ELAYNA CRISTINA DA SILVA MACIEL

Uso de marcadores ribossomais para caracterização de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

ELAYNA CRISTINA DA SILVA MACIEL

Uso de marcadores ribossomais para caracterização de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

	Maciel, Elayna Cristina da Silva
M152u	Uso de marcadores ribossomais para caracterização de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil / Elayna Cristina da Silva Maciel. -- Pirassununga, 2016. 59 f. Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos -- Universidade de São Paulo. Departamento de Medicina Veterinária. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
	Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia.
	1. rDNA 2. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> 3. Peixes tropicais 4. Marcadores moleculares. I. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais Euclides e Léa, responsáveis por me ensinarem as práticas de honestidade e persistência mesmo quando as circunstâncias se mostraram contrárias. Dedico também a minha querida avó Neuza. D. Silva (in memoriam) que durante sua caminhada terrena foi minha grande incentivadora.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e energia concedida em todos os momentos da minha caminhada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, pelo apoio e confiança depositado;

Ao Prof. Dr. Edson Adriano da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-Diadema) e ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Souza pela valorosa contribuição;

À Universidade de São Paulo, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP);

Ao Dr. José Senhorini do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA-ICMBio), ao Dr. George Yasui e ao Dr. Alan Martin Guerrero pelo apoio e disponibilidade concedida.

Aos amigos de trabalho do Laboratório de Parasitologia: Kássia Capodifoglio, Juliana Naldoni, Tiago Milani, Gabriel Moreira, Mateus Maldonado, João Lucon, Josi Ponsetto e Júlio Aguiar pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência;

A nossa querida técnica Dra. Márcia Ramos Monteiro Silva, pela amizade, ensinamentos, dedicação e valiosa contribuição para realização deste trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio e concessão de bolsa de estudo;

As minhas queridas amigas Campinenses (UNICAMP) Cintia Moreira e Suellen Zatti pela amizade e pelas boas risadas;

Aos amigos que ao longo dessa caminhada se tornaram grandes irmãos de coração meu eterno agradecimento: Leandro Demuner, Isabela Menezes, Kazuo Yokobatake, Diana Suckeveris, Mickael Boillon, Yuri Natividade e Jairo Azevedo.

As minhas queridas amigas de convivência diária, Fernanda Cavallari de Castro (Ferzoca) e Juliana Naldoni (Jujubinha) pelas conversas animadas regadas sempre com muito café, meu eterno agradecimento;

A todos que colaboraram com as amostras processada neste trabalho, sem vocês nada disso seria possível: Celma Maria Ferreira (Universidade Federal de Viçosa-UFV), Rafael Vianna (Universidade Federal de Viçosa-UFV), Santiago Benites Pádua (AQUIVET-SP), Gustavo Valadão (Centro de Aquicultura da UNESP/Jaboticabal-SP), Thyago Campos e Fernando Franceschini (VB Alimentos-MT) e Prof. Dr. Mauricio Laterça Martins (Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC);

A minha querida família que mesmo de longe emanaram apoio e amor: papai Maciel, mamãe Léa, Rafa, Arianne, Neto, Dinda e ao meu querido incentivador e entusiasta vovô Evaristo que com seus ensinamentos me transferiu valores que me ajudaram durante minha caminhada.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre

Paulo Freire

RESUMO

MACIEL, E. C. S. **Uso de marcadores ribossomais para caracterização de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil**. 2016. 59 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O *I. multifiliis* é um protozoário ciliado que acomete diferentes espécies de peixes, causador da ictiofitiriose, responsável por altas taxas de mortalidade em pisciculturas e resultando em perdas econômicas. O presente estudo avaliou isolados do parasito oriundos de peixes capturados em seis estados brasileiros, utilizando como marcadores moleculares ribossomais os genes 18S, 5.8S e 28S e os espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2 de *I. multifiliis*, obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posteriormente, sequenciados. Primers específicos foram desenhados para este estudo.

As sequências dos isolados de *I. multifiliis* encontrados infectando diferentes hospedeiros em diferentes estados brasileiros apresentaram grande similaridade e homologia, sendo muito conservadas e, por este fato, não permitem diferenciação entre isolados deste parasito. Sequências do DNA de isolados de *I. multifiliis* de diferentes regiões brasileiras foram depositadas no GenBank e representam as primeiras informações para esta espécie no Brasil.

Palavras-chave: rDNA, *Ichthyophthirius multifiliis*, peixes tropicais, marcadores moleculares.

ABSTRACT

MACIEL, E. C. S. **The usage of ribosomal markers for characterization of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fourquet, 1876) from different regions of Brazil.** 2016. 59 f. Thesis (PhD) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The *I. multifiliis* is a ciliate protozoan that affects fishes of different species, which causes Ichthyophthiriasis. This disease is responsible for high mortality in fish farms resulting in economic losses. The present study evaluated parasite isolates from four Brazilian states, using nuclear ribosomal molecular makers for 18S, 5.8S and 28S genes and the first and second internal transcribed ITS1 and ITS2 intergenic spacers from *I. multifiliis*. All the markers were evaluated through Polymerase Chain Reaction (PCR) and rDNA sequenced, using novel specific primers; the sequences of different isolated of *I. multifiliis*, which were collected from different fish species (host) from different Brazilian regions showed high similarity and homology, which were extremely conserved therefore it was not possible to differentiate among the strains from this parasite. All recovered sequences from this study were deposited in GenBank database. These sequences represent a novel contribution for Brazilian isolate of *I. multifiliis*.

Keywords: rDNA, *Ichthyophthirius multifiliis*, tropical fishes, molecular markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de <i>I. multifiliis</i>	17
Figura 2 - Organização do DNA Ribossômico.....	20
Figura 3 - Peixes das espécies <i>Myelus tiete</i> (A) <i>Poecilia latipinna</i> (B), procedente da região de Pirassununga-SP e Viçosa-MG respectivamente, com infestação característica de <i>I. multifiliis</i>	28
Figura 4 - Forma trofote de <i>I. multifiliis</i> evidenciando macronúcleo (setas), vista em microscópio óptico procedente de <i>Myelus tiete</i> , oriundo de Pirassununga-SP.....	28
Figura 5 - Representação esquemática do alinhamento dos primers utilizados neste estudo ao longo das sequências obtidas de <i>I. multifiliis</i>	30
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (2%), com marcador de DNA e produto de amplificação obtido com os primers ICT01-MACR, dos isolados de <i>I. multifiliis</i> obtidos de vários estados do Brasil.....	34
Figura 7 - Sequências de nucleotídeos alinhados em Clustal W para o gene 18S dos doze isolados brasileiros em comparação com isolados depositados no Genbank, Canadá (U 17354) e dos Estados Unidos (KJ 690572).....	36
Figura 8 - Distâncias genéticas das sequências do rDNA 18S de isolados de <i>I. multifiliis</i> brasileiros e das sequencias depositadas no GenBank dos USA (KJ690572) e Canada(U17357). Método de Neighbor-Joining.....	39
Figura 9 - Distância Genética das sequências parciais (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S) de isolados de <i>I. multifiliis</i> brasileiros e das sequências depositadas no GenBank da China ((DQ270016.1) e Austrália (AY0292274). Método de Neighbor-Joining.....	43
Figura 10 - Diagrama em mapping Likelihood referente ao gene 18S de <i>I. multifiliis</i> dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2.....	45
Figura 11 - Diagrama em mapping Likelihood referente às sequencias parciais (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) de <i>I. multifiliis</i> dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2.....	45
Figura 12 - Diagrama em mapping Likelihood referente às sequencias do gene 28S de <i>I. multifiliis</i> dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência dos isolados de <i>I. multifiliis</i> e seus respectivos hospedeiros, utilizados para a amplificação do rDNA ribossomal.....	27
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e para as reações de sequenciamentos de rDNA obtidos de isolados de <i>I. multifiliis</i>	31
Tabela 3 - Alinhamento das sequências referentes ao gene 18S dos isolados dos diferentes estados brasileiros, com indicação das inserções e substituições nucleotídicas.	35
Tabela 4 - Matriz de similaridade, baseada na estimativa das divergências evolutivas entre as sequências de 18S de <i>I. multifiliis</i> . O triângulo superior corresponde ao número de bases que difere entre os isolados e o triângulo inferior corresponde à diferença genética em porcentagem entre as amostras comparadas.....	38
Tabela 5 - Alinhamento das sequências referentes às sequências parciais dos isolados dos diferentes estados brasileiros, com indicação das substituições nucleotídicas.....	40
Tabela 6 - Matriz de similaridade, baseada na estimativa das divergências evolutivas entre as sequências do 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S de <i>I. multifiliis</i> . O triângulo superior corresponde ao número de bases que difere entre os isolados o triângulo inferior corresponde à diferença genética em porcentagem entre as amostras comparadas.....	42

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	O Crescimento da Produção de Peixes no Brasil.....	14
2.2	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	15
2.3	Marcadores Moleculares.....	19
3.	HIPÓTESE.....	24
4.	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo Geral.....	25
4.2	Objetivos Específicos.....	25
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	Coleta e processamento das amostras.....	26
5.2	Extração de DNA.....	29
5.3	Reação em Cadeia Polimerase (PCR).....	29
5.4	Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR.....	31
5.5	Análise de Similaridade.....	32
6.	RESULTADOS.....	33
6.1	Identificação molecular dos isolados brasileiros de <i>I. multifiliis</i>	33
6.2	Sequências do rDNA 18S.....	34
6.3	Sequências Parciais do rDNA de <i>I. multifiliis</i> (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S)	39
6.4	Sequências do rDNA 28S obtidas de <i>I. multifiliis</i>	43
6.5	Avaliações através do Programa Tree-Puzzle.....	44
7.	DISCUSSÃO.....	47
8.	CONCLUSÃO.....	52
9.	REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A atividade aquícola nos últimos anos, tem gerado crescimento do setor e como todo processo de produção e adensamento de animais, requer maiores cuidados como: monitoramento da qualidade de água no cultivo e aplicação de boas práticas de manejo e qualidade nutricional. Mesmo com cuidados redobrados, ainda assim, o adensamento e alterações ambientais podem gerar um ambiente estressante para os peixes, favorecendo o aparecimento de agentes patogênicos na criação. Assim infestações por ectoparasitas podem representar perdas para piscicultores, porque reduzem a taxa de crescimento dos peixes, promovem alterações fisiológicas e hematológicas, mudanças de comportamento e mortalidade principalmente nas fases de larvas e juvenis.

Neste contexto o *Ichthyophthirius multifiliis* destaca-se como um parasito ciliado que apresenta pouca especificidade parasitária, tornando-se de suma importância nos sistemas de produção, já que atinge diferentes espécies de peixes, podendo causar danos econômicos. Devido a sua importância econômica, grandes esforços são realizados para o controle da ictiofitiriose, incluindo estudos na utilização de drogas eficazes para seu tratamento, estudos acerca da biologia e comportamento do parasito, além do desenvolvimento de métodos imunoproláticos. Opções para o controle da doença são extremamente limitados, tornando os estudos experimentais um desafio.

Técnicas tradicionais como: sorologia, histopatologia e caracterização morfológica são utilizadas para identificação de doenças em peixes, mas a aplicação da biologia molecular tem se mostrado potencialmente mais rápida e mais sensível, podendo detectar facilmente alterações genéticas que denotam variação de subespécies e cepas. Portanto, os estudos genômicos apresentam uma importante estratégia para reduzir o impacto da doença e compreender a transição evolutiva do parasito.

O DNA ribossomal (rDNA) possui sequências intercalares que variam dentro e entre populações e sequências codificadoras que são altamente conservadas, portanto análises baseadas no rDNA são ferramentas bastante úteis para discriminar organismos de diferentes regiões. Marcadores moleculares como o gene 18S e espaçadores intergênicos (ITS1 e ITS2) têm sido utilizados na identificação de novas espécies e nos estudos filogenéticos de

parasitos que infectam peixes. O DNA ribossomal tem a vantagem de estar presente em um número elevado de cópias em todo o genoma. O gene 18S (menor subunidade (SSU)), 28S (maior subunidade (LSU)) 5.8 S são altamente conservados e adequados para verificar a variação inter-específica. Os espaçadores intergênicos, não-codificantes (ITS1 e ITS2), no entanto, são mais variáveis. Portanto, mais indicados para detectar variabilidade genética dentro de uma determinada espécie.

Como exemplo, ITS1 e ITS2 foram utilizados na identificação dos parasitos ciliados de peixes marinhos *Cryptocaryon irritans* (DIGGLES; ADLARD, 1997; YAMBOT; SONG; SUNG, 2003; SUN *et al.*, 2006). Apesar da grande importância atribuída a estudos com tais marcadores em parasitos de peixes tropicais, o Brasil ainda mostra-se incipiente nesta área.

Portanto, no presente estudo, objetivou-se analisar e comparar o uso de marcadores ribossomais para investigar variação intra e interespecífica em isolados de *I. multifiliis* oriundos de quatro diferentes estados no Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Santa Catarina e Pará), através da padronização de técnicas moleculares utilizando a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).

4. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Crescimento da Produção de Peixes no Brasil

A produção de peixes provenientes do sistema de cultivo tem aumentado no mundo. Esta condição é proveniente da intensa exploração da pesca extrativa, a qual, não sustenta a demanda de consumo. Segundo relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2007) a pesca nos grandes rios tem colocado em risco algumas espécies. Em contrapartida para esta mesma entidade, ressalta que o número de pescadores e piscicultores cresceu mais rápido que alguns empregos gerados pela agricultura tradicional.

De acordo com os dados nacionais, a criação de peixes liderou o setor, com participação de 66,1% do valor total da produção, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (BRASIL, 2014). Para Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2010), a produção aquícola em 2009 foi de 394,340 toneladas. O MAPA reporta ainda que cada região brasileira vem se especializando em produção de diferentes espécies, mas os principais organismos, em termos de volume cultivados no país, ainda são os peixes.

Camargo e Pouey (2005) relatam vantagens na produção aquícola brasileira, pela diversidade de espécies apresentadas, pela topografia, além da disponibilidade de produtos e subprodutos utilizados para formulação de rações.

Assim como a produção, o consumo de pescado também aumentou no Brasil (9 kg/habitante/ano), não chegando ainda nas quantidades recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que preconiza 12 kg/habitante/ano.

Para Woo (2006), a alta qualidade proteica do pescado e os benefícios que seus nutrientes representam para a saúde humana, fizeram com que o consumo de peixes aumentasse de forma acentuada nos últimos anos, principalmente em países em desenvolvimento.

Crepaldi (2006) reforça a existência da heterogeneidade na distribuição do consumo de peixes, havendo diferenças entre continentes, países ou mesmo regiões.

Levando em consideração o aumento na produção e no consumo de peixes no Brasil e no mundo, podemos constatar que a piscicultura vem conquistando seu espaço, confirmados por elevados dados produtivos e estimulando vários setores (pesquisa, indústria e comércio). Porém, este crescimento acarreta maiores cuidados sanitários, já que peixes estocados em altas densidades são submetidos a fatores estressantes, que facilitam a transmissão de agentes patogênicos (UEDA *et al.*, 2013).

Sant'Ana *et al.* (2012) afirmam que medidas profiláticas e manejo sanitário adequados são essenciais para produção aquícola, caso contrário a introdução de agentes patogênicos e enfermidades podem acarretar prejuízos consideráveis em alguns casos ou inviabilizar o sistema produtivo.

2.2 *Ichthyophthirius multifiliis*

Nos sistemas de criação (intensivo e super intensivo), os peixes são mantidos de forma confinada e em altas taxas de lotação, acarretando um aumento nos níveis de estresse e, em consequência, a disseminação dos agentes infecciosos é maior. Desta forma vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários podem infectar e causar doenças em peixes cultivados segundo alguns autores (EIRAS *et al.*, 2008; WOO, 2006).

Neste contexto, o *I. multifiliis*, um protozoário ciliado e com pouca especificidade parasitária, pertencente à família *Ichthyophthiridae* é considerado um dos parasitos mais importantes em piscicultura, já que o mesmo é responsável por grandes perdas econômicas (HEINECKE; BUCHMANN, 2009). Papema (1991) relata que a ictiofitiriose é considerada uma das doenças mais comuns e persistentes no sistema de produção aquícola e que nenhum hospedeiro apresentou total resistência a ela.

Jousson *et al.* (2005) relatam que o parasito tem grande importância também para o comércio de peixes ornamentais, onde é conhecido como “doença dos pontos brancos” (white spot disease). O parasito afeta uma ampla variedade de peixes de água doce, além de estar associado com altos níveis de mortalidade. Em alguns casos, a ictiofitiriose pode não causar mortalidade, mas pode apresentar consequências negativas sobre a população de peixes, como

por exemplo, reduzir a taxa de crescimento dos hospedeiros (OGUT; ABDURREZAK; MEHMET, 2005).

Floyd e Reed (2009) afirmam ainda que o parasito é altamente contagioso e se difunde rapidamente na criação, sendo que um surto de “ictio” deve ser tratado com urgência, caso contrário este pode levar o plantel a 100% de mortalidade. Pela sua importância e relevância no meio produtivo, o *I. multifiliis* é altamente estudado. No Brasil, vários autores já relataram a sua presença em diferentes espécies de peixes tropicais (GHIRALDELLI *et al.*, 2007; LEMOS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2001; TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2001). O *I. multifiliis* pertencente a classe Oligohymenophorea, a qual apresenta características como sulco oral (boca) e corpo coberto de cílios, características essas que podem ser encontradas em outros ciliados de gêneros importantes como a *Tetrahymena*, *Vorticella* e *Ophryoglena*. (WEI; LI; YU, 2013).

O ciclo de vida deste parasito consiste em três estágios conforme é descrito por Dickerson (2006) (Figura 1). O trofonte representa a fase parasitária, o qual pode ser encontrado na epiderme e no tecido branquial do hospedeiro, onde se nutre até deixá-lo. Após sair do hospedeiro, ele é denominado tomonetes (fase reprodutiva), onde as células filhas irão se diferenciar, sendo assim denominadas tomites, as quais posteriormente darão origem às formas infectantes de vida livre denominados terontes, que irão dar continuidade ao ciclo.

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida de *I. multifiliis*, na qual (a) representa a forma trofante; (c) tomites; (d) tomites encistados; (e) tomites rompendo o cisto e (g) terontes

Fonte: WEI, J.Z.; LI, H.; YU, H. **Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology**. Apply of Microbiology, v.57, p.91-101,2013.

Dickerson (2006) relata ainda que as taxas de desenvolvimento das fases mencionadas são influenciadas pela temperatura.

Forwood *et al.* (2015) avaliaram a influência de diferentes temperaturas no ciclo de vida do *I. multifiliis* (5, 9, 12, 17, 21, 25 e 30°C). Observaram que o desenvolvimento no estágio teronte foi significativamente diferente para cada temperatura, sendo que a 5°C o tempo médio de desenvolvimento foi maior que 189 horas, quando comparado a 30°C, onde o tempo médio decresceu para 11.7 horas.

Surtos de ictio já foram relatados em diferentes temperaturas. Bondensteiner *et al.* (2000) detectaram a ocorrência de infestação em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) em temperatura ambiente entre 6°C e 12°C; já Dickerson (2006) afirma que o *I. multifiliis* normalmente não sobrevive em temperaturas acima de 30°C, embora Bauer e lunchs (2001) tenham relatado

isolados do parasito que sobreviveram a 34°C. Além da temperatura, a salinidade é também um fator que interfere no desenvolvimento do parasito. Aihua e Buchmann (2001) avaliaram o efeito de diferentes concentrações salinas no desenvolvimento do parasito e demonstraram que existem cepas mais sensíveis a salinidade que outras.

O uso de produtos químicos para controle da doença muitas vezes se torna um problema por vários fatores: inconsistência do efeito curativo da droga testada, poluição ambiental e desequilíbrio ecológico. O cloreto de sódio é muito utilizado para controle da ictiofitiriose em aquários, mas seu uso a campo fica restrito, pois necessita de grandes quantidades (WEI; LI; YU, 2013).

Outro produto comum utilizado como quimioterápico é o verde de malaquita, ainda muito utilizado em aquarofilia, mas, segundo Camacho (2010), desde o início dos anos 80 tem sido demonstrado que o verde de malaquita pode ter efeito cancerígeno e mutagênico em seres humanos, por isso a FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-USA) e a União Europeia proíbem seu uso em produções de peixes destinados ao consumo humano. No Brasil sua utilização ainda é indiscriminada e com reduzidos dados oficiais, a Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos através da Instrução Normativa de Nº 20 de 21 de julho de 1999. Porém Hashimoto, Paschoal e Queiroz (2011) afirmam que a persistência do uso do verde de malaquita na aquicultura brasileira se deve ao seu baixo custo e sua eficiência microbiana. Carneiro, Schorer e Mikos (2005) testaram diferentes tratamentos convencionais utilizados no Brasil para o controle da infestação de ictios em *Rhamdia quelen*, entre os tratamentos testados: permanganato de potássio (1,3 mg/L), formalina (0,2 ml/L), sulfato de cobre (0,63 mg/L), sal comum (10g/L), verde de malaquita (0,05 mg/L), além da elevação da temperatura da água para 32°C, os autores concluíram que o sulfato de cobre, o sal e a elevação da temperatura reduziram o número de parasitas ao final do experimento, podendo ser utilizados como substitutos do verde de malaquita no controle do ictio em jundiás (*R. quelen*).

A prevenção da doença é baseada em quarentenas, quando se adquire novos lotes de peixes (FLOYD; REED 2009) mas, quando o surto já se estabeleceu, vários métodos para controle são testados para impedir o desenvolvimento do parasito, principalmente na fase parasitária (trofontes).

Ekanem *et al.* (2004) testaram extrato de *Carica papaya* e *Mucuna pruriens* em Goldfish (*Carassius auratus auratus*) em diferentes concentrações, eficiência e toxicidade, onde as concentrações testadas para *M. pruriens* foram de 100, 150 e 200 mg/L e 200 e 250 mg/L para *C. papaya*, concluíram que os banhos na concentração de 200 e 250mg/L apresentaram melhores resultados para *C. papaya* e nos ensaios in vitro o tratamento com *M. pruriens* apresentou 100% de mortalidade para a concentração de 150 mg/L e a melhor foi de 200 mg/L de *C. papaya* em trofontes, após 6 horas nos respectivos tratamentos. Assim como Zhang, Xu e Kleisius (2013) que encontraram no extrato de *Galla chinensis*, testado em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) infectados com “ictios,” que a concentração de 40mg/L impedia o desenvolvimento de tomontes.

São vários os estudos que avaliam a imunidade dos peixes em relação ao parasito e medidas imunoproláticas para reduzir o uso de quimioterápicos no ambiente. Alguns experimentos mostram que peixes que se recuperam das infecções iniciais tornam-se protegidos contra novos desafios pelo parasito. Tancredo, Gonçalves e Brum (2015) testaram uma vacina intraperitoneal para jundiás (*Rhamdia quelen*) infectados com terontes e demonstraram que a vacinação influenciou nos parâmetros hematológicos do peixe. Em outro estudo Xu, Kleisius e Panangala (2006) avaliaram a resposta imune em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) realizada com dois diferentes sorotipos de terontes, comprovando que a vacina estimulou a resposta imune, porém esta foi de curta duração. Já Swannes *et al.* (2006) evidenciaram virulências distintas entre diferentes sorotipos de *I. multifiliis*, mostrando que diferentes isolados podem diferir em relação a sua patogenicidade. Porém, Tancredo, Gonçalves e Brum (2015) ressaltam que outros fatores devem ser levados em consideração na resposta imune de peixes vacinados, tais como: nutrição adequada, densidade de estocagem, qualidade de água, a biologia do hospedeiro, custo e viabilidade da vacina.

2.3 Marcadores Moleculares

Menezes *et al.* (2009) reforçam o uso de métodos complementares como as técnicas de biologia molecular para identificação de espécies a partir do DNA ribossômico (rDNA), sendo esta uma ferramenta altamente importante para

estudo desta natureza. Já que as análises morfológicas podem não ser suficientes para caracterização precisa.

Nos eucariotos, o rDNA é constituído de uma família multigênica responsável pela síntese dos RNA(s) ribossomais (rRNA) e está organizado em unidades repetidas (em tandem) (ELDER; TURNER, 1995).

A unidade ribossomal é composta por um espaçador externo ETS (External Transcribed Spacer); uma região codificadora do rRNA 18S, uma região interna não codificadora, que é transcrito ITS1 (Internal Transcribed Spacer); a região que codifica para rRNA 5,8S; uma segunda região contendo outro espaçador interno ITS2, uma região que codifica para o gene 28S e finalizando com um espaçador externo NTS (Non Transcribed Spacer) (PREZOTTO, 2008) (Figura 2).

Figura 2 – Organização do DNA Ribossômico

Fonte: Adaptado de: PREZOTTO, F. L. **Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae)**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Hills e Dixon (1991) afirmam que os espaçadores (ITSs) reconhecem sinais para processamento e transcrição do rRNA. Além disso, o rDNA, nas suas diferentes regiões das unidades de repetições, evolui a diferentes taxas, sendo essa uma vantagem para utilização do rDNA nas análises filogenéticas. O baixo grau de polimorfismo na unidade de transcrição do rDNA permite a caracterização de espécies, com utilização apenas de apoucos exemplares. Este DNA mostra-se eficiente para comparação interespecífica, ou seja, são adequados para o estudo de diversidade.

Menezes *et al.* (2009) avaliaram a variabilidade genética de isolados de *Trichoderma spp* e *Fusarium oxysporum* das regiões de ITS e concluíram,

através do sequenciamento desta região, que este marcador é eficiente para identificação e separação desses isolados.

Os marcadores moleculares para o 18S e para os espaços intergênicos (ITS1 e ITS2) são amplamente utilizados para identificação e comparação de diversas espécies sendo aplicados em estudos moleculares e filogenéticos. A variabilidade nucleotídica do ITS2 demonstra eficiência desta região como um marcador para diversos grupos taxonômicos, devido ao fato de não ser uma região codificadora, mas forma estrutura secundária que auxilia no processamento do rDNA e que podem ser utilizadas como caracteres nas análises comparativas. Exemplo desta aplicação temos Herweden *et al.* (1999) que utilizaram informações do sequenciamento da região ITS1 para analisar relações filogenéticas e a variação intra e interespecífica em espécies do gênero *Paragonimus* (Trematoda: Digenea). As seqüências da região ITS1 foram utilizadas para identificar espécies de carrapatos do gênero *Cecidophylopsis* (KUMAR; FENTON; JONES, 1999) e estudos com espécies crípticas de mosquitos *Anopheles freeborni* e *A. hernis* (PORTER; COLLINS, 1991) foram identificadas utilizando análise do rDNA e do DNA mitocondrial. O gene 18S também foi utilizado na identificação das espécies de mixozoários *Myxobolus corderoi* de Zungaro jahu (ADRIANO *et al.*, 2009), *Myxobolus oliverai* de *Brycon hilarii* (MILANIN *et al.*, 2010) e *Henneguya eirasi* parasito do *P. corruscans* e *P. fasciatum* (NALDONI *et al.*, 2011).

Os espaçadores intergênicos também são amplamente utilizados como marcadores de parasitos de peixes marinhos de diferentes regiões, Sun *et al.* (2006) isolaram sete amostras de *Cryptocaryon irritans* de diferentes peixes e de diferentes localidades da China, utilizando ITS1 e ITS2, Diggles e Adlard (1997) utilizaram o ITS1 para caracterizar *C. irritans* oriundos de diferentes locais da Austrália, sendo os isolados definidos como selvagens (ambiente natural) e isolados de laboratórios, contudo os resultados demonstraram que as seqüências de rDNA estudadas revelaram variações genéticas consistentes entre os isolados australianos avaliados. Yambot, Song e Sung (2003), que também fizeram uso do 18S e ITS1 para estimar a divergência deste mesmo parasito para cinco isolados de diferentes hospedeiros de Taiwan, verificaram que para o ITS1, 28 pares de bases foram diferentes entre os isolados e para o 18S apenas um nucleotídeo apresentou-se distinto.

Schötterer *et al.* (1994), reforçam que estudos com ITSs são importantes, entretanto demonstram uma visão sobre as eventuais limitações funcionais, que podem afetar a divergência evolutiva desta região. Além disso, é altamente desejável obter uma estimativa para a taxa média de divergência desses espaçadores.

MacColl *et al.* (2015) que avaliaram diferentes estirpes de *I. multifiliis* usando marcadores ribossomais e mitocondriais para caracteriza-las, concluíram que os marcadores mitocondriais apresentaram-se mais eficientes quando comparados com os marcadores ribossomais.

Wright e Lynn (1995), em estudos com 18S rDNA com *I. multifiliis* e outras espécies pertencentes a classe Oligohymenophorea, revelaram que o *I. multifiliis* se agrupou estreitamente com a *Ophyoglena*. Abernathy *et al.* (2007), em estudos de expressão gênica com *I. multifiliis* desenvolveram uma plataforma para análise global em microarrays, baseando-se em bibliotecas de cDNA (DNA complementar) para melhor compreender e auxiliar em estudos de patogenicidade e virulência do parasito.

Portanto, nos últimos 15 anos, técnicas moleculares em estudo de parasitos de peixes adquiriram utilização generalizada e eficaz nas determinações taxonômicas, além de contribuírem para a compreensão da biologia evolutiva e celular (CLARK, 2006).

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreu em 1990, com a utilização de “primers” mais curtos com até 10 nucleotídeos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esta técnica particularmente versátil e sensível é utilizada para estudos genéticos-moleculares, através da síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase que é a catalizadora da reação, sendo uma técnica simples que se baseia na combinação de amostras de DNA com um par de oligonucleotídeos (primers) usados como indicadores (NORONHA, 2003).

A PCR favorece o diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas, além de possibilitar estudos moleculares de animais, plantas e fósseis. Chen *et al.* (2008) desenvolveram um ensaio de PCR como ferramenta para diagnosticar molecularmente o *C. irritans*, e o resultado demonstrou que o protocolo específico com padronização de temperatura (53°C de anelamento) e concentrações de

magnésio (3mM MgCl_2), foram úteis para identificação de detecção do ciliado marinho.

3. HIPÓTESE

O Brasil é um País com regiões bastante divergentes em relação ao clima e espécies de peixes exploradas comercialmente pelos sistemas de criação extensiva e intensiva. Desta forma avaliar as possíveis variações intraespecíficas entre os isolados de *I.multifiliis* oriundos das diferentes localidades brasileiras.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar as possíveis variações intraespecíficas mediante sequenciamento do DNA ribossomal de *I.multifiliis* oriundos de isolados do parasito procedentes de peixes infectados naturalmente de diferentes estados brasileiros, além de padronizar a técnica molecular de reação de cadeia de polimerase para o parasito estudado.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter isolados do *I.multifiliis* de peixes naturalmente infectado de diferentes Estados do Brasil;
- Realizar desenhos de primers específicos para obtenção das sequências de *I.multifiliis*;
- Padronizar as reações de Cadeia de Polimerase para as sequências de *I.multifiliis* obtidas;
- Realizar sequenciamento dos genes 18S, 5,8S e 28S rDNA, dos espaços intergênicos (ITS1 e ITS2) de *I.multifiliis* procedentes de diferentes estados brasileiros;
- Realizar análises de similaridades com base nas sequências obtidas de *I.multifiliis* para os marcadores 18S,5,8S,28S, ITS1 e ITS2 entre estes, com as sequências de *I.multifiliis* disponíveis no GenBank.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e processamento das amostras

Um total de doze isolados de *I. multifiliis* oriundos de peixes infectados de diferentes gêneros (Figura 3) provenientes de seis estados brasileiros foram utilizados para este estudo. Os locais de coleta foram nomeados com as siglas dos estados de procedência e com o número para cada hospedeiro coletado individualmente: SP (I), SP(II), SP(III) - correspondem ao município de Jaboticabal no estado de São Paulo com parasitos coletados do hospedeiro *Colossoma macropomum*, para SP (I) e SP (II), *Piaractus mesopotamicus* correspondente a SP (III) e SP (IV) coletado em Pirassununga-SP, correspondente ao hospedeiro *Myleus tiete*, assim como para MG (I) e MG(II) correspondentes ao município de Viçosa em Minas Gerais, onde os parasitos foram coletados de indivíduos distintos da espécie *Poecilia latipinna*, SC coletados no estado de Santa Catarina, onde SC(I) e SC(II) correspondem aos municípios de Pomerode e Paulo Lopes respectivamente e os *I. multifiliis* coletados de hospedeiros distintos, porém de mesma espécie *Rhamdia quelen*, assim para as demais amostras GO (I) coletado em Hidrolândia-GO do híbrido Tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*), MS(I) do estado de Mato Grosso do Sul, coletado no município de Dourado e parasitos oriundos do híbrido “Pintachara” (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) e PA (I) e PA (II) coletados em Santarém no estado do Pará, sendo *Piaractus brachypomus* e *Colossoma macropomum* respectivamente os hospedeiros. Todos os isolados coletados estão identificados na Tabela 1 com as devidas localidades e códigos. As coletas foram realizadas em pisciculturas com relatos de infestação por *I. multifiliis* e capturas em rios (apenas isolados oriundos de Santarém-PA), durante o período de julho de 2013 a março de 2015 em diferentes épocas do ano, sendo uma única coleta por localidade.

Os *I. multifiliis* na forma de trofontes (Figura 4) foram obtidos através de raspagem de pele por extensão corporal no sentido cabeça-cauda (JERÔNIMO; MARTINS; ISHIKAWA, 2011), os parasitos foram enviados das diferentes

localidades para o laboratório de Parasitologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, onde foram identificados morfológicamente através de análise em microscópio óptico. O material obtido foi conservado em etanol 70% (DIGGLES; ADLARD, 1997) para posterior extração do DNA genômico.

Tabela 1 - Procedência dos isolados de *I. multifiliis* e seus respectivos hospedeiros, utilizados para a amplificação do rDNA ribossomal.

Estados	Municípios	Hospedeiros	Código dos Isolados
São Paulo	Jaboticabal	<i>Colossoma macropomum</i>	SP (I)
São Paulo	Jaboticabal	<i>Colossoma macropomum</i>	SP (II)
São Paulo	Jaboticabal	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	SP (III)
São Paulo	Pirassununga	<i>Myleus tiete</i>	SP (IV)
Minas Gerais	Viçosa	<i>Poecilia latipinna</i>	MG (I)
Minas Gerais	Viçosa	<i>Poecilia latipinna</i>	MG (II)
Santa Catarina	Pomerode	<i>Rhamdia quelen</i>	SC (I)
Santa Catarina	Paulo Lopes	<i>Rhamdia quelen</i>	SC (II)
Goiás	Hidrolândia	<i>Colossoma macropomum</i> × <i>Piaractus mesopotamicus</i>	GO (I)
Mato Grosso do Sul	Dourado	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> × <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	MS (I)
Pará	Santarém	<i>Piaractus brachypomus</i>	PA (I)
Pará	Santarém	<i>Colossoma macropomum</i>	PA (II)

Fonte: Própria autoria

Figura 1 - Peixes das espécies *Myleus tiete* (A) *Poecilia latipinna* (B), procedente da região de Pirassununga-SP e Viçosa-MG respectivamente, com infestação característica de *I. multifiliis*.

Fonte: Própria autoria

Figura 2 - Forma trofote de *I. multifiliis* evidenciando macronúcleo (setas), vista em microscópio óptico procedente de *Myleus tiete*, procedente de Pirassununga-SP.

Fonte: Própria autoria

5.2 Extração de DNA

O DNA genômico dos parasitos foram extraídos a partir dos trofontes identificados. Para este procedimento foi utilizado o kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen ®) segundo as orientações do fabricante.

Primers foram desenhados com auxílio do software MacVector a partir das sequências de *I. multifilis* depositadas no GenBank e estão listados na Tabela 2. O resultado da extração foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) a 260 nm.

Os fragmentos amplificados foram analisados para o gene 18S e para os espaçadores internos (ITS1 e ITS2), os quais denominados de sequências parciais.

5.3 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Testes preliminares das reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes 18S, 5.8S, 28S do rDNA e dos espaçadores ITS1 e ITS2 foram realizados para adaptação do protocolo, o qual foi baseado de acordo em Adriano *et al.* (2012), com modificações.

Para as reações de amplificação foram utilizados os primers ICT01F-MACF-MACR e LABI03R. Primers intermediários (IMRf1-ELAR-S02F) foram utilizados para o sequenciamento das amostras. Apenas os primers IMRf1 e S02(F) foram obtidos da literatura (JOUSSON *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008, respectivamente). A figura 5 esquematiza o posicionamento dos primers para obtenção das sequências do rDNA.

Para a otimização da reação, foram realizados teste para verificar melhores gradientes para a temperaturas de anelamento e concentrações de Magnésio ($MgCl_2$), sendo a melhor temperatura encontrada de 62°C e a concentração de Magnésio de 2,5 mM de $MgCl_2$, essa padronização foi utilizada para todos os primers desenhados neste estudo.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 10ng a 50ng de DNA, 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 pmol de cada primer, 1,25U de Taq DNA polimerase (Dream Taq DNA Polimerase, Thermo Scientific) e água ultra pura com o mesmo volume final correspondente a 25 µl. As reações

foram realizadas em termociclador AG 22331 Hamburg (Eppendorf), em programa contendo uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguida de 35 ciclos com: desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 62°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min., finalizado com uma etapa de extensão a 72°C por 5 min. Controles negativos foram feitos para cada reação, contendo volume final de 25 µl, diferenciando-se da reação acima apenas pela ausência do material genético.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% usando o Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e Ladder 1Kb Plus (Invitrogen®).

As reações em cadeia da polimerase para cada um dos 12 isolados foram realizadas em duplicatas, assim, como, as reações de sequenciamento.

Figura 5 - Representação esquemática do alinhamento dos primers utilizados neste estudo ao longo das sequências obtidas de *I. multifiliis*.

Fonte: Própria autoria

5.4 Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

A Purificação dos produtos de PCR foi realizada com QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®), conforme instrução do fabricante. Para a quantificação foi utilizado 4ul do produto de PCR em gel de agarose 2%, com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

As amostras purificadas e em duplicatas foram enviadas para o sequenciamento na empresa Helixxa (Paulínia/SP), com os mesmos pares de primers utilizados para a obtenção dos produtos de PCR e primers adicionais. As reações de sequenciamento foram realizadas na plataforma 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®). As sequências foram editadas pelo programa Bioedit Sequence Alignment (versão 7.05.2) alinhadas no Clustel W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e confirmadas no programa BLAST do GenBank disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e para as reações de sequenciamentos de rDNA obtidos de isolados de *I. multifilis*.

Primer	Sequência	Referência
ICT01F (18S)	5'-GGGCGATTGTGATGATTCAAAG-3'	Presente estudo
ELAR (18S)	5'-CGAGGACATAATCAACGCAAGC-3'	Presente estudo
MACR (ITS1)	5'-GGTTTTAGCCTCCACCACTTGG-3'	Presente estudo
MACF (5.8S)	5'-TTGCGTTGATTATGTCCCTGC-3'	Presente estudo
LABI03R (28S)	5'-AATGGCCCCACTAAGAGCACT-3'	Presente estudo
IMRf1(18S)	5'-AGTGACAAGAAATAGCAAGCCAGGAG-3'	Jousson <i>et al.</i> 2005
S02 (ITS2)	5'-TGTTTAACGAGAGAAAATCATAAAT-3'	Chen <i>et al.</i> 2008

Fonte: Própria autoria

5.5 Análise de Similaridade

As análises utilizadas para obtenção das distâncias foram realizadas com um total de 14 sequências, as distâncias evolutivas foram obtida por Kimura 2 parâmetros com um nível de bootstrap de 1000 replicações e modelo de substituição nucleotídica, onde utilizou-se o programa MEGA 5.2 (TAMURA *et al.*, 2011). Para a obtenção da matriz de similaridade também foi utilizado o programa MEGA versão 5.2, o método modal de confiabilidade, e o modelo de substituição nucleotídica, usado foi a distância p, que é uma forma simples de mensurar a divergência, avaliando a proporção de nucleotídeos diferentes entre as sequências apresentadas, ou seja, quanto maior o valor de p maior será a divergência entre as sequências comparadas.

As sequências do gene 18S (1401pb) e as sequências denominadas parciais (18S-ITS1-5.8S-28S) com um total de 562 pb, foram utilizadas para comparações de isolados de *I. multifiliis*, depositados em banco de dados (GenBank). Esses isolados foram oriundos de países como Canadá (U17354) e Estados Unidos (KJ690572) para o gene 18S e China (DQ270016) e Austrália (AY0292274) para as sequências parciais

Objetivando-se calcular o sinal filogenético do conjunto de sequências estudadas, utilizou-se o método de Likelihood mapping, implementado no Programa Tree Puzzle versão 5.2, analisando-se 10.000 quartetos randômicos. O referido método avalia grupos de quatro sequências aleatoriamente escolhidas (quartetos) através de Maximum Likelihood.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação molecular dos isolados brasileiros de *I. multifiliis*

No presente estudo, foram apresentadas ferramentas para análises moleculares e análises de similaridade que auxiliaram na identificação de isolados de *I. multifiliis*.

Apesar da relevância do parasito em piscicultura, ainda pouco se conhece sobre ele. Nos bancos de dados, raras sequências de genes deste parasito estão depositadas, entre estas, nenhuma brasileira. Assim, nos propomos a padronizar a técnica de PCR para amplificar genes ribossomais e os espaçadores ITS1 e ITS2. Um protocolo específico foi criado para as reações de PCR, com a padronização de tempos e temperaturas de cada etapa, bem como a concentração de magnésio. A melhor temperatura de anelamento foi 62°C por 30 segundos, e a concentração de magnésio 2,5mM.

Além dos primers já descritos na literatura, cinco primers foram sintetizados, que com as reações padronizadas amplificaram fragmentos de 1401 pb para os primers ICT01F-MACR e 1511 pb para os primers MACF-LABI03R. A Figura 6 mostra os resultados da eletroforese em gel de agarose (2%), utilizado para quantificar o DNA das amostras, antes do seu envio para sequenciamento.

Nas análises foram usadas somente as sequências de boa qualidade. As duplicatas dos sequenciamentos dos isolados foram suficientes para esclarecer as poucas dúvidas que apareceram no sequenciamento.

No processo de edição das sequências (BioEdit Sequence Alignment versão 7.0.52), algumas extremidades 5' e 3' foram retiradas, ficando desta forma, todas as sequências com o mesmo tamanho. O alinhamento das sequências consenso obtidas revelou poucas deleções e inserções de nucleotídeos, bem como de substituições dos mesmos.

Para a delimitação dos genes e espaçadores nas sequências obtidas, foi realizada a comparação com a sequência depositada no GenBank™ GI 82704416 (China), referente ao gene 18S, ao espaçador ITS1, o gene 5,8S, ao espaçador ITS2 e ao gene 28S concatenadas ou parciais de *I. multifiliis* de

isolados da China. Os 2912 pares de base (pb) do DNA obtidos correspondem a 1401 pb do gene 18S, 141 pb do espaço intergênicos ITS1, 151 pb do gene 5.8S, 192 pb de ITS2 e 1024 pb relativos ao gene 28S.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (2%), com marcador de DNA e produto de amplificação obtido com os primers ICT01-MACR, dos isolados de *I. multifiliis* obtidos de vários estados do Brasil.

Fonte: Própria autoria

Todas as sequências obtidas foram submetidas ao BLAST que mostrou homologia com sequências de *I. multifiliis* depositadas no GenBank.

6.2 Sequências do rDNA 18S

No alinhamento os primeiros 700 pb do gene 18S de todos os isolados mostraram homologia entre si. A partir desta primeira sequência, pequena variabilidade foi encontrada para o isolado SP (IV) referente à amostra do parasito isolado de peixe procedente de Pirassununga-SP, que apresentou substituições nucleotídicas nas posições 783, 847, 855, 865, 1050, 1074 e 1255 com relação aos demais. O isolado SC (II) do município de Paulo Lopes-SC apresentou a inserção de uma adenina na posição 846, ocasionando um gap

para as outras amostras (Tabela 3). Na figura 8 evidenciamos o alinhamento em Clustal W das sequências do gene 18S, porém em comparação com as sequências dos isolados depositados no GenBank proveniente do Canadá (U 17354) e dos Estados Unidos (KJ 690572) indicando regiões de polimorfismo.

Tabela 3 - Alinhamento das sequências referentes ao gene 18S dos isolados dos diferentes estados brasileiros, com indicação das inserções e substituições nucleotídicas. Os gaps são indicados com asteriscos (*).

Procedência dos isolados (18S)	Posições dos nucleotídeos							
	783	846	847	855	865	1050	1074	1255
SP (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
SP (II)	G	*	G	C	G	G	G	A
SP (III)	G	*	G	C	G	G	G	A
SP (IV)	A	*	A	A	C	C	C	T
MG (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
MG (II)	G	*	G	C	G	G	G	A
SC (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
SC (II)	G	A	G	C	G	G	G	A
GO (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
MS (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
PA (I)	G	*	G	C	G	G	G	A
PA (II)	G	*	G	C	G	G	G	A

Fonte: Própria autoria

Figura 7- Sequências de nucleotídeos alinhadas em Clustal W para o gene 18S dos doze isolados brasileiros em comparação com isolados depositados no Genbank, oriundos do Canadá (U 17354) e dos Estados Unidos (KJ 690572).

Fonte: Própria autoria.

O alinhamento apresentado na figura 7 mostra os isolados brasileiros com os isolados oriundos do Canadá (U 17354) e dos Estados Unidos (KJ 690572), quando esta análise é realizada, podemos notar que para o isolado SP (IV) em comparação com as demais sequências alinhadas, esta amostra apresenta duas adeninas e uma citosina inseridas, o que diferem das demais amostras comparadas.

Para a construção da matriz de similaridade foram usadas as duas sequências disponíveis do 18SrDNA de *I. multifiliis* do Genbank, uma proveniente de isolados do Canadá (U 17354) e outra dos Estados Unidos (KJ 690572) (Tabela 4).

Entre os isolados alvos deste estudo, peixes provenientes de diferentes localidades no Brasil, apenas o isolado SP (IV) mostrou divergência de 0,5% dos outros isolados.

Quando comparados os isolados brasileiros com o isolado do Canadá, somente 0,1% de divergência foi encontrada. Já para amostra SP (IV) 0,5% de divergência é evidenciada em relação aos demais isolados brasileiros.

Tabela 4 - Matriz de similaridade, baseada na estimativa das divergências evolutivas entre as sequências de 18S de *I. multifiliis*. O triângulo superior corresponde ao número de bases que difere entre os isolados e o triângulo inferior corresponde à diferença genética em porcentagem entre as amostras comparadas. Programa MEGA (versão 5.2).

Isolados	MG(I)	MG(II)	SC(I)	SC(II)	MS(I)	SP(I)	SP(II)	SP(III)	SP(IV)	GO(I)	PA(I)	PA(II)	Ich.CA	Ich.USA
MG(I)	*	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0
MG(II)	0,0	*	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0
SC(I)	0,0	0,0	*	0	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0
SC(II)	0,0	0,0	0,0	*	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0
MS(I)	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	0	0	7	0	0	0	1	0
SP(I)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	0	7	0	0	0	1	0
SP(II)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	7	0	0	0	1	0
SP(III)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	7	0	0	0	1	0
SP(IV)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	*	7	7	7	1	1
GO(I)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	0	1	0
PA(I)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	1	0
PA(II)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	1	0
Ich.CA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	*	1
Ich.USA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	*

Ich.CA: isolado de *I. multifiliis* Canadá acesso (U17354) Ich.USA: isolado *I. multifiliis* Norte Americano acesso (KJ690572) ambos referentes ao gene 18S.

Análises conduzidas utilizando-se Kimura 2 parâmetros, com 1000 replicações e modelo de substituição nucleotídica.

Fonte: Própria autoria

Nos estudos das distâncias genéticas realizadas, nota-se que a topologia gerada pelo método de Neighbor-Joining, revelou que o isolado Norte Americano se agrupou no mesmo clado com os isolados brasileiros, apesar da pouca diferença. O isolado de *I. multifiliis* oriundo do Canadá agrupou em um ramo distinto (Figura 8).

Figura 8 – Distâncias genéticas das sequências do rDNA 18S de isolados de *I. multifiliis* brasileiros e das sequencias depositadas no GenBank dos USA (KJ690572) e Canada(U17357). Método de Neighbor-Joining.

Fonte: Própria autoria.

6.3 Sequências Parciais do rDNA de *I. multiliis* (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S)

As sequências parciais do rDNA foram assim denominadas para evidenciar as sequências que abrangem o final do gene 18S (extremidade 3'), o espaço intergênico ITS1, o gene 5.8S, o segundo espaço intergênico ITS2 e parte inicial do gene 28S (extremidade 5'). Esta sequência contém 562 pb sendo analisadas em conjunto para facilitar a comparação com as poucas sequências depositadas no Genbank (DQ 270016.1 e AY029274.1) também consideradas parciais pelos autores que registraram as sequências.

O alinhamento das sequências de isolados brasileiros não revelou a ocorrência de deleções ou inserções, porém, substituições de algumas bases ocorreram.

Para o gene 5.8S, um único nucleotídeo, uma Guanina, foi encontrada na posição 1560 para o isolado MG(II), em relação aos 2912 bp totais do rDNA, diferindo dos demais que apresentaram uma Timina (Tabela 5).

Já a posição 1840 do ITS2 apresenta uma Citosina para o isolado SC (II) e uma Timina para cada um dos isolados oriundos de Santarém no Pará PA (I) e PA (II) e uma Guanina para os demais isolados (Tabela 5).

Para o espaçador intergênico 1 e o gene 28S não foram encontradas diferenças na composição nucleotídica dos isolados das 6 regiões avaliadas.

Tabela 5 - Alinhamento das sequências referentes às sequências parciais dos isolados dos diferentes estados brasileiros, com indicação das substituições nucleotídicas.

Procedência dos isolados	Posição nucleotídica	
	(5.8S)	(ITS2)
	1560	1840
SP (I)	T	G
SP (II)	T	G
SP (III)	T	G
SP (IV)	T	G
MG (I)	T	G
MG (II)	G	G
SC (I)	T	G
SC (II)	T	C
GO (I)	T	G
MS (I)	T	G
PA (I)	T	T
PA (II)	T	T

Fonte: Própria autoria

Para a matriz de similaridade foram usadas as sequências depositadas no GenBank, também parciais, da China (DQ270016.1) e Austrália (AY0292274).

A divergência entre as amostras estudadas varia de 0% a 0,2%. Quando comparado os isolados brasileiros com o isolado da China, os isolados SC (II), PA(I) e PA(II) apresentam 1,2% de divergência (Tabela 6).

Já quando comparados com isolados depositados de *I. multifiliis* do GenBank™ de países como China (DQ270016.1) e Austrália (AY0292274) foi possível observar que o número de bases que difere entre os isolados destacam-se os valores mais relevantes entre o isolado chinês com os isolados brasileiros. Resultados estes apresentados no triângulo superior da tabela 6.

Ressaltando que as sequências depositadas não possuem o mesmo tamanho que as avaliadas neste estudo.

Os resultados das distâncias genéticas, com a topologia gerada pelo método de Neighbor-Joining, revelou que o isolado da Austrália se agrupou no mesmo clado com os isolados brasileiros das diferentes regiões avaliadas. O isolado de *I. multifiliis* oriundo da China se agrupou em um clado distinto, apesar da pequena diferença (Figura 9).

Tabela 6 - Matriz de similaridade, baseada na estimativa das divergências evolutivas entre as sequências do 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S de *I. multifiliis*. O triângulo superior corresponde ao número de bases que difere entre os isolados o triângulo inferior corresponde à diferença genética em porcentagem entre as amostras comparadas. Programa MEGA (versão 5.2).

Isolados	MG(I)	MG(II)	SC(I)	SC(II)	MS(I)	SP(I)	SP(II)	SP(III)	SP(IV)	GO(I)	PA(I)	PA(II)	Ich.CH	Ich.AU
MG(I)	*	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	6	0
MG(II)	0,2	*	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
SC(I)	0,0	0,2	*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
SC(II)	0,2	0,2	0,2	*	0	0	0	0	0	0	1	1	7	0
MS(I)	0,0	0,2	0,0	0,0	*	0	0	0	0	0	1	1	6	0
SP(I)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	*	0	0	0	0	1	1	6	0
SP(II)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	0	0	1	1	6	0
SP(III)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	0	1	1	6	0
SP(IV)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	0	1	1	6	0
GO(I)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	*	1	1	6	0
PA(I)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	*	1	7	0
PA(II)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	*	7	0
Ich.CH	1,1	0,4	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	*	5
Ich.AU	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	*

Ich. CH: isolado *I. multifiliis* China acesso (DQ270016), Ich AU: isolado *I. multifiliis* Austrália acesso (AY0292274) ambas referente às sequencias parciais.

Análises conduzidas utilizando-se Kimura 2 parâmetros, com 1000 replicações e modelo de substituição nucleotídica

Fonte: Própria autoria

Figura 9 - Distância Genética das sequências parciais (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S) de isolados de *I. multifiliis* brasileiros e das sequências depositadas no GenBank da China ((DQ270016.1) e Austrália (AY0292274). Método de Neighbor-Joining.

Fonte: Própria autoria.

6.4 Sequências do rDNA 28S obtidas de *I. multifiliis*

Dos 1024 pb alinhados referente ao gene 28S de todos os isolados deste estudo não foram encontradas deleções, inserções ou substituições nucleotídicas entre eles. Resultados confirmados com o sequenciamento em duplicata, e análise em eletroferograma.

Ressaltamos a dificuldade para comparação e alinhamento do gene 28S, já que no banco de dados Genbank existe um único depósito de um isolado Norte Americano (EU 185635.1), o qual quando alinhado com as sequências brasileiras não demonstram compatibilidade no alinhamento, já que a porção de homologia entre as sequências são pequenas.

O padrão de ramos da árvore obtida não foi adequada, o que é justificado por Snel, Huynen e Dutilh (2005), que relatam que genes conservados podem

refletir em árvores filogenéticas com histórias evolutivas dos organismos pouca informativa.

6.5 Avaliações através do Programa *Tree-Puzzle*

Além das avaliações das divergências de bases ao longo das sequências avaliadas neste estudo, utilizamos também uma avaliação em Maximum Likelihood (Programa Tree Puzzle versão 5.2), este programa avalia a reconstrução de árvores filogenéticas de dados moleculares através de algoritmos de busca rápida nomeado de “quartet-puzzling”, e também calcula a distância de máxima verossimilhança aos pares de acordo com o número de modelos de substituições nucleotídicas (SALEMI, 2003).

O referido método avalia grupos de quatro sequências aleatoriamente escolhidas (quartetos) através de Maximum Likelihood. Possíveis topologias de árvores não enraizadas para cada quarteto são calculadas e os valores associados são então plotados usando coordenadas triangulares, de maneira que cada vértice do triângulo representa uma topologia completamente resolvida.

As Figuras 10, 11 e 12 representam respectivamente um método gráfico de mapeamento em Likelihood (Likelihood mapping) que possibilita visualizar o conteúdo filogenético de um conjunto de sequências alinhadas, ou seja, as três probabilidades são representadas dentro de um triângulo equilátero repartido em diferentes regiões, onde a distribuição resultante de pontos mostra se os dados são adequados para uma reconstrução filogenética ou não. O valor mínimo da somatória das porcentagens indicadas nos vértices é igual a 80%.

Portanto nas figuras 10, 11 e 12 a soma dos percentuais dos vértices não atingiu o valor mínimo requerido para que apresente conteúdo filogenético.

Figura 10 – Diagrama em mapping Likelihood referente ao gene 18S de *I. multifiliis* dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2

Fonte: Programa Tree Puzzle (Versão 5.2)

Figura 11 - Diagrama em mapping Likelihood referente às sequencias parciais (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) de *I. multifiliis* dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2

Fonte: Programa Tree Puzzle (Versão 5.2)

Figura 12 – Diagrama em mapping Likelihood referente às sequências do gene 28S de *I. multifiliis* dos estados brasileiros amostrados e analisados através do programa Tree-Puzzle 5.2

Fonte: Programa Tree Puzzle (Versão 5.2)

7. DISCUSSÃO

A vantagem da utilização de regiões do rDNA é a presença de um número elevado de cópias em todo genoma, além das diferentes taxas de evolução detectadas em suas distintas regiões. Para Hills e Dixon (1991), a codificação do 18S (menor subunidade) e 28S (maior subunidade) são altamente conservados e adequados para verificar a variação interespecífica. Esses mesmos autores relatam ainda que as regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2) são menos conservadas entre espécies do que os genes de rDNA e, por conseguinte, adequados para a caracterização de organismos estreitamente relacionados como espécies filogeneticamente diferentes do mesmo gênero.

No entanto, no nosso estudo, mostraram baixa porcentagem genética entre as amostras comparadas para o gene 18S (Tabela 4), assim como para as sequências parciais (Tabela 6). O que é justificado por Clark (2006), que relata que em eucariotos o rDNA (18S) evolui em taxas lentas e assim pode ser utilizado como marcadores confiáveis para a identificação dentro da espécie, porém para algumas análises, sequências de rDNA por si só não são suficientes, sendo necessário a amplificação de genes codificadores de proteínas.

Apesar da grande distância geográfica entre as regiões brasileiras, entre os isolados de *I. multifiliis* coletados de pisciculturas e ambiente natural foi encontrada baixa variabilidade para os parâmetros avaliados.

O mesmo foi verificado por Sun *et al.* (2006) que trabalharam com sete isolados de *Cryptocaryon irritans* e dois isolados de *I. multifiliis* de localizações geográficas distintas na China e oriundos de diferentes hospedeiros, encontrando baixa variabilidade genética para ITS1 e ITS2, 1,4% e 1,0% respectivamente para o *I. multifiliis*. Para 7 isolados de *C. irritans* nenhuma variação foi encontrada para o primeiro espaçador (ITS1) e, para o segundo espaçador (ITS2), esta foi de 1,6%.

Os ciliados *Paramecium sp.* e *Tetrahymena sp.* isolados de distantes regiões geográficas, as sequências de ITS1 e ITS2 mostraram-se bastante conservadas (BARTH *et al.*, 2006; LYNN; STRUDER-KYPKE, 2006). Camacho (2010) verificou que não houve variação genética entre os isolados de *I. multifiliis* da região rDNA (18S, ITS1 e ITS2) oriundos de 4 diferentes localidades (USA, Dinamarca, China e Escócia). A baixa variabilidade encontrada na região de

ITS1 e ITS2 sugere que se relacionam com o efeito de homogeização de reprodução sexuada por conjugação observada em outras espécies de ciliados (PRESCOTT, 1994). Já MacColl et al (2015) relatam que, existem grandes lacunas na compreensão tanto do ciclo de vida e estrutura da população de *I. multifiliis* em estado selvagem. Por exemplo, a conjugação nesta espécie não é clara, em comparação com os bem estudados ciliados de vida livre *Tetrahymena thermophila* e *Paramecium tetraurelia*.

Young e Coleman (2004) relatam que a região de ITS2 é mais adequada para comparação de gêneros e espécies. Sendo assim as regiões dos espaçadores internos (ITSs) resultam de uma série de modificações e clivagens pós-transcricionais, o que é relatado em vários estudos com diferentes organismos, como Álvares e Wendel (2003) que reforçam a ocorrência de clivagens nos ITSs de plantas superiores, durante o processo de maturação da menor subunidade ribossomal e maior subunidade, assim como Raynal, Michot e Bachellerie (1984) analisaram e discutiram a existência de clivagem nos ITS para camundongos, definindo assim sequências primárias nesses mamíferos para o processamento do rRNA e comparando com outros eucariotos. Porém Coleman (2003) afirma que a estrutura secundária de ITS2 já foi determinada para uma grande variabilidade de grupos eucariotas, tanto vegetais como animais, deixando claro que todos estes grupos partilham a mesma estrutura secundária global. No entanto, é importante resaltar que eventuais limitações funcionais podem afetar a divergência evolutiva da região de ITS.

Como evidenciado anteriormente, o ITS1 é um importante local de processamento do 45S (LSU) do pré-rRNA, sendo que o ITS1 contém regiões centrais complementares susceptíveis a formação de hairpins (estrutura em forma de grampos).

Em vertebrados como ciprídeos, camundongos e sapos, este local de processamento foi detectado próximo ao gene 18S e 5.8S (extremidade 5' do rRNA) sugerindo que o ITS1 possa ser responsável pela geometria espacial da molécula (estrutura secundária), o que leva a variações consideráveis em tamanho da sequência, sugerindo que esta estrutura secundária seja necessária para realização do processo de maturação do precursor do rRNA (PLEYTE; DUNCAN; PHILLIPS, 1992). Kelchner e Wendel (1996) corroboram a existência de inversões de até 4 pb em plantas do gênero Poaceae, associados com

estruturas secundárias sinuosa, inferidas a partir da análises comparativas de sequências, sendo que as sequências invertidas compreendem circuitos internos de hairpins.

Essa alteração de estrutura pode ser notada em implicações nas análises de distância genética, o que não ocorreu neste estudo, dada a pouca variabilidade dos genes 18S e as sequências parciais abordadas, sendo que, a distância geográfica avaliada, os isolados brasileiros agruparam-se no mesmo clado. Vários estudos demonstram o *I. multifiliis* como organismo externo em comparações filogenéticas (DIGGLES; ADLARD, 1997; SUN, 2006; WRIGHT; LYNN, 1995) com outros ciliados como *Ophryoglena sp*, *Cryptocaryon irritans* e *Tetrahymena thermophila*. Uma das dificuldades encontradas para comparações das sequências brasileiras foi à padronização de um único organismo como grupo externo.

Vários parasitos que infectam peixes como os mixosporídeos são bastante específicos, ao contrário de, *I. multifiliis* que é considerado um ciliado com pouca especificidade pelo hospedeiro. Este estudo corrobora com esta informação, já que foram avaliados isolados de diferentes hospedeiros e os resultados indicam não haver correlação entre os hospedeiros e o parasito em estudo, para os parâmetros avaliados. Por outro lado, Atkinson e Bartholomew (2010), avaliando *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) para diferentes espécies de peixes, relatam que o padrão de infecções de *C. shasta* refletiu a presença de múltiplas estirpes com diferentes associações de hospedeiros, com o uso de marcadores específicos (ITS1) para as estirpes.

Desta forma, não levamos em consideração os hospedeiros citados das diferentes regiões de coleta, na construção filogenética, ao contrário de Fiala (2006) que em estudo com o gênero *Myxoa* relatou que a árvore filogenética deste grupo difere em vários aspectos e conclui que a dependência de um único gene pode não refletir adequadamente a filogenia do grupo.

Ainda que poucas diferenças tenham sido encontradas entre as sequências de rDNA obtidas neste estudo, um importante resultado foi o desenho e a síntese de primers específicos para *I. multifiliis* de isolados brasileiros, que possibilitou a amplificação de uma grande região do DNA ribossomal (18S a 28S), além da otimização de uma temperatura de anelamento (62°C) e concentração de magnésio (2,5 mM de MgCl₂). Estes podem corroborar com o desenvolvimento

de teste usando PCR para o diagnóstico do parasito em tecidos de peixes infectados. A melhora da detecção do parasito favorece o diagnóstico precoce, fornecendo informações mais precisas e contribuindo para melhor classificação taxonômica destes. Assim como Chen et al. (2008) que desenvolveram um ensaio de PCR com primers específico para amplificar o ITS2 como método para a detecção do ciliado *Cryptocaryon irritans*, para tal estudo este autores desenvolveram uma infecção laboratorial e com padronização de temperatura de anelamento (53°C), concentração de magnesio (3,0 mM de MgCl₂) e utilização de ciliados de outras espécies como controle, concluíram que este ensaio apresentou-se como uma ferramenta útil para identificação do parasito. Souza et al. (2008) que utilizaram métodos moleculares baseados em PCR para validar a detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* bactéria causadora da pleuropneumonia suína. Além Muegues, Geduspan e Caipang (2013) que otimizaram protocolos de PCR para três diferentes vírus, que acometem camarões em produção nas Filipinas, onde várias temperaturas de anelamento foram testadas e os iniciadores específicos para o vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Viral-WSSV) foram sintetizados, corroborando com este estudo. Portanto o sequenciamento e a padronização da técnica deste trabalho poderá fornecer maiores subsídios para futuros estudos genéticos e moleculares de *I. multifiliis*.

Swennes et al. (2006), em estudos para identificação de isolados de *I. multifiliis* compararam diferentes sorotipos e evidenciaram a virulência do parasito, concluindo que os diferentes sorotipos se mantem constantes nos isolados, fazendo uso de anticorpos monoclonal para esta identificação. Para o controle de qualidade (AGUILERA-MUNÑOZ; MUNHÑOZ; ESCÁRATE, 2008) fizeram uso de marcadores moleculares para as regiões de ITS1 e ITS2 com o objetivo de diagnosticar diferentes espécies comerciais de moluscos no Chile.

Camacho (2010) trabalhando com marcadores ribossomais e com fragmentos de marcadores mitocondriais (COI) relata que este último é capaz de solucionar variações genéticas, não somente entre isolados de *I. multifiliis*, mas também entre populações e que o mesmo pode ser uma alternativa em relação aos marcadores rDNA, já que pode ser utilizado para determinar variações intraespecíficas. MacColl et al. (2015) em comparações de sequências nucleotídicas de 18S e da subunidade I mitocondrial (NADH desidrogenase I)

para 9 isolados de *I. multifiliis* oriundos de 4 localidades na América do Norte, mostraram que as sequências mitocondriais foram eficazes para distinguir os isolados, em dois grupos distintos geneticamente.

As análises em Tree-Puzzle confirmam a homogeneidade das sequências, não apresentando conteúdo filogenético, tanto para o gene 18S que apresentou conteúdo filogenético menores que 80%, quanto para os dados parciais (18S-ITS1-5.8S-ITS2 e 28S). Hills e Dixon (1991), reforçam esta afirmação que as melhores regiões do DNA para estudos filogenéticos são aquelas que possuem similaridade maior que setenta e menor que cem por cento. Prezotto (2008) relata que a escolha da sequência apropriada é o passo mais crítico para uma análise filogenética, sendo assim, sequências muito conservadas as diferenças não serão suficientes para uma análise adequada. Por outro lado, regiões muito variáveis são difíceis de alinhar, além de gerarem alinhamentos questionáveis.

Kishino e Hasegawa (1989) utilizaram esta mesma metodologia em Maximum Likelihood das sequências de DNA de primatas (Hominoidea), para posterior avaliação da ramificação desses vertebrados, assim como Sun (2011) que em estudos associado à infecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* chytrid (BD) em anfíbios, também se utilizou de avaliações em maximum likelihood para determinar a distância dos genes da referida infecção.

Embora a distinção de isolados não tenha sido possível utilizando-se marcadores de rDNA, o sequenciamento, o protocolo otimizado e o depósito (registro no GenBank 1875115) das sequências concatenadas do 18S ao 28S de *I. multifiliis* isolados de peixes de diferentes estados no Brasil, fornecem informações sobre o isolado brasileiro, sendo estas, as primeiras sequências depositadas para esta espécie no país, permitindo análises de distância genética e similaridade mais precisas em estudos futuros, pela incorporação de mais sequências.

8. CONCLUSÃO

Na parasitologia, os marcadores moleculares ribossomais têm se constituído em ferramentas úteis para a caracterização de espécies, complementando os tradicionais estudos morfológicos. A proposta deste estudo foi identificar através dos marcadores moleculares ribossomais isolados de *I. multifiliis* procedentes de diferentes regiões do Brasil desta forma podemos concluir:

- As sequências de *I. multifiliis* deste estudo apresentaram similaridades entre as diferentes regiões brasileiras;
- As regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 para as sequências brasileiras de *I. multifiliis* deste estudo não apresentaram diferenças intraespecíficas;
- As sequências brasileiras de *I. multifiliis* apresentam similaridades com as sequências depositadas em banco de dados de países como China, Austrália e Estados Unidos.
- Os programas de similaridade e distância genética reforçaram a conservação das sequências estudadas dos *I. multifiliis* das diferentes regiões brasileiras.

9. REFERÊNCIAS

ABERNATHY, J.W. et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from the ciliate protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **BMC Genomics**, Auburn, v.8, p.1-10, 2007.

ADRIANO, E. A. et al. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Heneguya multiplasmodialis* n.sp. infecting *Pseudoplatystoma* ssp. in Brazilian Pantanal wetland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, p. 110-120, 2012.

ADRIANO, E. et al. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 221-229, 2009.

AGUILERA-MUNÓZ, F.; MUNHÓZ, V. V.; ESCÁRATE, G. C. Authentication of commercial chilean mollusks using ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as specie-specific DNA marker. **Gayana**, Concepcion, v. 72, p. 178-187, 2008.

AIHUA, L.; BUCHMANN, K. Temperature dependent and salinity dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, v. 17, p. 273-276, 2001.

ÁLVAREZ, I. WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic interference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.29, p.417-434, 2003.

ATKINSON, S.; BARTHOLOMEW, J. Desperate infection patterns of *Ceratomyxa Shasta* (Myxozoa) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) correlate with internal transcribed spacer-1 sequence variation in the parasite. **International Journal for Parasitology**, London, v. 40, p. 599-604, 2010.

BARTH, D. et al. Intraspecific genetic variation in paramecium revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 53, p. 20-25, 2006.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Produção e pecuária**. 2014. Disponível em: <<http://www.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2015.
BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. **Produção pesqueira e aquícola- estatística**. 2010. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

CAMACHO, P. M. S. **Developing strategies for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (CILIOPHORA)**. 2010 258 f. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) - Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, 2010.

- CAMARGO, O. G. S.; POUEY, F. O. L. J. Aquicultura um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, p. 393-399, 2005.
- CARNEIRO, F.C.P.; SCHORER, M.; MIKOS, D.J. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiás (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.99-102, 2005.
- CHEN, W. et al. Development of specific PCR assays for detection of *Cryptocaryon irritans*. **Journal of Parasitology Research**, New York, v. 103, p. 423-427, 2008.
- CLARK, G.T. Molecular Approaches and Techniques. **Fish diseases and disorders**, Walling: Cab International v. 1, p.725-752, 2006.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is an double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, Kidlington, v. 19, p. 370-375, 2003.
- CREPALDI, V. D. et al. A situação da aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v, 30, n. 3/4, p. 81-85, 2006.
- DICKERSON, H. W. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: WOO, P. T. K. **Fish disease and disorders**. Walling: Cab International v. 1, p. 116-153, 2006.
- DIGGLES, K. B.; ADLARD, D. R. Intraspecific variation in *cryptocaryon irritans*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 44, p. 25-32, 1997.
- EIRAS, J. C. et al. **Fish diseases**. Enfield, NH: Science Publishers, 2008. v. 1, 1312 p.
- EKANEM, P. A. et al. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 92, p. 361-366, 2004.
- ELDER JR., J. F.; TUNER, J. B. Concerted evolution of repetitive DNA sequence in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, Baltimore, v. 70, p. 297-320, 1995
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220p.
- FIALA, I. The Phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. **International Journal for Parasitology**, London, v. 36, p. 1521-1534, 2006.
- FLOYD, F. R.; REED, P. ***Ichthyophthirius multifiliis* (White Spot) infections in fish**. Document Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences,

University of Florida. Review. 2009. Disponível em:<<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso: 25 abr. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Fisheries department**. 2007. Disponível em:<<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

FORWOOD, M. J. et al. Life cycle and settlement of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 from rainbow trout. **Folia Parasitologica**, Czeske Budejovice, v. 62, p. 1-5, 2015.

GHIRALDELLI, L. et al. Infecção com trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) em *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) como hospedeiro experimental. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 8, n. 1, p. 105-110, 2007.

HASHIMOTO, C.J. et al. Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Inglaterra, v.20 p.273-294, 2011.

HEINECKE, R. D.; BUCHMANN, K. Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: dose-response studies. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, p. 32-35, 2009.

HERWERDEN, L.; BLAIR, D.; AGATSUMA, T. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetics studies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.12, p.67-73, 1999.

HILLS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, Baltimore, v. 66, p. 411-435, 1991.

JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Métodos para coleta de parasitos de peixes. **Circular Técnico Embrapa**, Macapá, AP, n. 39, p. 1-8, 2011.

JOUSSEON, O. et al. Non-Invasive detection and quantification of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* by real-time PCR. **Disease of Aquatic Organism**, Oldendorf, v. 65, p. 251-255, 2005.

KELCHNER, S. A.; WENDEL, F. J. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 30, p. 259-262, 1996.

KISHINO, H.; HASEGAWA, M. Evaluation of the maximum like hood estimated of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 29, p. 170-179, 1989.

KUMAR, P. L.; FENTON, B.; JONES, A. T. Identification of *Cecidophyopsis mites* (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 8, n. 3, p. 347-357, 1999.

LEMOS, J. R. G. et al. Parasitos nas brânquias de *Brycon amazonicus* (Characidae Bryconinae) cultivados em canais de iguarapé do Turumã-Mirim, estado do Amazonas, Brasil. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 29, p. 217-222, 2007.

LYNN, D. H.; STRUDER-KYPKE, M. C. Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rDNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome c oxidase I gene sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 53, p. 385-387, 2006.

MAcCOLL, E. et al. Molecular genetic diversity and characterization of conjugation genes in the fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 86, p. 1-7, 2015.

MENEZES, P. J. et al. Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrole 56uarto) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* isolates. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 132-139, 2009.

MILANIN, T. et al. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* n.sp., parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 762-9, 2010.

MUEGUE.S.F.M.; GEDUSPAN, S.J.; CAIPANG, A.M.C.Optimization of PCR protocols for the detection of viral pathogens in shrimp aquaculture in Philippines.Europen Journal of Experimental Biology, Jaipur, v.3, p.270-275, 2013.

MUEGUE.S.F.M.; GEDUSPAN, S.J.; CAIPANG, A.M.C.Optimization of PCR protocols for the detection of viral pathogens in shrimp aquaculture in Philippines.Europen Journal of Experimental Biology, Jaipur, v.3, p.270-275,2013.

NALDONI, J. et al. Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp in Pantanal Wetland, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 177, p. 247-255, 2011.

NORONHA,S.C.A. et al. Caracterização Molecular de Populações de *Euseius citrifolius* Denmark & Muma e *Euseius concordis* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) utilizando o sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2.**Neotropical Entomology**,Goiás, v.32, p.591-596, 2003.

OGUT, H.; ABDURREZAK, A.; MEHMET, Z. A. Seasonality of *Ichthyophthirius multifiliis* in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms of the eastern black sea

region of Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Trabzon, v. 5, p. 23-27, 2005.

PAPEMA, I. Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annu. Rev. Fish Disease*, Oxford, v.1, p.155-194, 1991.

PLEYTE, A. K.; DUNCAN, D.; PHILLIPS, R. evolutionary relationship of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v.1, p. 223-230, 1992.

PORTER, C. H.; COLLINS, F. H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera, Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfiels, v. 45, p. 271-279, 1991.

PRESCOTT, D. M. The DNA of ciliated protozoa. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 58, p. 233-267, 1994.

PREZOTTO, F. L. **Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae)**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAYNAL, F.; MICHOT, B.; BACHELLERIE, P. J. Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene: comparison with other available homologs. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 167, p. 263-268, 1984.

SALEMI, M. Practice: the phylip and tree-puzzle software packages. In: SALEMI, M.; VANDAMME, A, M. **The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny**. New York: Cambridge University, 2003. p. 88.

SANT'ANA, F. J. F. et al. Surtos de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Henneguya spp.* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) criados intensivamente no sudoeste de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 121-125, 2012.

SCHÖTTERER, C. et al. Comparative evolutionary analysis of rDNA, ITS region in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 11, p. 513-522, 1994.

SNEL, B.; HUYNEN, M. A.; DUTILH, B. E. Genome tree and nature of genome evolution. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 191-209, 2005. SOUZA, K.K et al. Optimization of PCR technique for detection of *Actionobacillus pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.2239-2244, 2008.

SOUZA, V. N. et al. Metodologia de infecção experimental e grau de susceptibilidade do híbrido "tambacu" e *Leporinus macrocephalus* Garavello &

Britski (Osteichthyes, Anostomidae) a quarto inóculos de trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (Protozoa, Ciliophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 803-811, 2001.

SUN, G. et al. Evidence for acquisition of virulence effectors in pathogenic chytrids. **BMC Evolutionary Biology**, Auburn, v.11, p.1-9, 2011.

SUN, H. Y. et al. Characterization of *Cryptocaryon irritans* isolates from fishes in Mainland China by ITS ribosomal DNA sequences. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 99, p. 160-166, 2006.

SWENNES, A. G. et al. Difference in virulence between two serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 69, p. 227-232, 2006.

SWENNES, A. G. et al. Difference in virulence between two serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 69, p. 227-232, 2006.

TAMURA, K. et al. MEGA 5.2: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANCREDI, K. R.; GONÇALVES, T. L. E.; BRUM, A. Hemato-immunological and biochemical parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 45, p. 689-694, 2015.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I Protozoário. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 18, supl. 1, p. 67-79, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UEDA, H. B. et al. Parasites of the freshwater fish trade in Brazil: science metric study. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 851-854, 2013.

WEI, J. Z.; LI, H.; YU, H. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 91-101, 2013.
WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. Wallingford: CAB International, 2006. 791 p. v. 1.

WRIGHT, A. G.; LYNN, D. H. Phylogeny of the Fish Parasite *Ichthyophthirius* and its relatives *Ophryoglena* and *Tetrahymena* (Ciliophora, Hymenostomatia)

inferred from 18S Ribosomal RNA Sequence. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 12, p. 285-290, 1995.

XU, H. D.; KLEISIUS, H. P.; PANANGALA, S. V. Induced cross-protection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 29, p. 131-138, 2006.

YAMBOT, A. V.; SONG, Y. L.; SUNG, H. H. Characterization of *Cryptocaryon irritans*, a parasite isolated from marine fishes in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 54, p. 147-156, 2003.

YOUNG, I.; COLEMAN, W. A. The Advantage of the ITS2 region of nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationship of insects a *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 30, p. 236-242, 2004.

ZHANG, Q.; XU, H. D.; KLEISIUS, H. P. Evaluation of na antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 198, p. 45-53, 2013.