UNOPAR
Universidade
Norte do Paraná

Universidade
Estadual de Londrina

MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES

GUSTAVO FREIRE FIGUEIRA

Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil

Arapongas
2014

GUSTAVO FREIRE FIGUEIRA

Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil

Defesa de qualificação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção de Ruminantes da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – em associação com o Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley

Arapongas
2014

GUSTAVO FREIRE FIGUEIRA

Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil

Defesa de qualificação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção de Ruminantes da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – em associação com o Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina
Orientador

_____
Prof. Dr. Gino Chaves da Rocha
Universidade de Brasília

_____
Prof. Dr. Werner Okano
Universidade Norte do Paraná

Arapongas, 23 de Abril de 2014

Dedico este trabalho

a minha família e

amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e por me proporcionar este momento de realização ao alcançar o objetivo que tanto desejava.

À minha mãe e minha família, pelo apoio e carinho recebido não só durante todo este período, mas por toda minha existência a qual sempre estiveram comigo em todos os momentos me fazendo forte nos momentos de fraqueza.

Ao Professor Dr. Selwyn Arlington Headley, meu orientador, pela dedicação, paciência, e por acreditar e me incentivar na elaboração deste trabalho.

Ao Professor e coordenador Dr. Werner Okano, pela amizade, incentivo, oportunidades e paciência, durante toda a graduação e agora neste período da pós-graduação.

Ao Professor e colega de turma, Juarez Cesar Borges de Aquino (*In memoriam*), pela amizade e incentivo.

A todos os professores, funcionários e alunos da UNOPAR e UEL, pela ajuda e motivação e por terem sido essenciais nesta caminhada, em especial a Alessandra Taroda do laboratório de parasitologia veterinária/UEL e ao Victor Henrique Silva de Oliveira do laboratório de Biologia Molecular/UEL.

À Universidade Norte do Paraná – UNOPAR e à Universidade Estadual de Londrina – UEL, pela oportunidade de aprendizado acadêmico, profissional e pessoal.

A todos os colegas de turma do mestrado, pela amizade, companheirismo, que fizeram com que esta etapa de aprendizado fosse mais prazerosa.

A todos os amigos e companheiros que me acompanham nesta jornada pela vida.

E a todos que direta ou indiretamente me apoiaram neste trabalho, o meu muito obrigado.

“Aprendi que se depende sempre

De tanta muita diferente gente

Toda pessoa sempre é as marcas

Das lições diárias de outras tantas pessoas”

(Gonzaguinha)

FIGUEIRA, Gustavo F. **Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil.** 2014. 40p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2014.

RESUMO

A euritrematose em ruminantes pode ocasionar perdas econômicas relacionadas à diminuição da produção de carne e leite. Esta parasitose já foi descrita em várias partes do mundo e em alguns estados do Brasil. Existem onze espécies do gênero *Eurytrema* spp. No Brasil de acordo com analises morfológicas feitas por alguns autores, a que ocorre é o *Eurytrema coelomaticum*. Usualmente em bovinos a parasitose é assintomática sendo, portanto, de difícil diagnóstico clínico. Normalmente este parasito só é detectado no momento do abate na inspeção *post-mortem*, o que dificulta seu controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Eurytrema* spp. em bovinos no estado do Paraná por meio da análise da sequência parcial do gene 18S rRNA comparando-a com a análise morfológica. Trematódeos procedentes de 44 pâncreas bovinos provenientes do estado do Paraná foram coletados e classificados com base em aspectos morfológicos típicos. A técnica de PCR e a análise da sequência de nucleotídeos dos produtos amplificados confirmaram que os trematódeos classificados como *Eurytrema coelomaticum* eram filogeneticamente distintos daqueles identificados como *E. pancreaticum*. Os resultados desse estudo representam a primeira caracterização molecular de *E. coelomaticum* nas Américas e disponibiliza um método eficiente para diferenciar trematódeos digenéticos em animais domésticos.

Palavras-chave: Trematódeo bovino; Euritrematose; Sequenciamento; filogenia.

FIGUEIRA, Gustavo F. **Molecular Characterization of *Eurytrema coelomaticum* in cattle from Paraná, Brazil.** 2014. 40p. Dissertation (Master's Science degree in health and production of Ruminants) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2014.

ABSTRACT

Eurytrematosis can result in economic losses related to decreased meat and milk production in ruminants, this parasitism has been described worldwide and in some States of Brazil. Usually in healthy animals, this parasite does not cause pathological lesions and is difficult to diagnose clinically, and is only detected during *post-mortem* inspection at slaughter, which makes difficult their control. In Brazil, *Eurytrema coelomaticum* has been identified based on morphological analysis. The aim of this study was to evaluate the occurrence of *Eurytrema* spp. in cattle from the State of Paraná by analysis of partial 18S rRNA gene sequence by comparing it with the morphological analysis. Trematodes from 44 bovine pancreas were collected and classified based on typical morphological features. PCR assay and sequence analyses of amplified products confirmed that the trematodes classified as *E. coelomaticum* were phylogenetically distinct from those identified as *E. pancreaticum*. The results of this study represent the first molecular characterization of *E. coelomaticum* within the Americas, and provide an efficient method to differentiate digenean trematodes of domestic animals.

Key words: Bovine trematode; Euritrematose; Sequencing; phylogeny.

LISTA DE FIGURAS – REVISÃO

Figura 1. Ciclo biológico *Eurytrema* spp. 15
Figura 2. Pâncreas parasitado, ductos pancreáticos repletos de trematódeos 17
Figura 3. Corte histológico do pâncreas, parasita no ducto pancreático (Hematoxilina-eosina 4x) 17
Figura 5. *E. coelomaticum*, lâmina pronta para análise. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da análise morfológica, tamanhos médios (desvio padrão) e os maiores e menores tamanhos. 36
Tabela 2. Matriz de identidade, as sequencias destes estudos estão demarcadas (Estrela). 40

SUMÀRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO DE LITERATURA 13
2.1. *Eurytrema* spp. 13
2.2. Ciclo Biológico 13
2.3. Patogenia 15
2.4. Diagnóstico 18
2.5. Controle Terapêutico 19
2.6. Caracterização morfológica 19
2.7. Caracterização biomolecular 21
Conclusão 23
3 REFERÊNCIAS 24
4 OBJETIVOS 29
4.1 Geral 29
4.2 Específicos 29
5 ARTIGO 30
8 ANEXOS 35
8.1. Preparo de Lâminas Permanentes 35
8.2. Identificação das Espécies dos helmintos 35
8.4 Protocolo de extração de DNA e de PCR 38

1 INTRODUÇÃO

Os parasitos do gênero *Eurytrema* sp. geralmente ocasionam hiperplasia epitelial, hipertrofia dos ductos pancreáticos e fibrose periductal, levando à um quadro de euritrematose que pode ser caracterizada de forma assintomática (subclínica) ou quadros clínicos (agudo e crônico) [1]. A pancreatite crônica decorrente da infecção por *Eurytrema* sp. pode levar a condenação do pâncreas impedindo sua comercialização, prejudicar a produção de insulina, bem como ocasionar perdas econômicas relacionadas com a diminuição da produção de carne e leite [2-4].

No Brasil o gênero *Eurytrema* [5], já foi descrito nos Estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina [6], São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais [7] e Paraná [8]. E não há no pais nenhum estudo realizado através da caracterização molecular. Trabalhos foram feitos baseados na morfologia [9], estudos epidemiológicos [8, 10], ciclo biológico [11] e manifestações patológicas [12, 13].

Estudos recentes têm demonstrado a importância da biologia molecular como ferramenta para a identificação [14] e analises filogenéticas [15, 16] dos trematódeos. Fragmentos parciais do gene 18S rRNA foram usados com sucesso para a construção de arvores filogenéticas e o estudo de diferentes ordens de trematódeos digenéticos [17, 18]. A biologia molecular proporciona uma maior confiabilidade para a caracterização de trematódeos, podendo ainda, possibilitar a visualização das variações genéticas de diferentes espécies e de diferentes regiões geográficas, e reduzindo a probabilidade de possíveis erros que podem ocorrer na caracterização morfológica.

O objetivo deste estudo foi realizar a primeira caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* das Américas e revisar as principais ferramentas utilizadas para caracterização e estudos do gene 18S rRNA de trematódeos digenéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Eurytrema* spp.

O gênero *Eurytrema* [5] são trematódeos digenéticos pertencentes à família Dicrocoeliidae, na qual compreende 11 espécies, sendo que duas espécies; *E. coelomaticum* [19] e *E. pancreaticum* [20] são parasitos comuns de ductos pancreáticos, e ocasionalmente dos ductos biliares e raramente do intestino delgado de ruminantes [4]. Estes parasitos apresentam grandes semelhanças morfológicas entre si, o que dificulta sua diferenciação [4]. Em estudo epidemiológico realizado por Travassos (21) o *E. pancreaticum* está distribuído pela Ásia, Europa e Rússia Oriental e o *E. coelomaticum* além de ocorrer nestas regiões está presente na América do Sul, incluindo o Brasil. Campos, Ragusa (22) e Busetti, Paske (23) descreveram que o *E. pancreaticum,* também ocorre no Brasil.

Entretanto, devido às variações morfológicas que estas espécies estão sujeitas, principalmente quanto ao tamanho e a forma do corpo, posição relativa dos órgãos internos, forma das gônadas e extensão das glândulas vitelogênicas, podem surgir duvidas durante a classificação morfológica destes digenéticos [4].

2.2. Ciclo Biológico

O ciclo deste parasito envolve dois hospedeiros intermediários terrestres: um caramujo do gênero *Bradybaena* e um gafanhoto do gênero *Conocephalus* [4, 24, 25]. O hospedeiro definitivo se infecta através da ingestão acidental do gafanhoto contendo a metacercária [26].

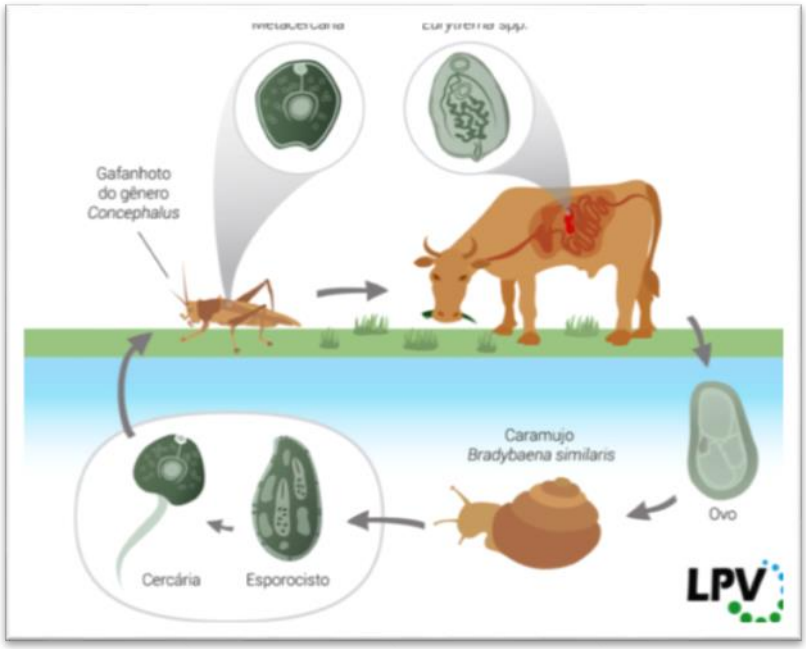
Os ovos são eliminados do hospedeiro definitivo através das fezes e são ingeridos pelo caramujo do gênero *Bradybaena similaris*, que no Brasil mostrou-se ser o primeiro hospedeiro intermediário [11]. Após a ingestão dos ovos, os mesmos são depositados no trato digestivo, onde encontram condições ideais de desenvolvimento, para a evolução em miracídios, que passam a penetrar o tubo digestivo do hospedeiro, após um período de desenvolvimento os miracídeos dão origem a esporocistos de primeira geração [24].

Estes esporocistos fixam-se na parede externa do intestino do molusco. Após intensa multiplicação assexuada os esporocistos de primeira geração, dão origem a esporocistos de segunda geração. Este desenvolvimento no interior do molusco pode ocorrer com 90 dias a uma temperatura de 26°C. Em condições ambientais desfavoráveis este período pode ser prolongado por 250-350 dias. Acredita-se que o esporocisto de segunda geração migre através do sinus retal e lateral do molusco *B. similaris,* emergindo para o exterior através da perfuração do manto próximo ao pneumóstoma. Ele também sofre uma maturação onde há o desenvolvimento da cercária dentro do esporocisto [4, 11, 12].

Os esporocistos de segunda geração são eliminados para o meio externo onde devem ser ingeridos pelo seu segundo hospedeiro intermediário, um gafanhoto do gênero *Conocephalus*, dando continuidade ao ciclo. Neste inseto os esporocistos de segunda geração liberam as cercarias. A cercaria na sua forma livre atravessa a parede intestinal e se encista na cavidade celomática do inseto, dando origem a metacercária [11, 12]. O desenvolvimento da cercária em metacercária pode ocorrer em torno de três semanas, este processo é influenciado pela temperatura [24]. O aumento da temperatura influencia diretamente na taxa de maturação, podendo ocorrer em até 15 dias a uma temperatura de 30°C [4, 12].

Os hospedeiros definitivos são infectados através da ingestão acidental de gafanhotos infectados, presentes nas forragens. As metacercárias são liberadas dos cistos no duodeno e migram para os ductos pancreáticos, em raras exceções os ductos biliares também podem ser afetados [12]. A produção de ovos pode ter início em torno de sete semanas em cabras e bovinos [24]. O período pré-patente é entre 90-100 dias, enquanto o período patente pode durar por um a dois anos [4].

Figura 1. Ciclo biológico *Eurytrema* spp.



Fonte: Parasitic lesions observed in cattle slaughtered for human consumption. Pesquisa Veterinária Brasileira [27].

2.3. Patogenia

A euritrematose bovina geralmente manifesta-se na forma subclínica[8]. No Brasil, o parasito rotineiramente é detectado apenas durante a inspeção pós-abate em matadouros frigoríficos [4], entretanto, em animais com boas condições de saúde a euritrematose bovina usualmente não é patogênica [28]. Em contrapartida Burggraaf (29) e Basch (24) citam que provavelmente ocorram perdas quanto a produção de carne e leite. Além de prejuízos a indústria extrativa de insulina devido às condenações de pâncreas parasitados[8].

As alterações clinicas observadas por Rachid, Aquino Neto (30) e de Souza Quevedo, MendesI (31) em animais parasitados por *E. coelomaticum*, foram letargia, fraqueza, prostração, depressão, caquexia, anemia e decúbito prolongado . Animais parasitados podem apresentar anemia regenerativa, altas concentrações plasmáticas de amilase, glicose e cetonúria[32].

Ainda em relação aos sinais clínicos, em uma novilha da raça Jersey de Souza Quevedo, MendesI (31) notaram que o animal parasitado apresentou retardo de crescimento e emagrecimento progressivo, que perdurou por cerca de um

ano. Mesmo após sucessivos tratamentos com anti-helmínticos e suplementação nutricional, continuou havendo decréscimo no crescimento. A perda gradual de peso pode ser associada com uma pancreatite severa com lesão da porção exócrina do órgão, importante para secreção de enzimas e responsável por diversos processos digestivos, e também, lesão da porção endócrina relacionada com a produção de insulina e glucagon [33]. Em animais parasitados todo tecido acinar do trato pancreático pode ser atingido, sendo substituído por tecido fibroso, podendo ocorrer ainda, destruição dos ácinos glandulares devido à proliferação de tecido conectivo, conservando as ilhotas de Langerhans. Além disso, é observado infiltrado linfático ao redor dos pontos onde os trematódeos são encontrados [12].

Headley, Saut (13) classificaram os pâncreas de bovinos parasitados em cinco grupos. Grupo I: pâncreas normal. Grupo II: caracterizado por proliferação de células epiteliais nos ductos pancreáticos e discreta inflamação com moderada fibrose intersticial e periductal. Grupo III: severas alterações proliferativas, representada por moderada obstrução e/ou ruptura dos ductos pancreáticos, intensa fibrose periductal e resposta inflamatória, discreta calcificação distrófica, pancreatite intersticial moderada, e discreto foco de infiltração de tecido adiposo. Grupo IV: pancreatite intersticial multifocal crônica, caracterizada por severa obstrução e/ou ruptura dos ductos pancreáticos, fibrose periductal severa e resposta inflamatória, moderada calcificação distrófica, severa pancreatite intersticial multifocal, área de moderada infiltração de tecido adiposo. Grupo V: pancreatite intersticial difusa crônica, definida por severa obstrução e/ou ruptura dos ductos pancreáticos, severa calcificação distrófica e intensa infiltração de tecido adiposo.

Figura 2. Pâncreas parasitado, ductos pancreáticos repletos de trematódeos

Fonte: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley

Figura 3. Corte histológico do pâncreas, parasita no ducto pancreático (Hematoxilina-eosina 4x)

Fonte: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da euritrematose bovina é realizado principalmente por exame coproparasitológico, porém este método é pouco utilizado na pratica clínica, sendo a parasitose muitas vezes somente diagnosticada durante a necropsia ou exame *post-mortem* [34]. As técnicas coproparasitológicas para pesquisa de ovos de trematódeos encontradas na literatura dão especial referência a *F. hepatica, Schistosoma mansoni* e *Paramphistomun* spp. [35]. A dificuldade no diagnóstico é particularmente importante para animais pouco parasitados que eliminam ovos no ambiente constantemente[32].

Algumas técnicas tem sido utilizadas com relativo êxito no diagnostico desta parasitose, como a técnica adaptada de Dennis, Stone & Swanson. De acordo com Belém, de Oliveira (36), que adaptaram a técnica, 87,2% dos casos de infecção por *Eurytrema* spp. foram detectados por este método.

Diversos autores realizaram técnicas coproparasitológicas para diagnostico da euritrematose [37, 38]. Recentemente de Lima, Ribeiro (39) obtiveram sucesso utilizando a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (40) na observação de ovos de *E. coelomaticum.* Correa, Correa (41), utilizaram-se de uma prova intradérmica, através de uma suspensão de parasitos, devidamente preparados. Foi feita uma diluição, a diluição de 1:500 foi considerada ideal, os resultados obtidos foram satisfatórios, obtendo-se valores de erro médio das provas falso-negativas em torno de 29%.

Para Belém, de Oliveira (36), um único exame coproparasitológico, por meio de sua técnica empregada, tem-se 94,2% de probabilidade de confirmar a infecção por *Eurytrema* spp. em bovinos, independentemente da carga parasitaria do hospedeiro. No caso da avaliação da intradermo-reação cervical (IDR), podem ser consideradas positivas as IDR, que apresentem aumento relativo das pápulas superior a 2,5 mm e negativas aquelas iguais ou inferiores [35].

As técnicas de diagnóstico, como as de exames coproparasitológico e a IDR, são importantes ferramentas no diagnóstico da euritrematose bovina, porém são necessários mais estudos para aperfeiçoar estas técnicas, bem como estudos

epidemiológicos para estabelecer medidas de controle de hospedeiros intermediários, pois esta enfermidade causa importantes perdas econômicas para a bovinocultura [39].

2.5. Controle Terapêutico

O combate destes trematódeos com os anti-helmínticos, normalmente utilizados em bovinos parecem ser ineficazes no tratamento. Sendo ainda desconhecidas drogas anti-helmínticas capazes de combater o parasitismo por *Eurytrema* [31]. Muitos autores realizaram estudos *in vivo* em ruminantes, testando algumas drogas visando observar a eficácia anti-helmíntica das mesmas, principalmente contra trematódeos. Kukharenko (42) testou drogas como hexacloroparaxilol, hexide, hexacloroetano, cyazide, sulfeno e clorofos, sendo estas drogas ineficazes contra o *Eurytrema* spp. Drogas como o bithionol, bithionol sulfóxido, thiabendazole e piperazina, também se mostraram ineficazes no controle da euritrematose [43]. O nitroxinile e o praziquantel mostraram-se eficazes contra a euritrematose, baseando-se na diminuição de ovos eliminados pelas fezes, bem como presença de parasitos com suas estruturas deformadas. Características estas, que foram observadas por mais autores quando se utilizou o praziquantel [44, 45].

Em estudo realizado avaliando-se duas drogas, o praziquantel e o triclabendazole, sobre a forma adulta do parasito. O triclabendazole mostrou-se ineficaz no controle do trematódeo, sendo o praziquantel a droga de eleição, pois mostrou ter alguma atividade sobre a diminuição da motilidade das formas adultas do parasito [46].

2.6. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica das espécies de *Eurytrema* vem sendo baseadas nos trabalhos de Giard and Billet (19); Looss and Cuffey (5); Kobayashi (47); Travassos, Freitas (47); Chinone, Fukase (37) . Alguns autores como Looss and Cuffey (5), Travassos (21) e Eduardo, Manuel (48), classificaram o *Eurytrema* spp. como espécies distintas.

Bassani, Sangioni (35) observaram que nos estudos de sistemática de Trematoda, há muitos anos, existem dúvidas quanto às suas classificações, e os trabalhos inicialmente descreviam os parasitos pelas suas características fenotípicas, descrições morfológicas das estruturas do parasito e pelas analises citológicas dos cromossomos dos trematódeos. Travassos (21) realizou um estudo, fazendo uma revisão da família Dicrocoeliidae e através deste trabalho, classificou o *E. coelomaticum*, como espécie distinta e prevalente na América do Sul. Alguns autores como Horta (49); Freire and Di Primio (50); Campos, Ragusa (22); Ribeiro, Bianchin (51); Busetti, Paske (23); Correa, Correa (41) descreveram a ocorrência do *E. pancreaticum* no Brasil , mas estes não realizaram uma análise morfológica detalhada dos parasitos**.**

No decorrer dos anos muitos autores realizaram estudos com o objetivo de caracterizar a espécie de *Eurytrema*. Tang and Tang (52), analisaram os aspectos morfológicos tanto de formas adultas do parasito, bem como, das formas larvais. Moriyama (53) avaliou as características fenotípicas e genotípicas, através das análises cariológicas de cromossomos de tecido gonadal de *E. coelomaticum* e *E. pancreaticum*, designando-os neste estudo de tipo I e II respectivamente e concluiu haver diferenças morfológicas e biométricas dos cromossomos, bem como as posições dos centrômeros destas duas espécies. Recentemente Pinheiro, Franco-Acuna (9), realizaram um estudo onde se avaliou a morfologia e a ultraestrutura de dois diferentes estágios evolutivos de cercárias de *E. coelomaticum* através de técnicas de microscopia eletrônica.

Pela análise morfológica Travassos (21) determinou que o *E. coelomaticum* possui um corpo achatado com 10 a 13 mm por 6 a 7mm de largura; cutícula lisa, ventosa oral subterminal com 0,9 a 1 mm de diâmetro; acetábulo no terço médio do corpo, com dimensões iguais às da ventosa oral; faringe e esôfago delgados; cecos intestinais delgados e sinuosos; poro genital ligeiramente pós-bifurcal mediano; bolsa do cirro muito grande, geralmente claviforme; testículos pós-acetabulares com zonas coincidentes e campos afastados; ovários submedianos, pós-testiculares; glândulas de Mehlis, espermateca e canal de Laurer presentes; vitelinos laterais, extracecais e com alguns folículos intercecais; ovos com 0,042-0,50mm por 0,023-0,03mm; vesícula excretora simples e poro excretor terminal.

2.7. Caracterização biomolecular

O gene 18S rRNA, já está sendo amplamente utilizado e proporcionando resultados satisfatórios, tanto em analises filogenéticas como em estudos de diferentes ordens de digenéticos. Otranto, Rehbein (14) elaboraram um estudo morfológico e molecular entre o *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) e *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951). A identificação morfológica baseou-se em características morfométricas encontradas na literatura. Para caracterização molecular, foram utilizados espécimes de parasitos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, e o sequenciamento parcial foi realizado através das regiões 18S rDNA (~1400 bp) e ITS-2 (incluindo a 5.8S e 28S e regiões que as flanqueiam; ~600 bp). A caracterização morfológica e molecular claramente diferenciou estes dois digenéticos, e especificamente a análise molecular possibilitou a observação de uma baixa diferenciação interespecífica do *Dicrocoelium dendriticum* independentemente da região geográfica e seu hospedeiro, demonstrando-se ter uma baixa relação de especificidade, que é capacidade que apresenta o parasito de se adaptar a determinado número de hospedeiros.

Estudos biomoleculares em relação ao gênero *Eurytrema* são ainda escassos. Zheng, Luo (15) realizaram um estudo, onde objetivou elucidar a posição taxonômica do *Eurytrema coelomaticum,* através de um fragmento 18S rRNA, do DNA genômico e posterior sequenciamento. Através deste sequenciamento foi estabelecida a relação entre o *Eurytrema coelomaticum* e outros trematódeos *Dicrocoeliidae*, além da construção da arvore filogenética. Por meio desta análise foi possível determinar uma alta relação homóloga entre *Dicrocoelium dendriticum, Lyperosomum collurionis e Brachylecithum lobatum*. Em comparação com os outros trematódeos, a diversidade genética do *Eurytrema coelmaticum* comparada ao *Dicroelium dendriticum* foi de 2.42%, e entre *Lyperosomum collurionis* foi de 1.75%; *Dicroelium dendriticum* e *Brachylecithum lobatum* foi de 1.09%, evidenciando a relação de proximidade evolucionária. Podendo-se concluir que a relação evolucionária do *Eurytrema coelomaticum* está mais próxima do *Lyperosomum collurionis* do que ao *Dicroelium dendriticum* e *Brachylecitum lobatum.*

Em estudo posterior Zheng, Luo (17), sequenciaram o DNA do *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum* através de primers de regiões

conservadas da sequência parcial 18S rRNA . Foi construída uma arvore filogenética incluindo-se outros trematódeos e também gerada uma matriz de identidade. O percentual de identidade das espécies de *Eurytrema* comparadas com outros *Dicrocoeliidae* variou de 97,5 a 98,2 %, enquanto entre as duas espécies de *Eurytrema* foi de 99,3%. A arvore filogenética demonstrou que *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum* não estão situados na mesma posição, e eles formaram um cluster com *Lyperosomum collurioni. E* confirmou-se através deste trabalho que a nível molecular *Eurytrema coelomaticum* e *Eurytrema pancreaticum* são diferentes espécies.

Em estudo recente Cai, Zhang (16) analisaram a relação filogenética de espécies do gênero *Eurytrema*, de animais domésticos a selvagens de diferentes regiões geográficas, baseando-se na sequência 18S rRNA. O autor através da comparação das sequências 18S rRNA de *E. coelomaticum* de duas províncias chinesas distintas observou uma variação de 3 bp de nucleotídeos, e entre *E. pancreaticum* uma variação de 4 bp de nucleotídeos. O autor levanta a hipótese de que os animais selvagens podem ter um papel importante na manutenção e na disseminação de espécies de Eurytrema para os animais domésticos devido a infecção cruzada de algumas delas, como E. cladorchis e E. fukienensis. A análise das sequências indicou que o *Eurytrema fukienensis* é uma espécie independente e sugeriu que pode representar a espécie intermediária entre animais selvagens e domésticos.

Conclusão

Os trematódeos do gênero *Eurytrema*, estão presentes em grande parte do mundo. Nos ruminantes estes parasitos raramente são diagnosticados através de técnicas coproparasitologicos, sendo comumente identificados apenas no momento do abate, na inspeção *post mortem.* Estes parasitos podem causar grandes prejuízos econômicos em relação a produção de carne e leite e o combate com anti-helmínticos mostraram-se ineficazes, favorecendo a sua proliferação.

As técnicas biomoleculares mostraram-se eficazes na caracterização da espécie de *Eurytrema*, demostrando-se ser um método mais confiável quando comparada as técnicas de caracterização morfológica. Além de possibilitar estudos através da filogenia, o que poderá trazer maiores informações sobre este gênero.

3 REFERÊNCIAS

1. Tang CC. Studies on the life history of Eurytrema pancreaticum Janson, 1889. J Parasitol. 1950 Dec;36(6:1):559-73. PubMed PMID: 14804225. Epub 1950/12/01. eng.

2. Fox JN, Mosley JG, Vogler GA, Austin JL, Reber HA. Pancreatic function in domestic cats with pancreatic fluke infection. J Am Vet Med Assoc. 1981 Jan 1;178(1):58-60. PubMed PMID: 7204225. Epub 1981/01/01. eng.

3. Graydon RJ, Carmichael IH, Sanchez MD, Weidosari E, Widjayanti S. Mortalities and wasting in Indonesian sheep associated with the trematode Eurytrema pancreaticum. Vet Rec. 1992 Nov 7;131(19):443. PubMed PMID: 1455594. Epub 1992/11/07. eng.

4. Mattos Junior DG, Vianna SS. O Eurytrema coelomaticum (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil. Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinaria. 1987;2(1):3-7.

5. Looss A, Cuffey E. On some parasites in the museum of the school of Tropical Medicine, Liverpool with a contribution on the case of distomasis of the liver and rectum. Annals of Tropical Medicine Parasitology. 1907;1:123-54.

6. Brito D, Francis M CE. Patogenicidade do Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet, 1892, LOOSS, 1907). Revista Brasileira de Medicina Veterinaria. 1981;4:17-21.

7. Costa H, Leite A, Guimarães M, Lima W. Distribuição de helmintos parasitas de animais domésticos no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia. 1986;4:465-79.

8. Bassani CA, Sangioni LA, Saut JP, Yamamura MH, Headley SA. Epidemiology of eurytrematosis (Eurytrema spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Parana, Brazil. Vet Parasitol. 2006 Nov 5;141(3-4):356-61. PubMed PMID: 16860482. Epub 2006/07/25. eng.

9. Pinheiro J, Franco-Acuna DO, Oliveira-Menezes A, Brandolini SV, DaMatta RA, de Souza W. New insight into the morphology of Eurytrema coelomaticum (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies. Parasitol Res. 2012 Oct;111(4):1437-45. PubMed PMID: 22763703. Epub 2012/07/06. eng.

10. Azevedo JR, Mannigel RC, Agulhon AZ, Borba TR, Barbiéri AW, Oliveira DCLd, et al. Prevalence and geographical distribution of bovine eurytrematosis in cattle slaughtered in northern Paraná, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2004;24:23-6.

11. Brandolini SVPB, Amato SB. Desenvolvimento de Eurytrema coelomaticum (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em Bradybaena similaris (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). Rev Bras Zool. 2001;18(2): 499-510.

12. Headley SA. Bovine eurytrematosis: life cycle, pathologic manifestations and public health considerations. Cesumar. 2000;2(2):59-62.

13. Headley SA, Saut JPE, Bassani CA, Sangioni LA, Birgel Junior EH, Yamamura MH. Histopathologic patterns of pancreatic lesions induced by *Eurytrema coelomaticum* in cattle from the central-west region of the State of Paraná, Southern Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Pathology. 2009;2:3-7.

14. Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP, et al. Morphological and molecular differentiation between Dicrocoelium dendriticum (Rudolphi, 1819) and Dicrocoelium chinensis (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). Acta Trop. 2007 Nov-Dec;104(2-3):91-8. PubMed PMID: 17803950. Epub 2007/09/07. eng.

15. Zheng YD, Luo XN, Shi CH, Zong RQ, Jing ZZ, Cai XP. [Molecular relationship of Eurytrema coelmaticum inferred from 18S rRNA sequence]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2006 Oct;24(5):345-8. PubMed PMID: 17361813. Epub 2007/03/17. chi.

16. Cai Z, Zhang Y, Ye X. Phylogenetic relationships of the genus Eurytrema from domestic and wild animal based on 18S rRNA sequences. Parasitol Res. 2012 Oct;111(4):1637-44. PubMed PMID: 22760238. Epub 2012/07/05. eng.

17. Zheng Y, Luo X, Jing Z, Hu Z, Cai X. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of Eurytrema coelmaticum and Eurytrema pancreaticum. Parasitol Res. 2007 Feb;100(3):645-6. PubMed PMID: 17004097. Epub 2006/09/28. eng.

18. Fernandez M, Littlewood DT, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. Parasitology. 1998;117(Pt 4):383-91.

19. Giard A, Billet A. Sur quelques trematodes parasites dês boeufs du Tonkin. CR Social Biology, Madison. 1892;4:613-5.

20. Janson J. Note explicative dês objects exposés par l'Ecole Agricole et Forestére de Komaba. Paris. 1889.

21. Travassos L. Revisão da família Dicrocoeliidiae, Odhner, 1910. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional (Monografia do Instituto Oswaldo Cruz). 1944;2.

22. Campos MS, Ragusa AL, Miguel O, Ishizuka MM. Correlação entre número de parasitos e peso do pâncreas em bovinos naturalmente infestados por Eurytrema pacreaticum, Janson, 1889 (TREMATODA-DICROCOELIIDAE). Rev Fac Med Vet Zoot Univ S Paulo. 1974; ll:295-9.

23. Busetti ET, Paske A, Ruis MCE, Thomaz V, Golinelli A. Helmintos parasitos de bubalus bubalis no estado do Parana - Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia (Brazil). 1983;35(3):399-404.

24. Basch PF. Patterns of transmission of the trematode Eurytrema pancreaticum in Malaysia. Zahnarztl Prax. 1966 Jan 15;17(2):234-40. PubMed PMID: 5222978. Epub 1966/01/15. eng.

25. Soulsby EJL. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. ed t, editor. London: Baillière Tindall1982. 343-4 p.

26. Jubb KVF. The pancreas. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (Eds.). Pathology of Domestic Animals. 1993;2(fourth ed.):407–24.

27. Tessele B, Brum JS, Barros CS. Parasitic lesions observed in cattle slaughtered for human consumption. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013;33(7):873-89.

28. Yamamura MH. Algumas avaliações sobre a patologia e controle da euritrematose bovina. Doctoral thesis, Itaguai, RJ,Brazil. 1989:128.

29. Burggraaf H. Pâncreas-distomatose. Tijdsch diergeneesk, Utricht. 1935;62(8):469-81.

30. Rachid MA, Aquino Neto HM, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Valle GR, Vasconcelos AC. Chronic interstitial pancreatitis and chronic wasting disease caused by *Eurytrema coelomaticum* in Nelore cow. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011;63:741-3.

31. de Souza Quevedo P, MendesI M, PappenII FG, SoaresIII MP, MullerIV G, da Rosa FariasIV NA. Pancreatite intersticial crônica em bovino causada por Eurytrema coelomaticum. Ciência Rural. 2013;43(8):1449-52.

32. Ilha MR, Loretti AP, Reis AC. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by Eurytrema coelomaticum in the State of Parana, southern Brazil. Vet Parasitol. 2005 Oct 10;133(1):49-60. PubMed PMID: 16046069. Epub 2005/07/28. eng.

33. Pierzynowski SG, Zabielski R. Biology of the pancreas in growing animals: Elsevier Science Publishers; 1999.

34. de Lima SK, Ribeiro CM, Elenice D. IMPORTÂNCIA DO EXAME COPROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA EURITREMATOSE BOVINA. Veterinária e Zootecnia. 2013;20(1):70-3.

35. Bassani CA, Sangioni LA, Saut JPE, Headley SA, Yamamura MH. Euritrematose bovina. Semina: Ciências Agrárias. 2007;28(2):299-316.

36. Belém PAD, de Oliveira MR, Padovani CR. Adaptation of the Dennis, Stone & Swanson's technique for parasitologic diagnostic of Eurytrema sp

infection in cattle. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 1992;29.

37. Chinone S, Fukase T, Itagaki H. Experimental infection of domestic cats with Eurytrema pancreaticum and Eurytrema coelomaticum (Trematoda; Dicrocoeliidae). Japanese journal of parasitology. 1984.

38. Ragusa AL, de Campos MS. Identificação de hospedeiro intermediário de Eurytrema coelomaticum (Giard e Billet, 1882) Looss, 1909 (Thematoda-Dicrocoelidae), em fazendas de criação de bovinos, no Estado de São Paulo—Brasil. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 1976;13(1):269-87.

39. de Lima SK, Ribeiro CM, Elenice D. IMPORTÂNCIA DO EXAME COPROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA EURITREMATOSE BOVINA./IMPORTANCE OF COPROLOGY TEST IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE EURYTREMATOSIS/IMPORTANCIA DEL EXAMEN COPROPARASITOSCÓPICO EN EL DIAGNÓSTICO DE EURYTREMATOSIS BOVINA. Veterinária e Zootecnia. 2013;20(1):70-3.

40. Foreyt WJ. Parasitologia Veterinária-Manual de Referência: Editora Roca; 2005.

41. Correa W, Correa C, Ferreira A, Paes A. Eurytrema pancreaticum: clínica e diagnóstico em bovinos. A Hora Veterinária. 1984;4(19):31-4.

42. Kukharenko N. Looking for antihelminthics against eurytrema infection in ruminants. In _. Glavneishie Gel'minty Sel'skonozyaistvennykh Shivotnykl Dal'nego vostoka i bor'ba s vimi (sbornik nauchnykh Trudov). 1971:20-2.

43. Nosaka D, Ashizawa H, Nagata Y. Pathological studies on bovine eurytremiasis. IV. Anthelmintic experiments and pathological findings of cows infected with Eurytrema species. Miyazaki Univ Fac Agr Bull. 1970.

44. Sakamoto H, Tashiro T, Watanabe S, Sakamoto T, Kono I, Yasuda N. Clinicopathological findings in cattle infected with Eurytrema coelomaticum. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University. 1980 (30):117-22.

45. Kono I, Sakamoto T, Yasuda N, Kitano Y, Togoe T, Yamamoto Y. Pathological studies on cattle heavily infected with Eurytrema coelomaticum. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University. 1980 (30):111-6.

46. Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Tansatit T, Kangwanrangsan N, Pipatshukiat S. Eurytrema pancreaticum: the in vitro effect of praziquantel and triclabendazole on the adult fluke. Exp Parasitol. 2005 Nov;111(3):172-7. PubMed PMID: 16125702. Epub 2005/08/30. eng.

47. Travassos L, Freitas JFT, Kohn A. Trematódeos do Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1969;67:1-886.

48. Eduardo S, Manuel M, Tongson M. Eurytrema escuderoi, a new species, and two other previously known species of the genus Eurytrema Looss, 1907 (Digenea: Dicrocoeliidae) in Philippine cattle and carabao. Philippine Journal of Veterinary Medicine. 1976;15(1/2):104-16.

49. Horta P. Distomatose pancreática e glicosúria em bovinos. A lavoura. 1918;22(3):4.

50. Freire J, Di Primio R. Fauna parasitária riograndense. Rev Med Vet São Paulo. 1967;3:40-55.

51. Ribeiro OC, Bianchin I, Melo HJH, GOMES A, Pereira AS. Lesões anátomo-patológicas observadas em infecções por Eurytrema pancreaticum em bovinos. In: Congresso brasileiro de medicina veterinaria. Anais. 1980;Fortaleza(17).

52. Tang C, Tang C. Biology and epidemiology of Eurytrema pancreaticum (Janson, 1889) and Eurytrema coelomaticum (Giard et Billet, 1892). J Xiamen Univ. 1975;2:53–90.

53. Moriyama N. Karyological studies of bovine pancreatic flukes (Eurytrema sp.) and their phenotypes. J Parasitol. 1982 Oct;68(5):898-904. PubMed PMID: 7131195. Epub 1982/10/01. eng.

54. DUARTE, M.J.F. O ciclo evolutivo de Postharmostomum gallinum Witenberg, 1923, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Biologia, 40(4): 793-809, 1980.

55. PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras II: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes das famílias colubridae e boidae. Revista Brasileira de Biologia, v. 27, n. 1, p. 49-56, 1967.

56. TRAVASSOS L, FREITAS JFT, KOHN A. Trematódeos do Brasil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 67: 886 pp, 1969.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Realizar a caracterização molecular do *E. coelomaticum* em bovinos no estado do Paraná.

4.2 Específicos

- Coleta de amostras no abatedouro da cidade de Apucarana - Paraná.
- Caracterizar os parasitos através da morfologia.
- Extrair o DNA e realizar a PCR.
- Sequenciar as amostras e fazer a filogenia.

5 ARTIGO

Manuscrito submetido a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

O manuscrito foi elaborado baseado no formato da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Original Article

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 1-4, abr.-jun. 2014
ISSN 0103-846X (Print) / ISSN 1984-2961 (Electronic)

Molecular characterization of *Eurytrema coelomaticum* in cattle from Paraná, Brazil

Caracterização molecular de *Eurytrema coelomaticum* em bovinos do estado do Paraná, Brasil

Gustavo Freire Figueira[1]; Victor Henrique Silva de Oliveira[2];
Alessandra Taroda[3]; Amauri Alcindo Alfieri[2]; Selwyn Arlington Headley[4]*

[1]School of Veterinary Medicine, Universidade Norte do Paraná, Arapongas, PR, Brazil

[2]Laboratory of Molecular Biology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brazil

[3]Laboratory of Parasitology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina – UEL, PR, Brazil

[4]Laboratory of Veterinary Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina – UEL, PR, Brazil

Received January 16, 2014
Accepted February 26, 2014

Abstract

This study investigated the occurrence of *Eurytrema* spp. in cattle by analysis of the partial 18S rRNA gene sequence. Trematodes from 44 bovine pancreas were collected and classified based on typical morphological features. PCR assay and sequence analyses of amplified products confirmed that the trematodes classified as *Eurytrema coelomaticum* were phylogenetically distinct from those identified as *E. pancreaticum*. The results of this study represent the first molecular characterization of *E. coelomaticum* within the Americas, and provide an efficient method to differentiate digenean trematodes of domestic animals.

Keywords: Bovine trematode, *Eurytrema* spp., PCR, phylogeny.

Resumo

Este estudo avaliou a ocorrência de *Eurytrema* spp. em bovinos por meio da análise da sequência parcial do gene 18S rRNA. Trematódeos procedentes de 44 pâncreas bovinos foram coletados e classificados com base em aspectos morfológicos típicos. A técnica de PCR e a análise da sequência de nucleotídeos dos produtos amplificados confirmaram que os trematódeos classificados como *Eurytrema coelomaticum* eram filogeneticamente distintos daqueles identificados como *E. pancreaticum*. Os resultados desse estudo representam a primeira caracterização molecular de *E. coelomaticum* nas Américas e disponibiliza um método eficiente para diferenciar trematódeos digenéticos em animais domésticos.

Palavras-chave: Trematoda bovino, *Eurytrema* spp., PCR, filogenia.

Introduction

Eurytrema spp. is a pancreatic fluke that parasitizes the pancreatic ducts and rarely the bile ducts of cattle, buffaloe, camels, sheep, and goats (BASCH, 1966; SOULSBY, 1982; ISHII et al., 1983; MATTOS JUNIOR; VIANNA, 1987). Parasitism frequently results in epithelial hyperplasia, hypertrophy of pancreatic ducts, and periductal fibrosis that lead to eurytrematosis (TANG, 1950; MATTOS JUNIOR; VIANNA, 1987; HEADLEY et al., 2009). Although bovine eurytrematosis is more frequently associated with *Eurytrema coelomaticum* in Brazil (TRAVASSOS et al., 1969), *E. pancreaticum* has been described in studies that have not examined the morphological characteristics of the trematode (CAMPOS et al., 1974; BUSETTI et al., 1983).

Most investigations relative to *Eurytrema* spp. in Brazil have been based on morphological characterization (TRAVASSOS et al., 1969; YAMAMURA et al., 1995; PINHEIRO et al., 2012), biological cycle (BRANDOLINI; AMATO, 2001), epidemiological trends (AZEVEDO et al., 2004; BASSANI et al., 2006), and pathological manifestations (YAMAMURA et al., 1995; HEADLEY, 2000; HEADLEY et al., 2009). Additionally, there are also descriptions of *Eurytrema* spp. associated with chronic wasting disease (RACHID et al., 2011) and simultaneous intoxication due to chronic seneciosis (HEADLEY et al., 2004) in cattle. However, there are no studies relative to the molecular characterization of *Eurytrema* spp. from Brazil.

***Corresponding author:** Selwyn A. Headley
Laboratory of Veterinary Pathology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, CP 10.011, CEP 86057-970, Londrina, PR, Brazil
e-mail: selwyn.headley@uel.br

Recent studies have demonstrated that molecular analysis is an important tool for the identification (OTRANTO et al., 2007) and phylogenetic analyses (CAI et al., 2012) of trematodes. Moreover, partial fragments of 18S rRNA gene were successfully used to design phylogenetic trees and study the different orders of digenean trematodes (FERNANDEZ et al., 1998; ZHENG et al., 2007). This study determined the species of *Eurytrema* present in cattle from northern Paraná, Brazil by the molecular characterization of the partial fragment of the 18S rRNA gene of the digenean trematode.

Materials and Methods

Study location, trematodes sampling, collection, and morphological identification

All trematodes were collected from individual cows submitted for slaughter at a municipal abattoir located in northern Paraná, southern Brazil. All cattle were of different breeds, sex, and ages, and originated from different geographical regions of the state of Paraná, including Campo do Tenente (25° 58' 41" S; 49° 40' 58" W), Borrazópolis (23° 56' 28" S; 51° 35' 15" W), and Jaboti (23° 44' 36" S; 50° 04' 33" W).

All pancreas were evaluated for the presence of trematodes, after which pools of two trematodes were used for DNA extraction and subsequent PCR analysis. The number of parasites used for molecular investigation was determined by the sample weight required for DNA extraction. From each pool of parasites, an equal number of trematodes were prepared for identification based on typical morphological characteristics (TRAVASSOS et al., 1969; YAMAMURA et al., 1995).

DNA extraction, PCR, sequencing, and phylogenetic analyses

Trematode DNA was extracted by using the Easy-DNA Kit-Life (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA), and then used in a PCR assay designed to amplify the partial 18S rRNA gene of *Eurytrema* spp. (ZHENG et al., 2007); positive controls were included in all PCR assays. Nuclease free water (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA) was used as the negative control. The PCR assay was performed as described (ZHENG et al., 2007), with slight adaptation. Briefly, the PCR protocol consisted of an initial denaturing cycle of 94°C for 5 min, 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, 2 min at 72°C followed by 72°C for 10 min. All PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and examined under ultraviolet light.

The amplified PCR products were then purified (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and submitted for direct sequencing using the forward and reverse primers. The obtained sequences were examined for quality analysis of chromatogram readings by using the PHRED software (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph); sequences were only accepted if base quality was equal to or greater than 20. Consensus sequences were then generated by the CAP3 program (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl). The partial nucleotide sequences obtained were initially compared by the BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) program with similar sequences deposited in GenBank. Phylogenetic tree and sequence alignments based on the 18S rRNA gene of the digenean trematodes family were then created by using MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011), constructed by the neighbor-joining method, based on 1,000 bootstrapped data sets; distance values were calculated by using the Kimura 2 parameter model. *Fasciola gigantica* was used as the out-group to provide stability to the generated tree. The sequence identity was generated by using the software BioEdit (HALL, 1999).

Results

Trematodes and morphological classification

The pancreas of 44 cows from the cities of Campo do Tenente (n=4), Jandaia do Sul (n=7), Borrazópolis (n=15), and Jaboti (n=18) contained trematodes, resulting in 13 samples that were used for molecular analyses. All trematodes collected were classified as *E. coelomaticum* based on typical morphological features (TRAVASSOS et al., 1969; YAMAMURA et al., 1995).

Molecular characterization, phylogenetic analysis, and sequence identities

The PCR assays amplified the 528 bp fragment of the 18S rRNA gene of *E. coelomaticum* from all pools of trematodes. Initial BLAST analyses revealed that these sequences (GenBank accession number KJ010808, KJ010809, and KJ010810) demonstrated 100% similarity with sequences deposited in GenBank. The phylogenetic analyses revealed that the isolates from this study formed a cluster that contained *E. coelomaticum, E. pancreaticum* (DQ401034), and *Lyperosomum collurionis* (AY222143). However, these isolates were more closely related to *E. coelomaticum* (DQ401035) and *E. pancreaticum* (DQ401034). The nucleotide sequences used for phylogenetic analyses during this study are given in Figure 1. Additionally, the generated matrix identity (data not show) revealed that the isolates from this study demonstrated 99.8% similarity with *E. coelomaticum* but 99.4% similarity with *E. pancreaticum.*

Discussion

This study confirmed at the molecular level that all trematodes previously identified by morphological characteristics are *E. coelomaticum;* similar studies have been done in other geographical locations (ZHENG et al., 2007). Additionally, these findings represent the first characterization of *Eurytrema* spp. in the Americas by molecular techniques. The methods used during this investigation are more efficient http://pt.bab.la/dicionario/ingles-portugues/reliableness to characterize trematodes, can demonstrate genetic variation between different species originated

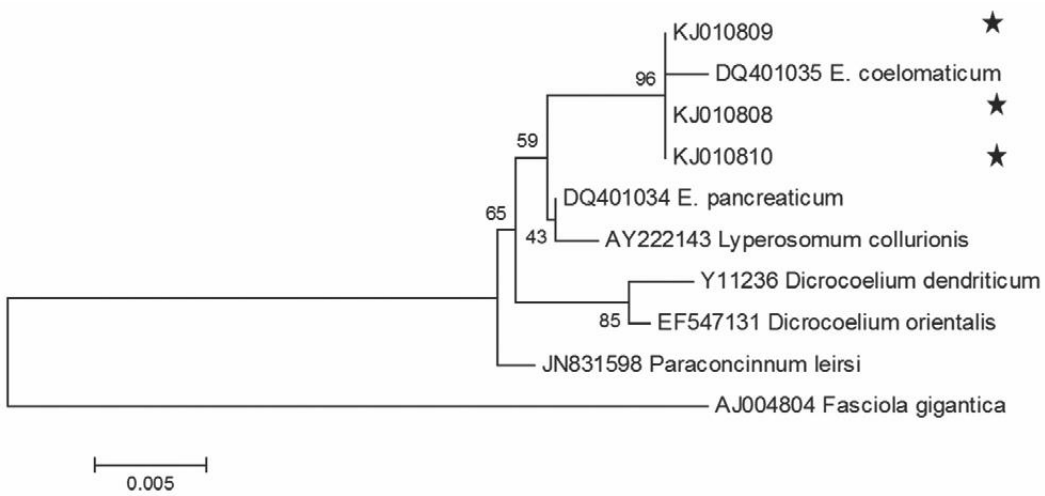


Figure 1. Phylogenetic tree based on the 18S rRNA gene sequences of trematodes generated by MEGA 5.2. *Fasciola gigantica* was used as the out-group. The sequences derived from this study are highlighted (star).

from different geographical regions, and reduce errors that could occur when morphological characteristics are being identified.

When the data identify matrix derived from this study was analyzed, it was shown that the sequences of *E. coelomaticum* and *E. pancreaticum* derived from this study were 99.8% and 99.4% similar with those observed in China (ZHENG et al., 2007). Moreover, these sequences clustered with other closely related members of the Dicrocoeliidae family, but were distant from *Dicrocoelium dendriticum* and *D. orientalis*, while these trematodes formed a cluster that was phylogenetically distant from *F. gigantica*; similar results were described (ZHENG et al., 2007). Unfortunately, the sequences of a recent phylogenetic investigation that analyzed the differences of *Eurytrema* spp. (CAI et al., 2012) by the 18S rRNA gene were not located in GenBank, and consequently not included in this study.

In addition, the results of the polygenetic analysis suggest that the trematode *E. coelomaticum* from distinct geographical regions might be closely related, considering that the isolates from this study and that from China (ZHENG et al., 2007) clustered together. Alternatively, these results suggest that there is phylogenetic difference between *E. coelomaticum* and *E. pancreaticum*, since these trematodes were grouped in different branches, indicating that these are two different parasites; similar results were described when trematodes from different host were analyzed phylogenetically (CAI et al., 2012). However, there seems to be phylogenetic differences between the same species of *Eurytrema* spp. from the different hosts and geographical locations (CAI et al., 2012).

Since bovine eurytrematosis is endemic in the state of Paraná (AZEVEDO et al., 2004; BASSANI et al., 2006), and has been described in the states of Minas Gerais (RACHID et al., 2011), Rio de Janeiro (MATTOS JUNIOR; VIANNA, 1987), Mato Grosso do Sul (YAMAMURA et al., 1995), efforts are being made to obtain examples of pancreatic trematodes of ruminants from these regions to effectively characterize the species of *Eurytrema* existent in Brazil.

Conclusion

The results from this study confirmed that trematodes of cattle from southern Brazil were morphologically and phylogenetically consistent with *E. coelomaticum*.

Acknowledgements

Amauri A. Alfieri and Selwyn A. Headley are recipients of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) fellowships.

References

Azevedo JR, Mannigel RC, Agulhon AZ, Borba TR, Barbiéri AW, Oliveira DCLD, et al. Prevalence and geographical distribution of bovine eurytrematosis in cattle slaughtered in northern Paraná, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2004; 24(1): 23-26. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2004000100006

Basch PF. Patterns of transmission of the trematode *Eurytrema pancreaticum* in Malaysia. *Zahnarztl Prax* 1966; 17(2): 234-240. PMid:5222978.

Bassani CA, Sangioni LA, Saut JP, Yamamura MH, Headley SA. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: *Dicrocoeliidae*) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Paraná, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 141(3-4): 356-361. PMid:16860482. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.003

Brandolini SVPB, Amato SB. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). *Rev Bras Zool* 2001; 18(2): 499-510. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752001000200021

Busetti ET, Paske A, Ruis MCE, Thomaz V, Golinelli A. Helmintos parasitos de *Bubalus bubalis* no estado do Paraná Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1983; 35(3): 399-404.

Cai Z, Zhang Y, Ye X. Phylogenetic relationships of the genus *Eurytrema* from domestic and wild animal based on 18S rRNA sequences. *Parasitol Res* 2012; 111(4): 1637-1644. PMid:22760238. http://dx.doi. org/10.1007/s00436-012-3002-y

Campos MS, Ragusa AL, Miguel O, Ishizuka MM. Correlação entre número de parasitas e peso de pâncreas em bovinos naturalmente infestados por *Eurytrema pacreaticum*, Janson, 1889 (*Trematoda- Dicrocoeliidae*). *Rev Fac Med Vet Univ S Paulo* 1974; 11: 295-299. http:// dx.doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v11i1p295-299

Fernandez M, Littlewood DT, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology* 1998; 117(Pt 4): 383-391. PMid:9820860. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182098003126

Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 1999; 41: 95-98.

Headley SA. Bovine eur ytr ematosis: life cy cle, pathologicmanifestations and public health considerations. *Iniciac Cient CESUMAR* 2000; 2(2): 59-62.

Headley SA, Saut JPE, Bassani CA, Sangioni LA, Birgel EH Jr, Yamamura MH. Histopathologic patterns of pancreatic lesions induced by *Eurytrema coelomaticum* in cattle from the central-west region of the State of Paraná, Southern Brazil. *Braz J Vet Pathol* 2009; 2(1): 3-7.

Headley SA, Saut JPE, Gomes DA, Silva DRM, Almeida IA, Sangioni LA. Simultaneous chronic seneciosis and eurytrematosis in a cow. *Semina: Cienc Agrar* 2004; 25(2): 131-138.

Ishii Y, Koga M, Fujino T, Higo H, Ishibashi J, Oka K, et al. Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum*. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(5): 1019-1022. PMid:6625056.

Mattos Junior DG, Vianna SS. O *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) no Brasil. *Arq Flum Med Vet* 1987; 2(1): 3-7.

Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP, et al. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop* 2007; 104(2-3): 91-98. PMid:17803950.http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.07.008

Pinheiro J, Franco-Acuña DO, Oliveira-Menezes A, Brandolini SV, DaMatta RA, De Souza W. New insight into the morphology of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda, Dicrocoeliidae) cercariae by light, scanning, and transmission electron microscopies. *Parasitol Res* 2012; 111(4): 1437-1445. PMid:22763703. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2977-8

Rachid MA, Aquino Neto HM, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Valle GR, Vasconcelos AC. Chronic interstitial pancreatitis and chronic wasting disease caused by *Eurytrema coelomaticum* in Nelore cow. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011; 63(3): 741-743. http://dx.doi.org/10.1590/ S0102-09352011000300028

Soulsby EJL. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals.* 7th ed. London: Baillière Tindall;1982.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-2739. PMid:21546353PMCid:PMC3203626 http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121

Tang CC. Studies on the life history of *Eurytrema pancreaticum* Janson, 1889. *J Parasitol* 1950; 36(6): 559-573. PMid:14804225. http:// dx.doi.org/10.2307/3273289

Travassos L, Freitas JFT, Kohn A. Trematódeos do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1969; 67: 1-886. PMid:5397756.

Yamamura MH, Horner MR, Lopes CWG. Avaliação patológica da euritrematose em bovinos naturalmente infectados na região de Londrina, Paraná. *Semina: Cienc Agrar* 1995; 16(1): 89-99.

Zheng Y, Luo X, Jing Z, Hu Z, Cai X. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelmaticum* and *Eurytrema pancreaticum*. *Parasitol Res* 2007; 100(3): 645-646. PMid:17004097. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0281-1

8 ANEXOS

8.1. Preparo de Lâminas Permanentes

Os trematódeos encontrados foram colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. Para sua fixação, foram primeiramente montados entre lâminas de vidro com água e aquecidos em fogo brando, e depois as lâminas foram mergulhadas em líquido de Ralliet-Henry[54]. Foram retirados do fixador, lavados por cinco horas em água destilada e corados em Carmim de Mayer. Foram descorados com álcool acidulado e desidratados em série alcoólica. Após a desidratação, foram clarificados em solução de Hoyer e montados entre lâmina e lamínula para observação em microscopia óptica (Pessoa, 1967)[55].

8.2. Identificação das Espécies dos helmintos

A micrometria para identificação dos gêneros e espécies dos parasitas encontrados foi realizada em microscópio óptico (Travassos et al. 1969)[56].

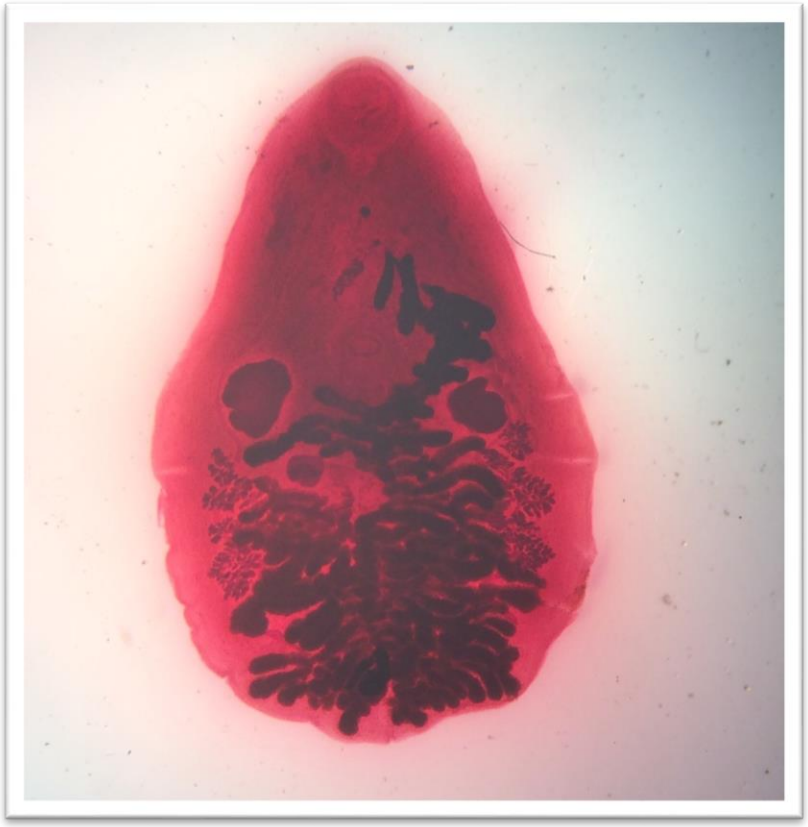
Foram observadas as seguintes características: helmintos da Classe Trematoda , corpo achatado e largo. Apresenta duas ventosas pequenas iguais ou subiguais, sendo a ventosa oral subterminal e a ventosa acetabular presente no terço médio do corpo. Faringe presente logo após a ventosa oral. Cecos intestinais delgados e sinuosos, terminando na extremidade caudal. Poro genital pós-bifurcal. Bolsa do cirro desenvolvida e claviforme. Testículos presentes na região pós-acetabular com campos afastados. Ovário sub-lateral, pós-testicular. Glândulas vitelinas laterais, sub-medianas, extra-cecais, cecais e com alguns folículos intercecais, constituídos por folículos pequenos e numerosos. Útero bem desenvolvido formando novelos de alças entre as gônadas, pré-testicular e na região pré-acetabular. Poro excretor terminal. Ovos pequenos, amarelados pardacentos, medindo 40 a 50µm de comprimento x 26 a 32µm de largura. Helmintos identificados como pertencentes a Família Dicrocoeliidae, Gênero *Eurytrema*, Espécie *E.*

coelomaticum. Podem-se observar os tamanhos médios (desvio padrão) e os maiores e menores tamanhos na tabela 1.

Tabela 1. Resultado da análise morfológica, tamanhos médios (desvio padrão) e os maiores e menores tamanhos.

Medidas		**Tamanho**		
		Menc	**Maic**	**Média** (desvio padrão
	Comprimento (mm)	7,04	9,98	8,71±1,00
Tamanho	Largura (mm)	3,93	7,64	5,23±0,87
Ventosa oral	Diâmetro (mm)	0,76	1,12	0,97±0,10
Ventosa acetabular	Diâmetro (mm)	0,79	1,12	0,94±0,09
Faringe	Comprimento (mm)	0,18	0,36	0,28±0,05
	Largura (mm)	0,21	0,36	0,29±0,03
Testículo ovariano	Comprimento (mm)	0,27	1,17	0,75±0,24
	Largura (mm)	0,36	1,32	0,79±0,23
Testículo oposto	Comprimento (mm)	0,39	1,04	0,68±0,19
	Largura (mm)	0,44	1,17	1,08±1,18
Ovário	Comprimento (mm)	0,26	0,54	0,38±0,08
	Largura (μm)	0,26	0,65	0,47±0,11
Ovos	Comprimento (μm)	40	55	45,88±4,54
	Largura (mm)	26	32,5	28,80±1,62
Distância entre as ventosas	(mm)	2,21	3,12	2,70±0,28
Razão entre as ventosas	Oral/acetabular	0,78	1,25	1,03±0,12

Figura 4. *E. coelomaticum*, lâmina pronta para análise.



Fonte: Prof. Dr. Alexey Bogado

8.4 Protocolo de extração de DNA e de PCR

8.4.1. Extraçao de DNA

O DNA foi extraído de 26 *Eurytrema* spp., totalizando 13 “pools”. Foram usados dois parasitas para cada “pool”, quantidade requerida pelo Kit de extração, totalizando 25 mg. De acordo com o Easy-DNA ™ Kit-Life (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA), foram efetuados os seguintes procedimentos: Os parasitos foram colocados em tubos de 1500 µl, foram macerados e posteriormente foi adicionado o tampão de digestão. Os tubos foram fechados e homogeneizados em “vortex” , em seguida estas amostras foram incubadas por 3 horas, a 55°C em termo bloco; após as amostras foram transferidas para outros tubos e postas em centrifuga a 13.000 rpm por três minutos; colheu-se o sedimento, e novamente transferiu-se o conteúdo das amostras para novos tubos; foi adicionado 20µl de Rnase, as amostras foram homogeneizadas novamente em “vortex” e posteriormente deixadas em repouso a temperatura ambiente por dois minutos; em seguida adicionou-se 200 µl de Genomic Lysis/Binding Buffer, etanol absoluto e os tubos foram homogeneizados em “vortex” por 30 segundos; novamente o conteúdo dos tubos foram transferidos para novos recipientes (Genomic Spin Columns) e realizada nova centrifugação por um minuto a 13.000 rpm; foram desacopladas as partes inferiores do tubo, contendo o conteúdo que decantou durante a centrifugação, encaixados em novos suportes, e adicionado 500 µl do liquido buffer 1, centrifugou-se novamente por um minuto; o tubo coletor foi descartado e a coluna foi acoplada em um outro tubo coletor; em seguida foi adicionado 500µl do buffer 2, e centrifugou-se por três minutos; novamente o tubo coletor foi descartado; as colunas foram colocadas em novos tubos e foi adicionado 50µl do Elution Buffer; as amostras foram encubadas por um minuto a temperatura ambiente e centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto; após este processo as colunas foram retiradas e o material extraído (DNA) foram transferidos para tubos de 0,05 µl e estocados a -20°C.

8.4.2 PCR

Para a PCR, foram utilizados os seguintes procedimentos para cada amostra: 31 µl de DPEC; 5,0 µl de buffer 10x; 2,5 µl de MgCl2; 4,0 µl de dNTP; 1,0 µl do primer E-18S-F (5’- GGC TCA TTA AAT CAG CTA TGG TT -3’); 1,0 µl do E-18S-

R (5’- ACG ACT TTT ACT TCC TCT AAA T -3’); 0,5 µl Taq polimerase platinum; mais 1,0 µl de DNA por reação. O protocolo utilizado foi de acordo com ZHENG, (2007) com algumas modificações: ciclo de desnaturação a 94° C por 5 min, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 2 min a 72°C seguidos de 72°C por 10 min. Controles positivos foram incluídos em todas as reações de PCR. Água livre de nuclease (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA) foi utilizada como controle negativo. Os resultados da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etidio, e examinado sob luz ultravioleta.

8.4.3 Sequenciamento e analise filogenética

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e submetidos ao sequenciamento direto, utilizando-se dos primers forward e reverse. A sequência parcial do nucleotídeo foi inicialmente comparada pelo programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), com sequencias similares depositadas no GenBank. Foram alinhadas as sequencias obtidas e construiu-se uma arvore filogenética baseada no gene parcial 18S rRNA da família dos trematódeos digenéticos a partir do programa MEGA 6.0. (TAMURA et al. 2013), construída a partir do método “neighbor-joining”, baseado em 1,000 bootstrapped data sets; valores de distância foram calculados usando-se the Kimura 2 parameter model. *Fasciola gigantica* foi utilizada como out-group para promover a estabilidade na construção da arvore.

A matriz de identidade foi gerada através do software BioEdit (Hall 1999).

Tabela 2. Matriz de identidade, as sequencias destes estudos estão demarcadas (Estrela).

Sequences	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1. KJ010809 *	ID	1	1	0,998	0,994	0,992	0,99	0,986	0,986	0,941
2. KJ010808 *	1	ID	1	0,998	0,994	0,992	0,99	0,986	0,986	0,941
3. KJ010810 *	1	1	ID	0,998	0,994	0,992	0,99	0,986	0,986	0,941
4. DQ401035 E. coelmaticum	0,998	0,998	0,998	ID	0,992	0,99	0,988	0,984	0,984	0,939
5. DQ401034 E. pancreaticum	0,994	0,994	0,994	0,992	ID	0,998	0,996	0,988	0,992	0,946
6. AY222143 L. collurionis	0,992	0,992	0,992	0,99	0,998	ID	0,994	0,986	0,99	0,945
7. JN831598 P. leirsi	0,99	0,99	0,99	0,988	0,996	0,994	ID	0,988	0,992	0,946
8. Y11236 D.dendriticum	0,986	0,986	0,986	0,984	0,988	0,986	0,988	ID	0,996	0,939
9. EF547131 D. orientalis	0,986	0,986	0,986	0,984	0,992	0,99	0,992	0,996	ID	0,943
10. AJ004804 F. gigantica	0,941	0,941	0,941	0,939	0,946	0,945	0,946	0,939	0,943	ID