

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTÁGIOS LARVAIS DE PARASITAS EM ESPÉCIES DE GASTRÓPODES DO RIO IVAÍ, PARANÁ, BRASIL

Marco Aurélio Juliani Paganini (PIBIC/CNPq/UEM), Mayara Destro Passere (Coorientadora), Alessandra Valéria de Oliveira (Orientadora). E-mail: avoliveira@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/ Genética Molecular e de Microorganismos

Palavras-chave: Digenéticos; Marcadores moleculares; Moluscos.

RESUMO

Na literatura há registros, na bacia do rio Ivaí, de gastrópodes atuando como hospedeiros intermediários de digenéticos. A morfologia semelhante entre as espécies de gastrópodes e a dificuldade de identificação dos digenéticos em estágios larvais, tornam as técnicas moleculares importantes na caracterização desses grupos. O presente estudo teve como principal objetivo a caracterização e identificação molecular de gastrópodes e seus parasitas digenéticos, do rio Ivaí, utilizando os marcadores *COI* e 28S. Foram obtidas duas sequências de *Aylacostoma chloroticum*, confirmando a identidade dos hospedeiros. Para os diferentes morfotipos de parasitas, foram obtidas 10 sequências utilizando o marcador *COI* e 10 sequências para o marcador 28S. Dentre os sete morfotipos, os morfotipos 3R e 3C foram identificados molecularmente como *Pseudosellacotyla lutzi*, e os morfotipos 4R, 4C e 5R foram identificados como Digenea gen. sp. encontrado em trabalhos anteriores. Para os demais morfotipos, não foi possível uma identificação a nível de espécie. Dessa maneira, este estudo ressalta a importância de novos estudos na região, visando compreender melhor a biodiversidade desta bacia.

INTRODUÇÃO

Thiaridae é uma família de gastrópodes nativos de regiões neotropicais com um papel crucial como hospedeiros intermediários de parasitas trematódeos digenéticos. Esses parasitas possuem ciclos de vida complexos, necessitando de pelo menos dois hospedeiros para atingirem a fase adulta, sendo o último

geralmente um vertebrado. Além disso, podem ser transmitidos entre animais e humanos, apresentando potencial zoonótico e causando doenças como esquistossomose e fasciolose (Pinto e Melo, 2013).

Pesquisas anteriores já relataram a presença de gastrópodes no rio Ivaí atuando como hospedeiros intermediários de parasitas digenéticos, como a espécie *Aylacostoma chloroticum* (Passere *et al.*, 2022). Devido à semelhança morfológica entre várias espécies de gastrópodes e à complexidade na identificação dos estágios de vida dos digenéticos, as técnicas moleculares têm se mostrado ferramentas essenciais na caracterização e análise da biodiversidade desses organismos (Pinto *et al.*, 2015). No entanto, a biodiversidade do rio Ivaí ainda é pouco conhecida, principalmente devido à escassez de taxonomistas especializados e ao número limitado de estudos sobre esses grupos na região.

Dessa maneira, o principal objetivo do estudo foi identificar e caracterizar molecularmente os estágios larvais de parasitas digenéticos e gastrópodes coletados no rio Ivaí, utilizando marcadores moleculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os gastrópodes foram coletados no baixo Ivaí em Engenheiro Beltrão/PR (23,656590 S 52,210133 O) ($n = 35$), utilizando puçás e captura manual, com autorização do Sisbio (85597). Os espécimes foram medidos, fotografados e submetidos à análise parasitológica para detectar estágios larvais de digenéticos. O tecido dos gastrópodes foi armazenado para extração de DNA. Os parasitas também foram fotografados e separados de acordo com morfotipos.

A extração de DNA dos gastrópodes foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®) e dos parasitas com o QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®). A quantificação do DNA extraído foi feita em um espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific®). A reação de PCR contve 1 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/μL, Invitrogen), Tris-KCL (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,87 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 4 μM de cada *primer*, 10 ng de DNA molde e água Milli-Q para o volume final de 25 μL para os gastrópodes e 23 μL para os parasitas. Para os gastrópodes, os *primers* utilizados na amplificação tiveram como alvo o gene mitocondrial *COI* (*primers* LCO1490 (F) e HCO2198 (R)). Para a amplificação dos digenéticos foram utilizados *primers* específicos para a região *COI* e 28S. Para o *COI* foram usados os *primers* JB3 (F) e COI-R trema (R) e para a região 28S os *primers* U178 (F) e L1642 (R).

Após a PCR, os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos obtidos foram purificados e sequenciados. As sequências foram editadas manualmente usando o BioEdit e alinhadas com o

MEGA X. A ferramenta BLASTn foi utilizada para comparar as sequências obtidas com as disponíveis no GenBank. O MEGA X foi usado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica (GTR+G e HKY+G, para *COI* e 28S, respectivamente). A caracterização dos haplótipos e o cálculo de distância p foram feitos com DnaSP e MEGA X. As duas sequências mais semelhantes obtidas via BLASTn para cada morfotipo foram incluídas nas análises. A reconstrução filogenética foi feita pelo método de Máxima Verossimilhança com 1000 reamostragens de *bootstrap*, utilizando o MEGA X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 35 gastrópodes coletados, 10 estavam parasitados com estágios larvais de digenéticos. Foram encontrados sete morfotipos de parasitas. Para dois gastrópodes foram obtidas sequências de *COI* com 557 pb, apresentando 100% de similaridade com sequências de *A. chloroticum* disponíveis no GenBank.

Foram obtidas 20 sequências de parasitas utilizando os marcadores moleculares *COI* ($n = 10$) e 28S ($n = 10$), com 675 pb e 556 pb, respectivamente, após edição e alinhamento. Ao serem comparadas com as sequências disponíveis no GenBank, as sequências mostraram maior similaridade com as espécies *Cryptocotyle micromorpha*, *Pseudosellacotyla lutzi*, *Digenea* sp., *Ascocotyle pindoramensis*, *Metagonimus saitoi*, *Scaphanocephalus* sp. e Trematoda sp.

As sequências obtidas com o marcador molecular *COI* revelaram seis haplótipos diferentes, enquanto o marcador 28S identificou cinco haplótipos. As distâncias p de *COI* variaram de 0 a 28,31% entre os diferentes morfotipos analisados e de 0,17% a 29,20% entre os morfotipos e as espécies do GenBank. Para o marcador 28S, as distâncias p variaram de 0 a 10,90%, tanto entre os diferentes morfotipos quanto entre os morfotipos e as espécies do GenBank. Nas árvores gênicas (Figura 1), as sequências de *COI* se distribuíram em cinco grupos, enquanto as de 28S formaram quatro grupos.

Este trabalho apresenta o segundo registro de *A. chloroticum* como hospedeiro intermediário de digenéticos no rio Ivaí e também contribui para novos registros de parasitas digenéticos na região, visto que foram encontradas pelo menos cinco espécies utilizando este gastrópode como hospedeiro intermediário. Dentre os sete morfotipos, foi possível identificar o morfotipo 3R e 3C como *P. lutzi* e os morfotipos 4R, 4C e 5R foram identificados como *Digenea* gen. sp., já observado por Passere *et al.* (2022). Para os demais morfotipos, não foi possível uma identificação a nível de espécie.

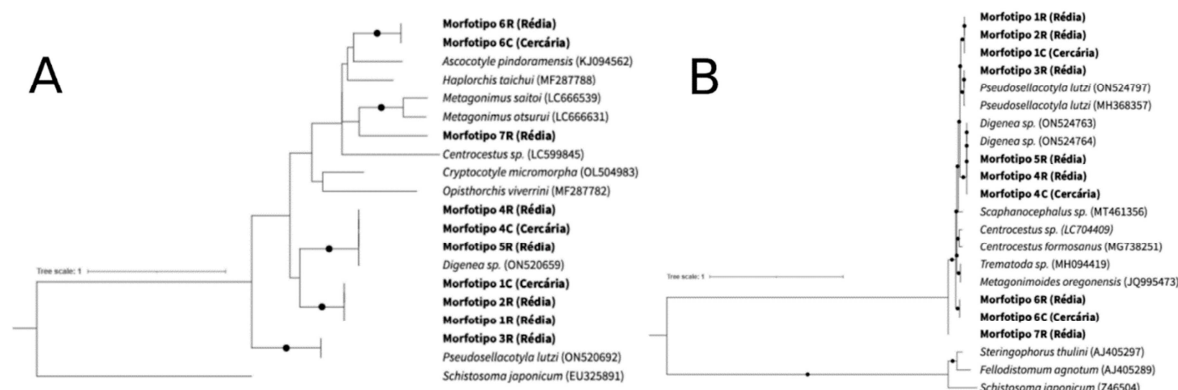


Figura 1 – Árvore gênicas construídas pelo método de Máxima Verossimilhança para os marcadores *COI* (A) e *28S* (B). As sequências em negrito foram obtidas neste estudo.

CONCLUSÕES

Foram encontradas ao menos cinco espécies de parasitas parasitando *Aylacostoma chloroticum* no rio Ivaí, sendo que apenas duas puderam ser identificadas a nível específico.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- PASSERE MD. *et al.* Identification and molecular characterization of digenean trematode parasites of *Aylacostoma chloroticum* (Gastropoda: Thiaridae) from a Neotropical Basin. **Parasitology Research**, v. 121, p. 3653–3661, 2022.
- PINTO HA, MELO AL. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. **Journal of Tropical Pathology**, v. 42, p. 369–386, 2013.
- PINTO HA. *et al.* Where are the South American freshwater turtle blood flukes (Trematoda: Spirorchidae)? The first morphological and molecular analysis of spirorchiid cercariae from freshwater snails in Brazil. **Parasitology International**, v. 64, p. 553–558, 2015.