

ESTUDO MOLECULAR DE *Tanaisia valida* FREITAS, 1951 (TREMATODA: DIGENEA): DADOS PRELIMINARES

TATIELE DE AGUIAR LOPES SOARES¹; GERTRUD MÜLLER²; FABIANA FEDATTO BERNARDON³; MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – tatielelopes@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gertruda@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – fabifedatto@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mrpmbio@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os parasitos representam uma grande proporção da biodiversidade no mundo (PRICE, 1980), mas podem ser difíceis de estudar. Esse fato pode estar relacionado ao tamanho pequeno, estruturas morfológicas difíceis de visualizar, ciclos biológicos complexos, entre outros fatores (GÓMEZ; NICHOLS, 2013).

O gênero *Tanaisia* Skrjabin, 1924 (Digenea: Eucotylidae) compreende 24 espécies conhecidas (FREITAS, 1951), todas de difícil identificação morfológica, pois as características que as diferem geralmente são sutis e de difícil visualização ao microscópio óptico.

Para contornar as limitações associadas com os métodos convencionais de identificação, baseados em caracteres morfológicos e morfometria, técnicas baseadas em marcadores moleculares de DNA ou RNA também são aplicadas para identificação e análise da variação genética de parasitos (HUANG et al., 2012).

Considerando que o uso conjunto de dados genéticos e morfológicos pode contribuir significativamente para a identificação de parasitos (WILL et al., 2005), este estudo utilizou marcador de DNA ribossômico com o objetivo de identificar espécimes de *T. valida*, além de confirmar posição filogenética dentro de Eucotylidae.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPASIL), localizado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram analisados 25 exemplares de *T. valida*, provenientes do passeriforme *Chrysomus ruficapillus* (n=14). As aves foram coletadas na Granja 4 Irmãos S.A. Agropecuária, Indústria e Comércio, propriedade particular, produtora de arroz irrigado, localizada no município do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (32° 24.36" S - 52° 49.38" W) de dezembro de 2013 a julho de 2014.

Os espécimes destinados ao estudo molecular foram identificados morfológicamente a partir da revisão realizada, no Brasil, por FREITAS (1951) e armazenados em etanol 70° a -20°C. Para a extração do DNA, os parasitos foram macerados em uma solução de 70µL de SDS 10% e 6µL proteinase K e colocados em banho-maria a 55°C por 48 horas. Após a incubação, a extração de DNA seguiu o protocolo do fenol-clorofórmio estabelecido por SAMBROOK et al. (1989).

Os primers utilizados para a avaliação e amplificação por PCR da região 28S do DNAr foram LSU5 (5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCA-3') e LSU3 (5'-TCCTGAGGGAACTTCGG-3') (LITTLEWOOD et al. 1995). Os amplicons foram

submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose e posteriormente observados e fotografados em sistema de fotodocumentação (L-Pix EXSystem Loccus Biotecnologia). Por fim, os amplicons foram submetidos à purificação através do uso do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados para sequenciamento, na Macrogen Advancing Through Genomics.

Os dados obtidos a partir do sequenciamento foram comparados por meio de BLASTn (ZHANG et al., 2000) aos do GenBank para reconhecer a homologia com outras espécies de Eucotylidae. A composição nucleotídica foi calculada no software Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco sequências parciais do gene 28S do DNAr foram geradas e editadas visualmente no software Bioedit. Para otimizar as análises moleculares a matriz de dados foi editada em tamanho padrão com 610pb. A composição nucleotídica das sequências revelou valores similares entre elas, e C+G apresentaram valores ligeiramente maiores (Tabela 1), fato já esperado dada a natureza dos marcadores moleculares baseados em DNA ribossômico.

Tabela 1 - Composição nucleotídica do gene 28S DNAr da sequência consenso dos espécimes de *Tanaisia valida*.

Gene	Comprimento (pb)	A %	T %	C %	G %	CG %	AT %
28SDNAr	610pb	26,9	19,7	30,4	23	53,4	46,6

A – Adenina, T – Timina, C – Citosina, e G – Guanina

Foi obtida uma sequência consenso a qual foi submetida ao BLASTn no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ocorreu homologia com as espécies *Tanaisia fedtschenkoi*, *Paratanaisia bragai* e *Tamerlania zarudinyi*, com valores de identidade de 97%, 90% e 88% respectivamente. A maior homologia com *T. fedtschenkoi* já era esperada, por se tratar do mesmo gênero. As duas espécies foram consideradas muito semelhantes morfológicamente por FREITAS (1951), diferenciando-se apenas pelo tamanho dos ovos e por sua distribuição geográfica, pois *T. fedtschenkoi* ocorre na Europa e na Ásia.

Assim como as análises moleculares realizadas por UNWIN et al. (2013) utilizando as porções 18S e 28S do DNAr confirmaram a identidade de espécimes de *Paratanaisia bragai* e sua posição dentro de Eucotylidae, neste estudo a homologia confirmou a posição de *Tanaisia* dentro desta família, agrupada com os gêneros *Paratanaisia* e *Tamerlania*.

4. CONCLUSÕES

O marcador de DNA ribossômico foi conclusivo para a diferenciação específica entre *Tanaisia valida* e *T. fedtschenkoi*, bem como para confirmação da espécie estudada dentro de Eucotylidae. Estudos filogenéticos com outros marcadores moleculares deverão confirmar as relações evolutivas entre as espécies desta família.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREITAS, J. F. T. Revisão da família Eucotylidae Skrjabin, 1924 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 33-123, 1951.

GOMÉZ A.; NICHOLS E. Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2 p. 222-227, 2013.

HUANG, S.Y. et al. Genomics and molecular genetics of *Clonorchis sinensis*: current status and perspectives. **Parasitology International**, v.61, p. 71–7, 2012.

LITTLEWOOD, D. T. J.; JOHNSTON, D. A. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Cambridge**, v. 111, p. 167-176, 1995.

PRICE, P. W. **Evolutionary biology of parasites**. Vol. 15. Princeton University Press, 1980. 237p.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Press. 1989.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** v. 30, p. 2725 - 2729, 2013.

UNWIN, S. et al. Renal trematode infection due to *Paratanaisia bragai* in zoo housed Columbiformes and a red bird-of-paradise (*Paradisaea rubra*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 32-41, 2013.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54 n. 5, p. 844-851, 2005.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.