



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE GASTRÓPODES PROVENIENTES DO PARQUE DO JAPÃO, MARINGÁ, PARANÁ, BRASIL

Nathalia Santos Hirata ¹, Hugo de Amorim Souza ², Mayara Destro Passere ³, Alessandra Valéria de Oliveira ⁴

¹Biomédica formada pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. PIC-UEM. nathaliahirataa@gmail.com

²Acadêmico do Curso de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. ra128417@uem.br

³Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. Bolsista CAPES. mayarapassere@gmail.com

⁴Orientadora, Doutora, Docente no Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PEA, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR. avoliveira@uem.br

RESUMO

Os gastrópodes atuam como hospedeiros intermediários de digenéticos parasitas que podem ter potencial zoonótico. A identificação correta desses organismos é fundamental, pois contribui para a detecção de focos de transmissão e os marcadores moleculares são metodologias eficientes para esse fim. O objetivo desse trabalho foi identificar molecularmente gastrópodes e seus parasitas digenéticos em um parque urbano de Maringá, PR. Os gastrópodes foram coletados no Parque do Japão e triados. Parte do tecido de cada espécime foi utilizado para extração e amplificação do DNA, que posteriormente foi sequenciado e analisado. Foram coletados 40 gastrópodes, mas nenhum estava parasitado. Sequências *COI* foram obtidas para quatro espécimes que, com base na ferramenta BLASTn, foram compatíveis com *Biomphalaria straminea*, com percentual de identidade de 100%. Trata-se do primeiro estudo envolvendo técnicas moleculares no Parque do Japão, destacando a necessidade de mais pesquisas nessa área para ampliar a disponibilidade de dados genéticos desses organismos.

PALAVRAS-CHAVE: *Biomphalaria*; *COI*; Hospedeiros; Parques urbanos.

1 INTRODUÇÃO

Os digenéticos são endoparasitas com um ciclo biológico complexo, cujo mecanismo de transmissão conta com, pelo menos, dois hospedeiros (Pinto; Melo, 2014). Os estágios larvais podem apresentar potencial zoonótico, tendo em vista que são formas de transmissão de algumas doenças (Neves, 2004). Dentre elas, a de maior preocupação é a esquistossomose, uma vez que é endêmica em grande parte do território nacional e responsável por casos graves em um número expressivo de pessoas (Pinto; Melo, 2014; Brasil, 2024). Sendo assim, destacam-se os gastrópodes pertencentes à *Biomphalaria* (Preston, 1910), pois reúne espécies que podem atuar como hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agente etiológico da esquistossomose (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

A identificação correta desses gastrópodes e parasitas é fundamental, pois contribui diretamente para a detecção de focos de transmissão (Pinto; Melo, 2014). Contudo, a identificação morfológica dos gastrópodes e a correlação entre as formas larvais e adultas dos digenéticos nem sempre é eficiente (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Carvalho et al., 2020; Cuzzo et al., 2020; Pinto; Melo, 2014). Para superar esta limitação, integrar técnicas moleculares na identificação das espécies pode melhorar o entendimento acerca da diversidade dos gastrópodes (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008; Cuzzo et al., 2020) e digenéticos (Onaca et al., 2019; Passere et al., 2022).

O marcador molecular mais utilizado para esses organismos baseia-se no gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*COI*) (Hebert et al., 2003; Cuzzo et al., 2020). É uma região conservada que possui um padrão de sequência "barcode" espécie-específica, sendo indicada para a identificação de espécies com taxonomia complexa ou que foram pouco estudadas (Hebert; Gregory, 2005).



O presente estudo teve como objetivo identificar molecularmente os gastrópodes e seus parasitas digenéticos coletados em um parque urbano do município de Maringá/PR, utilizando o marcador molecular mitocondrial *COI*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Em abril de 2024 foi realizada uma tentativa de coleta no Parque do Ingá, no município de Maringá/PR, mas não foram encontrados gastrópodes nos lagos artificiais deste parque. Dessa forma, uma outra coleta foi realizada em julho de 2024 em outro parque urbano da cidade, conhecido como Parque do Japão (23° 26' 51.1" S, 51° 58' 29.9" W). Os gastrópodes foram coletados com o auxílio de puçás e captura manual, totalizando 40 espécimes, armazenados em sacos plásticos com água e transportados até o laboratório de Ictioparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Para a análise parasitológica, foi retirada a glândula digestiva dos gastrópodes com o auxílio de um microscópio estereoscópico, a fim de verificar a presença das formas larvais de digenéticos. Parte do tecido muscular da região do pé de cada espécime foi armazenado em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL com álcool absoluto, para posterior extração de DNA.

Para extração de DNA dos tecidos dos gastrópodes foi utilizado o kit de extração de DNA Wizard Genomic DNA Purification da Promega®, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, para quantificação do DNA, foi usado um espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific®). A reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada para a amplificação do marcador mitocondrial *COI*, foi realizada em um termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System da Applied Biosystems®, com 1,25 U de Taq DNA polimerase (5 U/μL, Ludwig Biotecnologia), Tampão 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada primer, DNA molde (10 ng) e água Milli-Q para um volume final de 25 μL. Após a PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos amplificados e com um marcador de peso molecular conhecido (DNA Ladder 100 pb). Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados.

Para a análise dos dados, as sequências obtidas foram visualizadas e editadas pelos programas BioEdit e MEGA7, respectivamente. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa MEGA7 utilizando o algoritmo CLUSTAL W. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, por meio da ferramenta BLASTn. O programa MEGA7 foi utilizado para realizar o cálculo de distância genética pelo método Kimura-2-parâmetros (K2P) e as reconstruções filogenéticas utilizando o método de máxima verossimilhança com 1000 reamostragens de bootstrap. Sequências de *Biomphalaria* obtidas do GenBank foram adicionadas às análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os gastrópodes coletados no Parque do Japão (n = 40) foram identificados previamente, com base na morfologia da concha, como pertencentes a *Biomphalaria* (Figura 1). Os espécimes foram submetidos à análise parasitológica com a finalidade de encontrar possíveis estágios larvais de digenéticos, porém nenhum indivíduo estava parasitado. Sequências da região mitocondrial *COI* foram obtidas para quatro gastrópodes analisados, apresentando um alinhamento final de 626 pb.



Este é o primeiro estudo envolvendo técnicas moleculares para a identificação de gastrópodes que atuam como possíveis hospedeiros intermediários no Parque do Japão, Maringá/PR. O registro destes gastrópodes, principalmente de *Biomphalaria*, é de extrema importância ecológica e sanitária, visto que são possíveis hospedeiros intermediários de parasitas de importância médica e pode haver o risco de infecções nessas áreas, caso seja detectada a presença do parasita (Souza et al., 2008; Pinto; Melo, 2014). As técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas e, de modo geral, a análise utilizando do DNA “barcode” tem sido considerada uma metodologia integrativa eficaz na identificação molecular das espécies de *Biomphalaria* (Palasio et al., 2017; Palasio et al., 2019; Ohlweiler et al., 2020; Araújo et al., 2023; Nogueira et al., 2024).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O marcador molecular *COI* se mostrou eficaz na identificação de *B. straminea* encontrados no Parque do Japão. No entanto, devido à carência de sequências *COI* depositadas nos bancos de dados genéticos, algumas análises podem ficar limitadas. Desse modo, é importante ressaltar também a necessidade de mais estudos nessa área, visando uma maior disponibilidade de informações referentes às espécies de *Biomphalaria*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. D. *et al.* DNA barcoding as a valuable tool for delimiting mollusk species of the genus *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1167787, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1167787>. Acesso em: 10 jul. 2025.

BRASIL. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024.

CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575413708>. Acesso em: 10 jul. 2025.

CARVALHO, O. D. S. **Moluscos hospedeiros intermediários de Schistosoma mansoni do Brasil**. Belo Horizonte: Instituto Rene Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

CUEZZO, M. G. *et al.* Phylum Mollusca. In: ROGERS, D. C.; DAMBORANE, C.; THORP, J. (org.). **Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates**. Academic Press, 2020.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>. Acesso em: 10 jul. 2025.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, p. 852–859, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>. Acesso em: 10 jul. 2025.

LAYTON, K. K. S.; MARTEL, A. L.; HEBERT, P. D. N. Patterns of DNA Barcode variation in Canadian marine molluscs. **PLOS ONE**, v. 9, p. e95003, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095003>. Acesso em: 10 jul. 2025.



NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NOGUEIRA, R. T. *et al.* Phylogeny, morphology, and haplotypic distribution of *Biomphalaria straminea* populations from the five geographic regions of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, n. 4, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230770>. Acesso em: 10 jul. 2025.

OHLWEILER, F. P. *et al.* Taxonomic diversity of *Biomphalaria* (Planorbidae) in São Paulo state, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 20, p. e20200975, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2020-0975>. Acesso em: 10 jul. 2025.

ONACA, F. M. T. *et al.* Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000725>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PALASIO, R. G. S. *et al.* Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil. **ZooKeys**, v. 668, p. 11–32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/zookeys.668.10562>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PALASIO, R. G. S. *et al.* Diversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools. **Biota Neotropica**, v. 19, p. e20190746, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0746>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PARAENSE, W. L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), Planorbid mollusc from south america. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 1–12, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761988000100001>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PASSERE, M. D. *et al.* Identification and molecular characterization of digenean trematode parasites of *Aylacostoma chloroticum* (Gastropoda: Thiaridae) from a neotropical basin. **Parasitology Research**, v. 121, n. 12, p. 3653–3661, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07692-4>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, p. 106–112, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/rpt.v42i4.27922>. Acesso em: 10 jul. 2025.

SOUZA, G. T. R. *et al.* Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil, e sua potencialidade como hospedeiros intermediários de digenéticos. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 309–314, 2008. Disponível em: [10.4025/actasciobiolsci.v30i3.5018](https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v30i3.5018). Acesso em: 10 jul. 2025.