

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS E SEUS PARASITOS DIGENÉTICOS NA BACIA DO RIO IVAÍ POR MEIO DO DNA BARCODE

Lara Darice Lima (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mateus de Mello Rocha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ricardo Massato Takemoto (Coorientador), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora), e-mail: avoliveira@uem.br

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

Área e subárea do CNPq: Ciências Biológicas, Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Digenea, COI, Gastrópodes

Resumo:

A bacia hidrográfica do rio Ivaí possui extensão de 36.587km², e se localiza totalmente no Estado do Paraná. Quanto aos moluscos, os trabalhos na região são escassos. Tais animais têm importância biológica, algumas espécies são utilizadas como hospedeiros intermediários no ciclo de vida de parasitos. Alguns desses parasitos pertencem à subclasse Digenea (Trematoda) e têm vertebrados como seus hospedeiros definitivos, inclusive podendo causar zoonoses. Em uma das possíveis espécies de moluscos coletadas na bacia do rio Ivaí, diferentes morfotipos de parasitos foram encontrados, no entanto, não se sabe a qual espécie pertencem e se os diferentes morfotipos são diferentes estágios de desenvolvimento ou não. Marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar, tanto o molusco, quanto o parasito. Dessa maneira, o presente estudo visou caracterizar molecularmente espécies de moluscos por meio dos marcadores COI e ITS e seus respectivos parasitos por meio dos marcadores COI e 28S na região da bacia do rio Ivaí. As amostras foram amplificadas via PCR e sequenciadas. Os resultados apontam para a espécie do molusco *Aylacostoma chloroticum* parasitado por parasitos de *Philophthalmus*, possivelmente *P. aylacostoma*, digenético com potencial zoonótico.

Introdução

Os gastrópodes apresentam uma grande diversidade no que diz respeito à sua morfologia e habitat, possuem estágio larval de desenvolvimento e, na fase adulta, corpo mole. Várias espécies podem servir como hospedeiro intermediário para os parasitos, como os trematódeos digenéticos, vermes endoparasitos de vertebrados com potencial zoonótico (HICKMAN et al., 2016). Em espécimes de moluscos coletadas no rio Ivaí, diferentes morfotipos de digenéticos foram encontrados, no entanto, não se sabe se pertencem à mesma espécie ou se correspondem a diferentes estágios do desenvolvimento de uma mesma espécie. Devido à quantidade escassa de estudos com esses animais na região, a identificação das espécies é importante, pois permite compreender o ciclo de vida

desses parasitos e investigar potenciais danos ambientais, econômicos e à saúde humana. Uma das ferramentas utilizadas na identificação de espécies é a de marcadores moleculares, que detectam polimorfismos ao longo do genoma. As sequências dos marcadores são curtas e variáveis para cada espécie. Assim, o trabalho visou a identificação de moluscos coletados na bacia do rio Ivaí e seus respectivos parasitos através dos marcadores moleculares COI, ITS e 28S.

Materiais e Métodos

Nove espécimes de gastrópodes, coletados na porção do baixo rio Ivaí, foram utilizados neste estudo. Os animais foram fotografados e tiveram as glândulas digestivas removidas para a triagem. Os parasitos digenéticos, quando presentes, foram classificados como morfotipos 3 e 4 (Tabela 1). A extração de DNA do tecido muscular dos gastrópodes e parasitos foi executada com kits de extração comercial. Para os moluscos, o fragmento COI foi amplificado em todas as amostras por meio dos primers LCO1490 e HCO2198. O marcador da região interna transcrita do DNA ribossomal (rDNA), ITS, não foi amplificado para estes gastrópodes. O marcador molecular COI foi amplificado para os parasitos por meio dos primers COI-R trema e JB3, e o fragmento do gene ribossomal 28S, pelos primers U178 e L1642. Todas as amostras foram purificadas com polietilenoglicol e enviadas para sequenciamento. As sequências obtidas foram editadas manualmente com o uso do programa BioEdit e alinhadas utilizando o MEGA 7, com o algoritmo de alinhamento Clustal W. O cálculo de distância genética foi feito através dos programas MEGA 7 e DnaSP v5. Sequências disponíveis no banco de dados GenBank, foram adicionadas às análises e a construção da árvore gênica, correspondente ao marcador 28S dos parasitos, foi realizada no software RAXML. O programa jModelTest foi utilizado para avaliar o melhor modelo de substituição nucleotídica. A edição da árvore foi feita pelo software Interactive Tree Of Life (iTOL). *Cloacitrema narrabeenensis* e *Parorchis acanthus* foram utilizados como outgroup.

Resultados e Discussão

Para as 17 amostras de parasitos triadas neste trabalho obtivemos 15 sequências correspondentes ao marcador 28S e 3 ao marcador COI (Tabela 1).

Tabela 1. Número de extração dos parasitos, gastrópodes hospedeiros e respectivos morfotipos, bem como o marcador amplificado e sequenciado dos parasitos.

Nº Extração Parasitos	Nº Extração Gastrópodes	Morfotipos (Parasitos)	Marcador amplificado e sequenciamento
52	6	3	COI e 28S
53	6	4	28S
54	35	4	28S
55	37	3	28S
56	37	4	28S
57	44	3	COI e 28S
58	44	4	28S
59	51	3	COI e 28S

60	51	4	--
61	68	3	28S
62	68	4	28S
63	75	3	28S
64	75	4	28S
65	77	3	--
66	77	4	28S
67	79	3	28S
68	79	4	28S

As três sequências mitocondriais (COI) se mostraram idênticas entre si em seus 685 pb. Ao serem comparadas com sequências do banco de dados, apresentaram maiores percentuais de identidade para o gênero *Philophthalmus*, com percentual de identidade de 92,41% em relação à *Philophthalmus aylacostoma*. Já em relação ao marcador 28S o percentual de identidade foi de 99,67% em relação à *P. aylacostoma*. A distância genética p (pairwise distance) foi calculada para sequências do Genbank com percentual de identidade acima de 95,50%, sendo de 0,3% para *P. aylacostoma*, 1,2% para *P. gralli*, 1,5% para *P. lucipetus*, 2,5% para *P. lacrymosus*. Para os outgroups as distâncias foram de 4,7% para *Cloacitrema narrabeenensis* e 5,6% para *Parorchis acanthus*.

A análise da árvore gênica (Figura 1) revela que todas as amostras deste trabalho, para o marcador 28S, incluindo os morfotipos 3 e 4, se agruparam em um mesmo clado, em conjunto com *P. aylacostoma*, evidenciando a semelhança dessas sequências. Quanto aos gastrópodes, todos os espécimes apresentaram percentual de identidade de 99,84% a 100% com sequências de *Aylacostoma chloroticum* disponibilizadas no GenBank, sendo pertencentes a essa espécie.

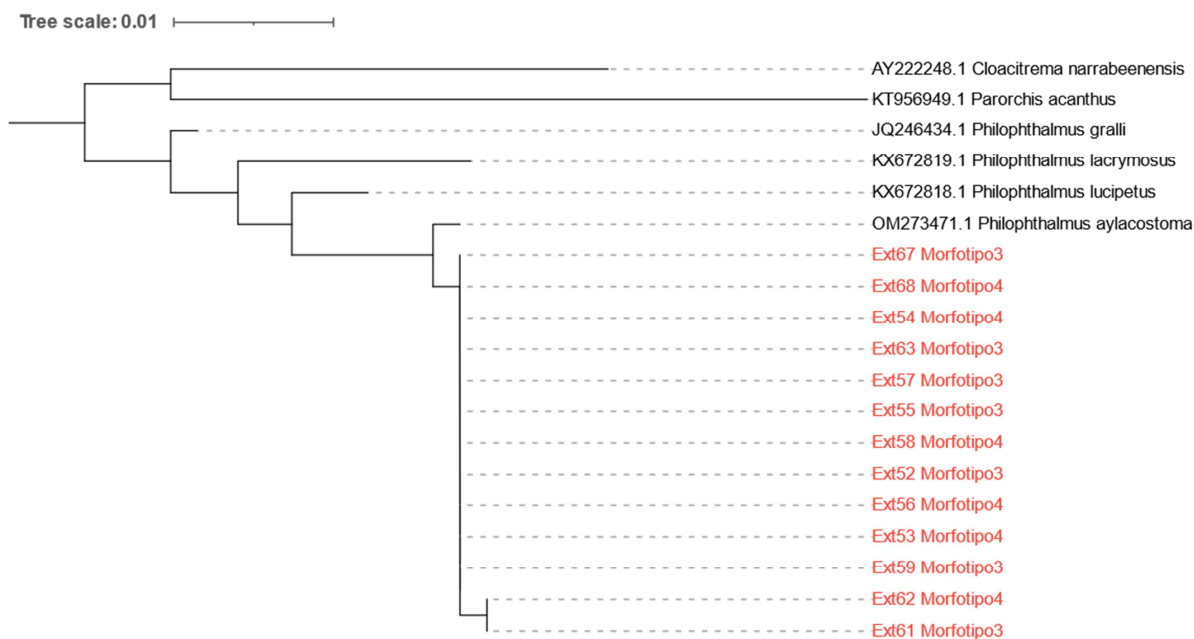


Figura 1. Árvore gênica construída utilizando fragmentos da região ribossomal 28S de exemplares de parasitos coletados no rio Ivaí (em vermelho) e sequências do Genbank (em preto). O modelo de substituição nucleotídica utilizado foi o Jukes-Cantor (JC).

Sugere-se que os morfotipos 3 e 4 dos parasitos pertençam à mesma espécie e sejam correspondentes a diferentes estágios de vida desses invertebrados. De acordo com o percentual de identidade obtido para ambos os marcadores, a distância p e a posição na árvore gênica, provavelmente esses parasitos pertencem à espécie *Philophthalmus aylacostoma*. Nesse gênero a fase adulta pode infectar os olhos de mamíferos e aves e seu ciclo de vida pode estar relacionado à alguns problemas, pois o uso da água contaminada para certas atividades pode afetar rebanhos, aviários, animais que convivem na região do rio e até causar zoonoses, impactando a área no que diz respeito à saúde, economia e ambiente, caso a espécie não seja nativa (PINTO; MELO, 2010). Assim como nesse trabalho, há registros, na planície de inundação do alto rio Paraná, da presença do molusco *Aylacostoma chloroticum* parasitado por 3 espécies de parasitos, de gêneros distintos, dentre eles, *Philophthalmus* (ONACA et al., 2019).

Conclusões

Concluimos, a partir da análise do marcador COI, que todos os gastrópodes analisados neste trabalho pertencem à espécie *Aylacostoma chloroticum*. Os parasitos provavelmente pertencem, considerando os marcadores (COI e 28S), à *Philophthalmus aylacostoma*. Os resultados obtidos são úteis para auxiliar na correta identificação destes organismos, uma vez que esses parasitos possuem potencial patogênico e zoonótico, e para compreensão da relação hospedeiro-parasito do local.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica concedida (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - UEM) para o desenvolvimento desta pesquisa e ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia – UEM) por fornecer a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

Referências

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; I'ANSON, L. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16. ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 2016.

ONACA, F. M. T.; DA GRAÇA, R. J.; FABRIN, T. M. C.; TAKEMOTO, R. M. OLIVEIRA, A. V. Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2019.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. DE. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 6, p. 323–327, 2010.