação do alto rio Paraná pouco se sabe sobre as espécies de moluscos que são utilizadas como hospedeiros de digenéticos, parasitos que possuem um complexo ciclo de vida. Devido ao pequeno número de caracteres morfológicos diagnósticos dos estágios larvais (cercárias e metacercárias) destes parasitos, é de fundamental importância a utilização de técnicas de biologia molecular para a distinção das espécies. Desta forma, este trabalho teve como objetivo utilizar os marcadores moleculares COI e 28S para separar as espécies destes parasitos, assim como elucidar seu ciclo de vida, apontando as espécies de moluscos utilizadas como hospedeiros intermediários. Os moluscos coletados foram triados para a obtenção dos parasitos. Os parasitos encontrados tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado. As sequências foram editadas, alinhadas e então comparadas aos dados do GenBank. Foram analisados 103 espécimes de moluscos de diferentes espécies *Aylacostoma chloroticum*, *Pomacea canaliculata* e *P. scalaris*. Apenas as duas primeiras espécies estavam parasitadas por larvas de digenéticos. *Aylacostoma chloroticum* apresentou uma alta prevalência de parasitismo 73,08%. Estes moluscos estavam parasitados por três morfotipos de cercárias, identificados molecularmente como *Paralecithodendrium parvouterus*, *Pseudosellacotyta lutzii* e *Philophthalmus gralii*. Já *P. canaliculata* apresentou apenas um morfotipo de cercária e prevalência de 3,6%. Embora a identificação específica das espécies de digenéticos ainda não seja conclusiva, é possível afirmar que *A. chloroticum* um molusco nativo na região, seja um importante hospedeiro intermediário no ciclo de vida de pelo menos três espécies de digenéticos que tem como hospedeiros definitivos peixes, aves e mamíferos.

Introdução

A planície de inundação do alto rio Paraná é o último trecho não represado do rio Paraná em território brasileiro, possuindo uma grande diversidade biológica e de extrema importância para a preservação de diversas espécies. Devido à grande variedade de habitats aquáticos e espécies de peixes e aves na região, esta é favorável à ocorrência de uma grande diversidade de parasitos e pela manutenção de seu ciclo de vida (SOUZA et al., 2008; TAKEMOTO et al., 2009). Dentre os parasitos mais comuns registrados no local encontram-se os digenéticos (Platyhelminthes: Trematoda), organismos globalmente distribuídos (SOUZA et al., 2008; TAKEMOTO et al., 2009). Entre os digenéticos mais frequentes estão os da superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886, comumente denominados diplostomídeos. O ciclo de vida destes parasitos é complexo, envolvendo três hospedeiros: um gastrópode e um peixe como primeiro e segundo hospedeiro intermediário e vertebrados como hospedeiros definitivos (ROSSER et al., 2016).

Apesar do ciclo de vida de alguns digenéticos já serem elucidados, os estágios larvais de muitas *taxa* ainda não são completamente conhecidos e não se sabe quem são as espécies de moluscos que atuam como primeiros hospedeiros intermediários na região de estudo. Entre os gêneros mais frequentes de moluscos encontrados na planície de inundação do alto rio Paraná destacam-se *Pomacea* e *Aylacostoma* (SOUZA et al., 2008).

Para a correta identificação específica dos estágios larvais (cercárias, metacercárias) destes parasitos e esclarecimento de seu ciclo de vida é fundamental a utilização de técnicas de biologia molecular, já que estas fases possuem um pequeno número de caracteres morfológicos diagnósticos (LOCKE et al., 2015). Uma ferramenta comumente utilizada para a distinção de espécies de Platyhelminthes são os genes mitocondriais, mais especificamente as sequências da região do gene Citocromo Oxidase c I (COI), e os genes nucleares ribossômicos, como o do 28S, que podem ser muito úteis como marcadores moleculares (MOSZCZYNSKA et al., 2009). Neste sentido o presente estudo teve como objetivo identificar molecularmente as espécies de digenéticos encontrados em moluscos na região estudada.

Materiais e métodos

Os moluscos foram coletados no segundo semestre de 2017 e primeiro semestre de 2018, em ressacos e lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná. A identificação taxonômica dos moluscos coletados foi realizada com o auxílio de especialistas do Laboratório de Zoobentos do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA/UEM. Para a triagem dos parasitos, removeu-se o corpo dos moluscos de dentro de sua concha e realizou-se a análise com auxílio de um estereomicroscópio, em especial à glândula digestiva, órgão comumente utilizado como sítio de infecção. Os parasitos encontrados foram isolados em tubos *ependorf* 1,5mL e armazenados congelados com água *Milli-Q*.

Duas amostras de cada morfotipo de parasitas tiveram seu DNA extraído. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, de acordo com instruções do fabricante. A amplificação das regiões 28S e COI foi realizada via PCR, de acordo com o protocolo descrito por Moszczynska et al. (2009). As amostras foram então purificadas com polietilenoglicol (PEG) e submetidas a reações de pré-sequenciamento com o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Após preparadas, as amostras foram enviadas ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM) para a realização do sequenciamento. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas com o auxílio do programa MEGA 7.0 e BioEdit. Posteriormente, a identificação das espécies foi realizada através da comparação com dados previamente disponibilizados no GenBank, utilizando-se a ferramenta BlastN.

Resultados e Discussão

Foram analisados um total de 103 moluscos, sendo 49 *Pomacea scalaris*, 28 *Pomacea canaliculata* e 26 de *Aylacostoma chloroticum*. Dos espécimes de *P. canaliculata* analisados apenas um estava parasitado por cercárias. Já para *A. chloroticum* dos 26 espécimes analisados 19 (73,08%) estavam parasitados. Foi observado apenas um morfotipo de cercária em *P. canaliculata* e três morfotipos em *A. chloroticum*. Em *Pomacea scalaris* não foi encontrado estágios larvais destes parasitos.

Os valores de similaridade das sequências foram obtidos através da comparação com dados do GenBank, utilizando a ferramenta BlastN. Para a região 28S os três morfotipos encontrados em *A. chloroticum*, foram: *Paralecithodendrium parvouterus*, com similaridades de 95 e 96%; *Pseudosellacotyia lutzi*, com similaridade de 99 e 100% e *Philophthalmus gralii*, com similaridade de 98%. Ainda em relação a estes morfotipos, para a análise do COI, os valores de similaridade encontrados foram muito baixos, não sendo conclusivos quanto à identificação específica.

O sequenciamento das regiões COI e 28S do DNA do morfotipo registrado em *P. canaliculata* não forneceu resultados conclusivos quanto à identificação específica, já que em ambos os casos as sequências foram alinhadas com sequências de diversas espécies ou com baixa similaridade.

Existem registros em outros estudos da ocorrência de *P. lutzi* em *A. chloroticum* e das outras espécies de parasitos em *Melanoides tuberculatum*, mas não na região de estudo do presente trabalho. Mesmo com a baixa prevalência de indivíduos da espécie *P. canaliculata* parasitados (3,6%), a espécie de parasito encontrada neste molusco só ocorreu nesta espécie, desta forma é importante a continuidade de pesquisas com estes organismos para a identificação deste morfotipo e também para elucidar o ciclo de vida desta espécie de parasito na região.

Aylacostoma chloroticum apresentou uma alta prevalência de parasitismo (73,08%), assim, é provável que esta espécie seja um importante hospedeiro intermediário no ciclo de vida das espécies de digenéticos de ocorrência na região estudada.

Conclusões

Os resultados obtidos com as análises moleculares dos digenéticos registrados em *Aylacostoma* apontaram uma alta similaridade com as espécies *Pseudosellacotyla lutzi*, *Philophthalmus gralii* e *Paralecithodendrium parvouterus*. Apesar de todas as espécies identificadas pertencerem à sub-classe Digenea, elas não pertencem à super-família Diplostomoidea, grupo taxonômico este que era o objetivo do nosso estudo inicialmente. No entanto, nosso trabalho traz novas informações importantes sobre o ciclo de vida de três espécies de digenéticos, sendo o primeiro estudo que registra a ocorrência dos estágios larvais destas três espécies de parasitas em caramujos na região. Pesquisas futuras com análises moleculares de outras regiões genômicas serão úteis para confirmação dessas espécies e para a identificação de outros parasitas em diferentes espécies de moluscos.

Agradecimentos

Agradeço aos pesquisadores do Laboratório de Zoobentos/NUPÉLIA - UEM, pela identificação dos exemplares de moluscos, ao Laboratório de Ictioparasitologia/NUPÉLIA - UEM, pela coleta e ajuda nas triagens e identificação dos parasitos. E ao Laboratório de Genética/NUPÉLIA - UEM, por fornecer os materiais e suporte para a realização do projeto.

Referências

- 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. 841–85, 2015.
- MOSZCZYNSKA et al. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 75-82, 2009.
- ROSSER, T.G. et al. Characterization of the life cycle of a fish eye fluke, *Austrodiplostomum ostrowskiae* (Digenea: Diplostomidae), with Notes on Two Other Diplostomids Infecting *Biomphalaria havanensis* (Mollusca: Planorbidae) from Catfish Aquaculture Ponds in Mississippi, USA. **Journal of Parasitology**, v. 102, p. 260-274, 2016.
- SOUZA, G. T. R. et al. Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil, e sua potencialidade como hospedeiros intermediários. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, p. 309-314, 2008.
- TAKEMOTO, R.M. et al. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 691–705, 2009.