

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTÁGIOS LARVAIS DE DIGENÉTICOS EM MOLUSCOS PROVENIENTES DO PARQUE DO INGÁ, MARINGÁ, PARANÁ

Juliana Rosa Matias Ciccheto (PIBIC/CNPq-FA/Uem), Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, Alessandra Valéria de Oliveira, Rodrigo Junio da Graça (Coorientador), Ricardo Massato Takemoto (Orientador), e-mail: takemotorm@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Ciências Biológicas:

Genética - Genética molecular e de microrganismos;

Parasitologia - Entomologia e malacologia de parasitos e vetores.

Palavras-chave: 28S, Taxonomia integrativa, Trematoda.

Resumo:

Há poucos estudos com invertebrados no Parque do Ingá, localizado no município de Maringá, incluindo estudos com gastrópodes, que no último Plano de Manejo do parque não haviam sido registrados como fauna recorrente deste fragmento de mata. Da mesma forma, mas em um âmbito global, pouco se sabe sobre a distribuição e ocorrência de espécies de digenéticos e quem são seus hospedeiros intermediários. O objetivo deste estudo foi verificar o parasitismo por larvas de digenéticos em caramujos límnicos em lagoas do Parque do Ingá, realizando estudos morfológicos e moleculares utilizando o gene 28S para a identificação destas espécies na fase de cercária. As cercárias tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado. Foram analisados 324 espécimes de moluscos, *Biomphalaria occidentalis*, *Melanoides tuberculata*, *Physa* sp. *Aylacostoma chloroticum* e *Pomacea canaliculata*, sendo que as três primeiras espécies estavam infectadas. Foram encontrados 3 morfotipos de cercárias. A divergência genética entre os morfotipos indica espécies distintas. Assim, o registro destas espécies, além da importância ecológica e taxonômica envolvida, é relevante para as áreas médica e veterinária.

Introdução

Os moluscos são considerados importantes transmissores de zoonoses, que podem afetar especialmente pessoas que vivem em países em desenvolvimento com índices precários de saneamento (THIENGO et al., 2006). Muitos atuam como hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos, em uma relação obrigatória para o desenvolvimento das cercárias, larvas que se desenvolvem nos moluscos durante seu ciclo de vida. Os digenéticos são caracterizados por um ciclo de vida complexo, possuindo, no mínimo, dois hospedeiros intermediários e um definitivo, sendo o primeiro hospedeiro intermediário representado por moluscos, o segundo por crustáceos ou peixes, por exemplo, enquanto o hospedeiro definitivo pode ser

representado por espécies de peixes, aves piscívoras ou mamíferos, incluindo o ser humano (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Para que ocorra o esclarecimento do ciclo de vida dos digenéticos, as espécies devem ser corretamente identificadas durante os estágios larvais. Para isto, o uso de técnicas moleculares pode auxiliar na distinção e identificação de espécies, sendo os genes nucleares ribossômicos, como o do 28S, úteis como marcadores moleculares para esta caracterização (PAVAN; MONTEIRO, 2014).

Nesse sentido, o estudo teve como objetivo caracterizar morfológica e molecularmente estágios larvais de digenéticos encontrados em moluscos do Parque do Ingá, Maringá.

Materiais e métodos

Os moluscos foram coletados no Parque do Ingá, localizado no município de Maringá, Paraná, na Lagoa da gruta da Santa e na Lagoa do Parque Japonês (23°25'29"S e 51°55'48"O) (liberação concedida pela Secretaria do Meio Ambiente e Bem-Estar Animal, número 32520/2018). As coletas ocorreram entre os meses de julho de 2018 a maio de 2019. Foram coletados 324 espécimes de moluscos com o auxílio de puçá e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Ictioparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram eviscerados e examinados para a obtenção da glândula digestiva, utilizada como sítio de infecção pelos estágios larvais de digenéticos. Os parasitas obtidos foram separados de acordo com o morfotipo, segundo Pinto e Melo (2013). Para a análise molecular, os organismos foram separados individualmente em tubos com água ultrapura e levados ao Laboratório de Genética Molecular do Nupélia da UEM, para a extração, amplificação e purificação das amostras. A extração do DNA dos parasitas foi feita com o kit ReliaPrep® gDNA Tissue seguindo instruções do fabricante. A amplificação das regiões 28S foi realizada e as amostras foram purificadas. 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 dos programas BioEdit e MEGA 7, respectivamente. Posteriormente, a distância-*p* foi calculada entre as espécies.

Resultados e Discussão

Foram analisados um total de 324 moluscos, sendo 32 *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954, 97 *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981, 67 *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), 85 *Physa* sp. Hughes, 1927 e 43 *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1819). Morfológica e, os tipos de cercárias encontrados foram *Distoma brevifurcata* afaringeada, em *B. occidentalis*, *Pleurolophocerca* em *M. tuberculata* e *Xifidiocercária* em *Physa* sp. Em *Aylacostoma chloroticum* e *P. canaliculata* não foram encontrados estágios larvais de digenéticos.

Dentre os espécimes analisados, apenas três *B. occidentalis* estavam parasitados por cercárias (3,09%), enquanto um *M. tuberculata* estava parasitado por cercárias (1,49%) e um *Physa* sp. estava infectado (1,18%). A distância intraespecífica dos parasitas foi nula, enquanto que entre os morfotipos foram encontrados altos valores

de distância genética (>10%) (Tabela 1), valores superiores ao considerado por Pinto, Melo e Brant (2015) de 0,3% para o marcador molecular 28S para uma investigação de espécies crípticas.

Tabela 1 – Matriz de distância-*p* interespecífica e intraespecífica entre três espécies de parasitas obtidas neste estudo. Morfotipo 1 = parasita de *Physa* sp.; Morfotipo 2 = parasitas de *Melanooides tuberculata*; Morfotipo 3 = parasitas de *Biomphalaria occidentalis*. As numerações (128, 130, 133 e 134) representam a marcação dos diferentes espécimes.

Espécies	1	2	3	4	5
1. Morfotipo 1 (128)	-	-	-	-	-
2. Morfotipo 1 (130)	0,000	-	-	-	-
3. Morfotipo 2 (133)	0,138	0,138	-	-	-
4. Morfotipo 2 (134)	0,138	0,138	0,000	-	-
5. Morfotipo 3	0,202	0,202	0,225	0,225	0,225

Cercárias distoma brevifurcada afaringeada não possuem membrana natatória dorsal do corpo, possuem ventosa ventral e podem ou não apresentar ocelos, já cercárias pleurolofocerca apresentam cauda apenas com membrana natatória dorso-ventral, enquanto em xifidiocercárias prevalece a ausência de ocelos pigmentados. De acordo com Pinto e Melo (2013), os tipos cercarianos podem ajudar na identificação de características biológicas dos parasitas, padrões de ciclos biológicos e ainda possíveis classes e famílias dos potenciais hospedeiros definitivos.

Molecularmente, foi corroborado que os tipos morfológicos pertencem a espécies diferentes, considerando os valores de distância genética obtidos.

Neste trabalho a taxonomia integrativa foi útil para a confirmação de diferentes espécies de acordo com diferentes morfotipos. Essa abordagem une dados taxonômicos tradicionais e genética molecular para a descrição de novas espécies.

Conclusões

O uso da taxonomia integrativa colabora para o preenchimento das lacunas na classificação e identificação de espécies, tornando o uso de ferramentas moleculares necessárias em aspectos taxonômicos, ecológicos e evolutivos. Nosso trabalho, além de ser o primeiro a registrar estas espécies de digenéticos no Parque do Ingá, traz importantes informações para o entendimento dos ciclos dessas espécies, além da sua distribuição e ocorrência no Brasil.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante a realização deste PIBIC. Ao COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa), pelo apoio técnico.

Referências

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C. (Org.). **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 241–260.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. DA C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Maringá, Paraná: Eduem, 2008.

PINTO, H.; MELO, A. L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: Panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 4, p. 369–386, 2013.

PINTO, H.; MELO, A. L.; BRANT, S. V. Where are South American freshwater turtle blood flukes (Trematoda: Spirorchiidae)? The first morphological and molecular analysis of spirorchiid cercariae from freshwater snails in Brazil. **Parasitology International**, v. 65, p. 553-558, 2015.

THIENGO, S. C.; BARBOSA, A. F.; COELHO, P. M.; FERNANDEZ, M. A. **Moluscos exóticos com importância médica no Brasil**. In: I Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras. 2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/174_05122008104832.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2019.