

A IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA RAPD PARA A IDENTIFICAÇÃO DE DACTILOGRÍDEOS EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Enio Lupchinski Jr.
Lauro Vargas
Ricardo Pereira Ribeiro
Heden Luiz Marques Moreira
Marivone Valentim
Jayme Aparecido Povh

LUPCHINSKI JR¹; E., VARGAS²; L., RIBEIRO²; R.P., MOREIRA⁵; H.L.M., VALENTIM⁴; M., POVH³; J.A. A importância da utilização da técnica RAPD para a identificação de dactilogirídeos em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.49-57, 2006

RESUMO: A aquicultura é atualmente uma importante fonte de proteína animal em várias regiões do mundo. A tilápia é mais resistente às doenças bacterianas, parasitárias e viróticas do que a maioria dos peixes cultivados. No entanto a ocorrência de parasitoses pode preocupar, principalmente sob condições de estresse e altas densidades de cultivo. Os platenários da classe Monogenea estão entre os principais ectoparasitas de água doce. A identificação das espécies de monogenéticos em peixes está baseada, principalmente, em aspectos morfológicos. Atualmente, a Biologia Molecular desempenha um importante papel em estudos ligados à sistemática e filogenia. A técnica por RAPD pode desempenhar um papel importante nesse sentido. A correta identificação dos parasitas é fundamental para sua melhor sistematização e compreensão das relações filogenéticas, o que pode ser relevante na separação de organismos próximos. A clara distinção entre espécies ou cepas pode ser fundamental para a identificação de diferentes características bioquímicas, ecológicas, etológicas, padrões de dispersão, patogenicidade, resistência a medicamentos, dentre outras. O caminho mais plausível a ser seguido parece ser a somatória dos enfoques morfológico com o refinamento das análises, por meio de métodos moleculares.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia molecular. Dactilogirídeos. RAPD. Tilápia do Nilo.

THE IMPORTANCE OF THE USE OF RAPD TECHNIQUE FOR THE IDENTIFICATION OF DACTYLOGYRIDAE IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

LUPCHINSKI JR¹; E., VARGAS²; L., RIBEIRO²; R.P., MOREIRA⁵; H.L.M., VALENTIM⁴; M., POVH³; J.A. The importance of the use of RAPD technique for the identification of dactylogyridae in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.49-57, 2006

ABSTRACT: The aquaculture is currently an important source of animal protein in several areas of the world. The tilapia is more resistant to the bacterial, parasitic, and viral diseases than most of the farm-raised fish. However, parasitosis occurrence may worry, mainly under stress conditions and high cultivation densities. The platenarians of the Monogenean class are among the main ectoparasites of freshwater. The identification of the monogenic species in fish is mainly based on morphological aspects. Nowadays, the molecular biology plays an important role in studies related to both systematic and phylogeny. The RAPD technique may support this important role, as well. The correct identification of the parasites is fundamental for the better systemization and understanding of the phylogenetic relationships, which can be relevant to the separation of close organisms. The clear distinction among the species or strains can be fundamental for the identification of different biochemical, ecological, and ethological characteristics, as well as for the dispersion patterns, pathogen, and the resistance to medicines, among others. The most plausible way to proceed seems to be the effort of the morphologic focuses together with the refinement of the analyses by molecular methods.

KEY WORDS: Molecular biology. Dactylogyridae. RAPD. Nile tilapia.

¹Aluno do curso de Pós-Graduação em Zootecnia-Universidade Estadual de Maringá - Avenida Colombo, 5790 - bloco 32 - CEP: 87020-900 - Maringá, PR, Brasil. E-mail: lupi0@yahoo.com.br

²Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-Universidade Estadual de Maringá - UEM - PR.

³Aluno do curso de Pós-Graduação em Zootecnia-Universidade Estadual de Maringá - UEM - PR.

⁴Médica Veterinária MSc., Professora da Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina - PR.

⁵Professor Doutor da Universidade Federal de Pelotas - UFPEL - RS

IMPORTANCIA DE LA UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA RAPD PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DACTILOGRÍDEOS EN TILAPIAS DEL NILO (*Oreochromis niloticus*)

LUPCHINSKI JR¹; E., VARGAS²; L., RIBEIRO²; R.P., MOREIRA⁵; H.L.M., VALENTIM⁴; M., POVH³; J.A. Importancia de la utilización de la técnica RAPD para la identificación de dactilogirídeos en Tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umarama*, v. 9, n. 1, p.49-57, 2006

RESUMEN: Actualmente la acuicultura es una importante fuente de proteína animal en varias regiones del mundo. La tilapia es más resistente a las enfermedades bacterianas, parasitarias y viróticas que la mayoría de los peces cultivados. Sin embargo, la incidencia de parasitosis puede preocupar, principalmente en condiciones de estrés y con altas densidades de cultivo. Los platelmintos de la clase Monogenea se encuentran entre los principales ectoparásitos de agua dulce. La identificación de las especies de monogénicos en peces se basa, principalmente, en aspectos morfológicos. Actualmente, la biología molecular tiene un papel importante en estudios sobre sistemática y filogenia. La técnica RAPD puede representar un importante papel, en este sentido. La correcta identificación de los parásitos es fundamental para una mejor sistematización y comprensión de las relaciones filogenéticas, lo que puede ser importante en la separación de organismos próximos. La clara distinción entre especies o cepas puede ser fundamental para la identificación de diferentes características bioquímicas, ecológicas, etológicas, padrones de dispersión, patogenia, resistencia a medicamentos, entre otras. El camino más lógico a seguir parece ser la suma de los enfoques morfológicos con la precisión de los análisis, por medio de métodos moleculares.

PALABRAS CLAVE: Biología molecular. Dactilogirídeos. RAPD. Tilapia del Nilo.

Introdução

O crescimento da população humana requer um aumento constante na produção de alimentos. Esse aumento deve ser realizado, utilizando preferencialmente métodos de produção que diminuam os custos envolvidos e que utilizem os recursos naturais de modo racional (DÓRIA & LEONHARDT, 1995).

A aqüicultura é atualmente uma importante fonte de proteína animal em várias regiões do mundo. Aproximadamente 10 espécies são responsáveis por mais de 80% da produção mundial. Em 1987, a produção aqüícola respondia por um total de 13 milhões de toneladas, já, em 1999, esse número correspondia a 38 milhões, dos quais os peixes de água doce foram responsáveis por aproximadamente 17,3 milhões (FAO, 2001). Segundo Fitzsimmons (2000), a indústria produtora de tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil apresenta um dos crescimentos mais rápidos do continente americano. A produção de tilápias registrada foi de 30.000 toneladas em 1997, esperando-se cerca de 125.000 toneladas para o ano de 2010.

As tilápias são mais resistentes às doenças bacterianas, parasitárias e viróticas do que a maioria dos peixes cultivados. Raramente adoecem em água com temperatura maior que 16° ou 18°C, na ausência de estresse ambiental (POPMA & LOVSHIN, 1996). Segundo Kubitza (2000), a susceptibilidade das tilápias às parasitoses depende de diversos fatores, como: espécie ou linhagem; qualidade de água e carga orgânica nas unidades de produção; estado nutricional dos peixes; e, particularmente, a temperatura da água. Ou seja, quando submetidas a situações de estresse, algumas infecções podem ser registradas.

Stickney (2000) considerou que o cultivo de tilápias se tem expandido, e a densidade de peixes, em vários sistemas aquáticos, tem aumentado e portanto as doenças podem causar prejuízos. Na maioria das vezes, as doenças que ocorrem são causadas por microrganismos e parasitas já descritos para outras espécies cultivadas.

A temperatura ambiental aparece como um dos principais fatores abióticos determinantes dos padrões sazonais de distribuição em parasitas de peixes, inclusive monogénicos, o que confirma o fato de que a temperatura da água é um fator importante tanto para o ciclo de vida de hospedeiros quanto de parasitas (GRÖBEN; LYAIMAN; BAUER; PROST; IZYUMOVA & MALATALOV; GELMAR *apud* VALTONEN *et al.*, 1990).

Muitas espécies de parasitas infestam peixes de águas tropicais, sendo que algumas podem ser altamente patogênicas, enquanto outras não representam grave prejuízo. Os parasitas são importantes em relação ao estado geral de saúde dos peixes tropicais (MITCHUM, 1995 *apud* PLUMB, 2001).

Cone (1995) considera que as doenças provocadas por ectoparasitas platelmintos, da classe Monogenea, estão entre as mais importantes para a piscicultura, pois esses parasitas se nutrem de sangue e tecidos dos hospedeiros, podendo atuar como vetor mecânico de vírus e bactérias patogênicos.

Segundo Pavanelli *et al.* (2002), grandes mortalidades já foram verificadas em peixes de água doce, principalmente em sistemas de criação com alta concentração de animais, em que as doenças provocadas por monogénicos estão entre as mais danosas para a piscicultura.

Os monogénicos pertencem principalmente a duas grandes famílias: girodactilídeos e dactilogirídeos (VARGAS, 2001; PAVANELLI *et al.*, 2002). Ainda, segundo Cribb *et al.* (2002), os monogénicos são ectoparasitas de todos os grupos de peixes, mas a sua maior diversidade aparece em teleosteos.

Os dactilogirídeos rivalizam com os girodactilídeos e os poliopistocotilídeos como parasitas de teleosteos, em termos de especiação (KEARN, 1994). Yamaguti (1963) listou mais de 60 gêneros de dactilogirídeos que parasitam teleosteos marinhos e de água doce, muitos provavelmente continuam a ser desconhecidos, principalmente nas regiões tropicais e equatoriais ao redor de todo o mundo, sobretudo

na Bacia Amazônica, bacia hidrográfica de biodiversidade reconhecidamente elevada.

Nas regiões tropicais, pouco exploradas, provavelmente há um número enorme de espécies desconhecidas de monogenéticos. O autor sugeriu que a maior riqueza de espécies existentes em baixas latitudes é devido, principalmente, ao gradiente mediado pela temperatura e sua ação efetiva no tempo evolucionário. A evolução e especiação ocorreram em taxas maiores nas regiões que sofreram o efeito desse gradiente, ou seja, as de baixas latitudes. Por exemplo, a diversidade de espécies de monogenéticos é muito mais elevada em peixes marinhos de recifes de coral do que nos de água temperada, especialmente aqueles explorados comercialmente, e, por isso mesmo, mais bem estudadas (POULIN, 2002).

Whittington (1998) estimou que a fauna mundial de peixes é parasitada por cerca de 25.000 espécies de monogenéticos, das quais apenas entre 3.000-4.000 estão descritas.

Revisão de Literatura

Aspectos gerais

Os monogenéticos são ectoparasitas que se caracterizam, principalmente, pela presença de um aparelho de fixação localizado geralmente na parte posterior do corpo - o haptor (PAVANELLI *et al.*, 2002).

A maioria das famílias de monogenéticos é classificada, segundo características morfológicas, sobretudo em relação ao haptor (CRIBB *et al.*, 2002). Ainda, segundo Huyse & Volckaert (2002), o método de identificação morfológico é baseado na análise das partes rígidas do aparato de fixação posterior, sendo que as características dos ganchos marginais são cruciais na discriminação de muitas espécies intimamente relacionadas.

Para girodactilídeos foi demonstrado, tanto experimentalmente quanto em condições naturais, que as estruturas do haptor apresentam um alto grau de variação, na forma e tamanho, relacionadas com a temperatura da água; idade dos parasitas; espécies de peixes hospedeiros; distribuição geográfica e localização no hospedeiro (ERGENS *apud* MATEJUSOVÁ *et al.*, 2001).

Segundo Kearn (1994) e Huyse & Volckaert (2002), os girodactilídeos apresentam um maior conservacionismo anatômico no seu aparato de fixação do que outros monogenéticos, como os dactilogirídeos. Ou seja, se considerarmos os dactilogirídeos, a expressão de sua plasticidade genética poderá ser mais acentuada intra-especificamente, o que pode dificultar a clara distinção morfológica de muitas espécies, sobretudo as congêneres. E qualquer tipo de técnica que possibilite um complemento às informações morfológicas, ou uma melhor análise das relações filogenéticas deve ser aproveitada e utilizada.

Classe Monogenea

Os monogenéticos são parasitas do grupo dos platelmintos, caracterizando-se pela presença de um aparelho de fixação localizado geralmente na parte posterior do corpo, o haptor. Essa estrutura é formada por um conjunto de ganchos, barras e âncoras, de número e tamanho variáveis,

responsáveis pela fixação. Provocam uma série de reações fisiológicas no hospedeiro, como hiperplasia do tecido branquial, excessiva produção de muco e fusão dos filamentos branquiais, o que, dependendo do grau de severidade, pode levar o hospedeiro à morte por asfixia (PAVANELLI *et al.*, 2002).

Esses parasitas são subdivididos primariamente, segundo Eiras (1994), nas subclasses Monopisthocotylea (também denominada Polyonchoinea) e Polyopisthocotylea (também denominada Olygonchoinea). Monopisthocotylea apresenta: aparelho de fixação posterior parcialmente subdividido por septos, um a três pares de "hamuli", também chamados de ganchos centrais (EIRAS, 1994), ganchos marginais; ventosa oral ausente; canal genitointestinal ausente; olhos muitas vezes presentes; alimentam-se de muco e células epiteliais do hospedeiro. Polyopisthocotylea possui: aparelho de fixação muitas vezes subdividido, com várias ventosas, formações em pinça ou complexos de ganchos; boca geralmente rodeada de ventosas; canal genitointestinal presente; olhos freqüentemente ausentes; são hematófagos.

Os aparelhos de fixação são bastante característicos e importantíssimos sob o ponto de vista da sistemática, quando estão na região anterior são denominados "prohaptor" e, conseqüentemente, "opisthaptor", quando, na região posterior do corpo. Quase todo "prohaptor" tem elementos glandulares que segregam substâncias adesivas e são considerados menos eficientes e de importância secundária. Sob outro aspecto, a estrutura do aparelho de fixação posterior, comumente chamado apenas de haptor, é muito mais variada e complexa, geralmente considerada de importância fundamental no estudo de linhas evolutivas (KEARN, 1994; POULIN, 2002).

Segundo Eiras (1994), nos Monopisthocotylea, o haptor resulta da transformação direta do aparelho de fixação larval, que é bastante semelhante ao adulto. Geralmente, apresenta uma forma sensivelmente arredondada, raramente peduncular, possui pequenos ganchos marginais e grandes ganchos centrais (os "hamuli"), unidos por barras transversais, ambos em número variável.

Os monogenéticos adultos possuem forma alongada, ovoidal ou circular e medem de um milímetro a três centímetros. Todos são hermafroditas e possuem um aparelho sexual bastante complexo que, em alguns casos, é utilizado como critério filogenético. O ciclo de vida é simples e direto. Normalmente são ectoparasitas, localizando-se nas brânquias, podendo, no entanto, ocorrer em outros locais no hospedeiro, como tegumento, nadadeiras e cavidades nasais (EIRAS, 1994; PAVANELLI *et al.*, 2002).

As espécies parasitas pertencem principalmente a duas grandes famílias: Dactylogyridae e Gyrodactylidae (VARGAS, 2001; PAVANELLI *et al.*, 2002). Os girodactilídeos são vivíparos e os indivíduos dessa família são, na sua maioria, parasitas de tegumento, podendo ocorrer também nas brânquias. Os dactilogirídeos são ovíparos, quase sempre encontrados nas brânquias, podendo alojar-se também nas cavidades nasais e, mais raramente, em outras partes do corpo.

Gyrodactylus sp. e *Dactylogyrus* sp. são os monogenéticos mais freqüentemente observados em cultivos de tilápias. As infestações de monogenéticos em pós-larvas

e alevinos durante a reversão sexual podem resultar em elevada mortalidade, sendo freqüente a perda de lotes inteiros (KUBITZA, 2000).

Família Dactylogyridae

Os parasitas da família Dactylogyridae pertencem à subordem Dactylogyrynea, ordem Dactylogyridea, subclasse Polyonchoinea, conhecida como Monopisthocotylea, classe Monogenea, filo Platyhelminthes e ao reino Animalia (BOEGER & KRITSKY, 2001).

Os Dactylogyridae são importantes Monopisthocotylea, dos quais foram descritas numerosas espécies, algumas com acentuada importância econômica. Segundo Pavanelli *et al.* (2002), já foram verificadas altas mortalidades de peixes, principalmente em cultivos intensivos.

Eiras (1994) considerou o gênero *Dactylogyryrus* como o mais freqüente da família Dactylogyridae. E citou duas espécies que já causaram grandes perdas no cultivo de carpas comuns (*Cyprinus carpio*): *D. extensus* e *D. vastator*, talvez as duas mais importantes na história do cultivo dos ciprinídeos. Outras espécies citadas por Cone (1995) e que também causaram prejuízos para a piscicultura foram: *D. achmerowi*, *D. anchoratus*, *D. crassus*, *D. minutus*, *D. mrazaki* e *D. yinwenyingae*.

Conroy & Conroy (1998) afirmaram que uma importante espécie que acomete as tilápias cultivadas e silvestres, tanto na África como nas Américas, é o dactilogirídeo *Cichlidogyryrus tilapiae*. Outras espécies encontradas na África e Ásia, que também infestam tilápias são: *C. arthrachantus*, *C. bifurcatus*, *C. cirratus*, *C. sclerosus*, *C. tiberianus* e *C. tubicirrus minutus*.

A maior parte dos dactilogirídeos tem corpo alongado, ligeiramente achatado dorso-ventralmente e um aparelho de fixação com estruturas esclerotizadas (ganchos, âncoras e barras). Os adultos têm geralmente dois pares de receptores de luz pigmentados, que se localizam em frente e por cima da abertura oral. Em alguns exemplares, podem ser substituídos por grânulos dispersos, ou até mesmo não existir (EIRAS, 1994).

Cone (1995) afirmou que os membros dessa família formam um grupo de parasitas que se localizam, predominantemente, nas brânquias de teleósteos marinhos e de água doce. Todos são ovíparos e relativamente pequenos, Poulin (2002) relatou que a maioria dos dactilogirídeos tem menos de um milímetro de comprimento corporal. Na parte anterior do corpo apresentam dois lobos cefálicos que contém secreções das células glandulares adesivas. O seu pênis é esclerotizado, com um formato espécie-específico. Possuem uma faringe muscular e um intestino posterior tubular. O haptor tem 2 pares de ganchos centrais (“hamuli”) e 14 ganchos marginais.

Na maioria dos dactilogirídeos, os quatro “hamuli” são conectados funcionalmente em dois pares laterais, cada par contendo um “hamulus” dorsal e ventral que se contrapõem, empalando a base de duas lamelas secundárias entre as quais está localizado o haptor. Os ganchos marginais têm uma importância complementar com dois pares normalmente localizados dorsalmente (EIRAS, 1994; KEARN, 1994).

Alguns dactilogirídeos apresentam os “hamuli” com

grandes diferenças de tamanho entre si, em *Heteronchocleidus ctenopomae* um dos quatro “hamuli” é vestigial e, em *Bifurcohaptor* sp. os “hamuli” dorsais são hipertrofiados. Em *Ancylo-discoides* sp. há uma tendência para redução de tamanho dos “hamuli” ventrais (GUSEV & STRELKOV, 1960), assim como em *Dactylogyryrus* sp. e aparentados com os “hamuli” ventrais ainda mais reduzidos, praticamente vestigiais. Em *Dactylogyryrus* sp., o comprimento dos ganchos marginais está aumentado por extensões, que adquiriram importância suplementar para os “hamuli”.

Kearn (1994) considerou que a invasão das câmaras branquiais pode ter representado um avanço na expansão evolucionária dos monogenéticos. A partir de um ancestral ectoparasita de tegumento, os parasitas se diversificaram e invadiram cavidades, tais como boca e cavidade branquial, em busca de novos nichos disponíveis; dentre eles os dactilogirídeos. Adicionalmente, o espaço mais compacto pode representar uma maior facilidade em termos reprodutivos e maior proteção contra predação por organismos limpadores.

Um importante problema de instalação nas brânquias, salientou Kearn (1994), é o fluxo de água, que pode ser bastante competente e de característica constante. Uma solução adquirida pela família, para o problema da ancoragem entre as lamelas secundárias, foi o desenvolvimento de um segundo par de “hamuli”, em relação ao ectoparasita ancestral. Esse novo par, orientado dorsalmente, representou uma grande diversificação e especiação em termos de expansão evolucionária e aconteceu paralelamente com a explosão evolutiva dos teleósteos.

A locomoção entre as lamelas requer um gasto energético substancial, além do risco de deslocamento, devido à correnteza constante e poderosa; portanto muitos dactilogirídeos se tornaram sedentários. Entretanto uma razão para a preservação da mobilidade é que a locomoção permite a inseminação cruzada, mantendo assim a diversidade genética (KEARN, 1994). A importância desses fatos e a necessidade de evitar a hibridização por cruzamentos interespecíficos, levaram a um aumento na diversidade de escleritos copulatórios em dactilogirídeos, que podem ser utilizados para classificar espécies próximas (CONE, 1995; BOEGER & KRITSKY, 1997).

Algumas características morfológicas permitem que os dactilogirídeos poupem energia, evitando a locomoção, e, ao mesmo tempo, mantenham o seu potencial para inseminação cruzada. O desenvolvimento da capacidade de extensão de seus corpos para alcançar outros parasitas em lamelas ou hemibrânquias adjacentes, o que acontece em *Chauhanellus australis* (KEARN & WHITTINGTON, 1994), ou de aparatos sexuais extensíveis, como acontece em *Telegamatrix ramalingami*, permite-lhes esse contato à distância.

Um fator importante, em oposição às tendências sedentárias desses parasitas, é o fato de que a locomoção deve estar sempre um passo adiante em relação à reação inflamatória local do hospedeiro. A alternância de locais deve ocorrer antes que o haptor fique preso aos tecidos do hospedeiro, sendo esse o primeiro passo no processo de eliminação, seguido da expulsão do nódulo em que o parasita está fixo. Porém alguns dactilogirídeos reverteram esse

processo de encapsulamento de seu haptor como vantagem, pois isso lhes confere uma estabilidade que diminui os perigos durante sua vida reprodutiva e que permite uma fixação segura sem um constante dispêndio de energia (KEARN, 1994).

O número de espécies, em uma determinada área, sob o ponto de vista ecológico, reflete um equilíbrio entre as taxas de colonização externa e as taxas de extinção intrínsecas. Em termos evolutivos, novas espécies podem ser geradas internamente por especiação. Um processo semelhante determina a riqueza de parasitas que afetam uma população de hospedeiros. Em relação à diversificação de linhagens de parasitas, a especiação intra-hospedeiro pode ser importante. Brooks & McLennan (1993) sugeriram que, entre monogênicos, a especiação simpátrica (especiação intra-hospedeiro) pode ser mais usual que em outros grupos de parasitas, por causa de algumas características biológicas, como: ciclo de vida direto e relativa longevidade. Espécies congêneres de monogênicos explorando o mesmo hospedeiro podem representar casos de simpatria.

Os dactilogirídeos que apresentam casos de espécies congêneres, ocorrendo em uma população de hospedeiros, podem representar casos de agregação de espécies, resultantes de eventos de radiação em pequena escala. Essa família representa uma das poucas nas quais essa agregação de espécies congêneres é comum (POULIN, 2002).

RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

O desenvolvimento da técnica de PCR, na segunda metade dos anos 80, teve um grande impacto no estudo das ciências biológicas. A propriedade de amplificar seletivamente uma região específica do genoma, a partir de uma pequena amostra de DNA, fez dessa técnica uma poderosa ferramenta para aplicação nos estudos ligados à genética (MONIS & ANDREWS, 1998).

A técnica do DNA polimórfico amplificado aleatoriamente - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), é baseada na amplificação por reação em cadeia da enzima polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction) de regiões discretas do genoma, com a utilização de iniciadores (*primers*) formados por um pequeno número de nucleotídeos de seqüência arbitrária (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990; ROLLINSON *et al.*, 1997; MONIS & ANDREWS, 1998).

Um dos pontos relevantes da técnica é que não há necessidade de um conhecimento prévio do genoma dos organismos (McMANUS & BOWLES, 1996; DAHLE *et al.*, 1997; ROLLINSON *et al.*, 1997; CHAMBERS *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002; BARMAN *et al.*, 2003). A pesquisa do genoma de parasitas também é beneficiada pela vantagem de que a informação inicial da seqüência de DNA não é necessária (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990; DAHLE *et al.*, 1997; McMANUS & BOWLES, 1996; DAHLE *et al.*, 1997; ROLLINSON *et al.*, 1997; CHAMBERS *et al.*, 1998; BARMAN *et al.*, 2003).

A técnica geralmente envolve o uso de iniciadores com dez bases, em um protocolo de PCR de baixa seletividade; os iniciadores se anelam a numerosos locais homólogos do genoma para gerar um grande número de fragmentos de DNA por meio de amplificações subseqüentes. Diferentes

iniciadores geram distintos padrões de fragmentos, o que permite uma investigação sobre a variação genética dos exemplares em questão (ROLLINSON *et al.*, 1997). Com essa metodologia, há a possibilidade do uso de um número praticamente ilimitado de iniciadores, cada um detectando a variação em diferentes regiões do genoma (DAHLE *et al.*, 1997; OLIVEIRA, *et al.*, 2002).

Monis & Andrews (1998) consideraram que a técnica de RAPD, também conhecida como PCR iniciado arbitrariamente (AP-PCR – “Arbitrarily-primed PCR”), está sendo amplamente utilizada para o delineamento de linhagens em estudos de epidemiologia. Os fragmentos resultantes são separados em géis de eletroforese, e os padrões de bandas são usados como identificadores (*fingerprints*) para comparação de distintas linhagens.

Essa técnica, quando devidamente aplicada, tem precisão suficiente para a identificação específica (DIAS *et al.*, *apud* KAUKAS, 1994). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1996), a técnica de RAPD pode servir de ferramenta para aplicações que incluem: a obtenção de identificadores genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais; o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica.

Essa metodologia pode ser empregada em uma diversa gama de organismo (ROLLINSON & STOTHARD, 1994). Segundo Chambers *et al.* (1998), tem sido usada regularmente para detectar variações intra-específicas e também variações específicas, em protozoários, gastrópodes e peixes. Também tem sido utilizada como ferramenta na análise de linhagens de ratos e entre diferentes espécies de peixes e moluscos (DAHLE *et al.*, 1997). O método é simples e de rápida execução (KAUKAS *et al.*, 1994; DAHLE *et al.*, 1997; BÁRTFAI *et al.*, 2003), e tem sido amplamente utilizada para detectar a diversidade genética em plantas, animais e microrganismos (BARMAN *et al.*, 2003).

A análise por RAPD tem sido usada para a identificação de espécies e subespécies de peixes, como, por exemplo, em *guppy* (DINESH *et al.*, 1993), tilápia (BARDAKCI & SKIBINSKI, 1994; DINESH *et al.*, 1996), trutas e salmões (ELO *et al.*, 1997), ictalurídeos (LIU *et al.*, 1999) e carpas indianas (BARMAN *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2005).

No Brasil, diversos trabalhos estão sendo realizados com o uso de marcadores moleculares em organismos aquáticos. Oliveira *et al.* (2002) estimaram, com êxito, a diversidade genética pela técnica RAPD, para isolar duas espécies do gênero *Steindachnerina*, da bacia do Rio Paraná. Assim como Povh *et al.* (2005) avaliaram a divergência genética nas linhagens Bouaké e Chitralada de tilápia do Nilo e concluíram que a técnica por RAPD foi eficaz para diferenciar essas duas linhagens.

Prioli *et al.* (2002) realizaram a identificação da espécie *Astyanax altiparanae* com a utilização de marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial e RAPD. Ambos os resultados demonstraram que a espécie anteriormente denominada *Astyanax bimaculatus* pertence, na realidade, à espécie *Astyanax altiparanae*. A similaridade genética entre as três populações analisadas foi tão elevada,

que não é consistente afirmar que existem duas espécies do gênero *Astyanax* naquele trecho do Rio Paraná. Ou seja, confirmaram que a técnica RAPD pode ser usada com sucesso para complementar os estudos de filogenia e sistemática em populações naturais de peixes, nos níveis específicos e subespecíficos (ALMEIDA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; PRIOLI *et al.*, 2002).

Dias Neto (1993) confirmou a utilidade da técnica de RAPD para a segregação e identificação de linhagens e espécies de parasitas do gênero *Schistosoma* sp. Bem como Singh (1997), que afirmou que essa técnica permite a análise da variação genética e a obtenção de identificadores de diversas linhagens de parasitas, como *Leishmania* sp., *Cryptosporidium* sp., tripanosomas e *Giardia* sp.

Para *Giardia lamblia*, Pelayo *et al.* (2003) utilizaram a técnica com sucesso para demonstrar a correlação entre as características genéticas e o comportamento epidemiológico e clínico do protozoário, ou seja, distinguir características fenotípicas com uma ferramenta da Biologia Molecular, a técnica RAPD. Nos ectoparasitas facultativos de ovelhas, *Lucilia cuprina* e *Lucila sericata*, Stevens & Wall (1997) analisaram a variação genética com sucesso, a distinção entre as duas espécies ficou clara, coincidiu com a classificação morfológica, e não encontraram variação significativa intra-específica para ambas.

Apesar das limitações inerentes ao próprio método, Monis & Andrews (1998) consideraram que essa técnica está sendo cada vez mais utilizada para caracterização de uma variedade de parasitas, sobretudo em conjunto com outros métodos, como técnicas variantes da PCR. Barman *et al.* (2003) salientaram que se deve ter cuidado em conclusões sistemáticas baseadas apenas em análises por RAPD, porém elas podem ser de grande utilidade para as observações iniciais sobre variação genética, particularmente em espécies em que pouca informação está disponível.

Resumidamente, as vantagens na aplicação do método incluem: a pequena quantidade de DNA genômico necessária, quando é comparada a outros métodos baseados em PCR, a ausência de conhecimento prévio do genoma em questão, a geração de uma grande quantidade de polimorfismo distribuído por todo o genoma, a visualização direta das bandas nos géis; e, em contraponto, não requer experiência aprofundada nem tampouco instalações de laboratório sofisticadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Biologia Molecular em parasitas

Desde a introdução de ferramentas de Biologia Molecular na taxonomia, sistemática e filogenia, a descrição de muitas espécies foi reavaliada, novas espécies foram descritas, enquanto algumas assumiram novas posições taxonômicas (BURRIDGE & WHITE, 2000; JOUSSON *et al.*, 2000; DESDEVISES, 2001; LAZOSKI *et al.* *apud* HUYSE & VOLCKAERT, 2002).

As técnicas empregadas atualmente na biologia molecular permitem aos geneticistas e melhoradores estudarem diretamente as variações do DNA ao longo de todo o genótipo dos animais (MOREIRA, 2001). McManus & Bowles (1996) afirmaram, ainda, que a análise da seqüência de DNA oferece a mais direta abordagem para a caracterização

de distintas espécies, subespécies e linhagens.

O desenvolvimento da Biologia Molecular tem provido muitas áreas das ciências biomédicas com novos e eficazes instrumentos, que podem ser usados para estudos básicos ou avançados dos sistemas biológicos (PRICHARD, 1997). Ainda, segundo esse autor, devido ao tamanho reduzido dos parasitas, muitas vezes há necessidade de se sacrificar os hospedeiros para o seu estudo. Usando técnicas de biologia molecular, podemos coletá-los sem a necessidade freqüente de sacrificar animais e, adicionalmente, estudar a biologia dos parasitas com grande precisão e especificidade.

Várias estratégias para a geração de marcadores moleculares estão sendo empregadas, inclusive diversas para analisar a estrutura da população em organismos aquáticos (YAN *et al.*, 2005). Entre elas, a utilização de isoenzimas, RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), DNA *fingerprinting* com sondas multifocais, RAPD e microssatélites (COUTINHO & REGINATO, 2001; YAN *et al.*, 2005).

Os microssatélites são seqüências simples repetitivas (“SSR – Simple Sequence Repeats”), compostas por nucleotídeos, repetidas em tandem. São estruturas muito freqüentes e distribuídas ao acaso, permitindo uma ampla cobertura do genoma eucarioto (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Em trabalho recente, Alam & Islam (2005) afirmaram que o número de nucleotídeos das repetições pode variar entre um e oito.

Quando utilizaram as técnicas de aloenzima e microssatélite em estudo da genética de populações da carpa comum (*Cyprinus carpio*) e do ciprinídeo *Carassius auratus*, Desvignes *et al.*, (2001) demonstraram que os marcadores encontrados por microssatélite foram altamente polimórficos quando comparados às aloenzimas.

Bártfai *et al.* (2003) compararam geneticamente duas variedades de carpa comum, por meio de marcadores RAPD e microssatélite. Eles afirmaram que, como esperado, os marcadores microssatélite forneceram informação mais detalhada, sobre a diversidade genética e isolamento de alelos particulares do que os por RAPD. Porém tanto a freqüência das bandas (RAPD) quanto a freqüência de alelos (microssatélite) foram muito similares.

De maneira semelhante, Yan *et al.* (2005) afirmaram que, apesar da boa consistência dos dados gerados tanto por ensaios RAPD quanto pelas análises por microssatélites, a metodologia de microssatélite revelou informações mais detalhadas a respeito da diversidade genética das carpas amostradas no seu estudo.

A utilização de Biologia Molecular como ferramenta taxonômica, em sistemática e filogenia de parasitas tem-se mostrado muito promissora. Recentemente, a utilização de várias técnicas está permitindo o cruzamento de informações em análises moleculares, morfológicas e estatísticas, permitindo distinguir espécies muito próximas. Olson & Littlewood (2002) utilizaram seqüências de DNA ribossômico para estimar a filogenia molecular de 27 famílias de monogenéticos e compará-la com a classificação morfológica tradicional proposta por Boeger & Kritsky (2001) e encontraram algumas diferenças entre os dois enfoques em vários níveis taxonômicos.

O seqüenciamento parcial ou total de genes do

DNA ribossômico, o seqüenciamento de fragmentos não ribossomais e a comparação entre os fragmentos obtidos por meio de técnicas variantes de PCR são ferramentas atualmente aplicadas para a análise de várias relações entre os diversos níveis de classificação, desde a definição das famílias da classe Monogenea até a clara distinção de espécies em dactilogirídeos (McMANUS & BOWLES, 1996; MATEJUSOVÁ *et al.*, 2001; HUYSE & VOLCKAERT, 2002; OLSON & LITTLEWOOD, 2002).

A análise de 31 espécies de girodactilídeos em cinco famílias de peixes teleósteos (MATEJUSOVÁ *et al.*, 2001), pelo uso de marcadores moleculares, permitiu uma clara distinção entre as espécies desses parasitas, as quais apresentaram variações interespecíficas significativas, evidenciando também uma discrepância entre a classificação morfológica e molecular.

A investigação molecular do gênero *Diplozodae* (Monogenea, Polyopisthocotylea), parasitas de brânquias em peixes da água doce (Cyprinidae), com a utilização e seqüenciamento de dois marcadores ribossomais, demonstrou uma série de relações do sistema parasita-hospedeiro que eram ignoradas, ou que apenas as características morfoanatômicas não permitiam distinguir (SICARD *et al.*, 2001). Esse estudo demonstrou claramente quais espécies são parasitas obrigatórios de uma determinada espécie de ciprinídeo, e quais parasitas podem parasitar mais de uma espécie de hospedeiro.

Huyse & Volckaert (2002) afirmaram que as ferramentas moleculares nem sempre apresentam confiabilidade absoluta, como se costuma aceitar. Muitas vezes a própria natureza dos métodos moleculares, a matemática e estatística, implícitas na manipulação dos dados, dificulta a comparação e combinação com a sistemática e taxonomia clássicas, a morfológica (OLSON & LITTLEWOOD, 2002). Outros aspectos ganham importância, ligados a métodos e locais de coleta, pois dificilmente as amostras coletadas são representativas de toda a diversidade genética de cada grupo em questão.

O caminho mais plausível a ser seguido parece ser a somatória dos enfoques morfológicos com o refinamento das análises, através de métodos moleculares (SINGH, 1997). Ou seja, com o aumento da utilização de diversas ferramentas ligadas à biologia molecular (McMANUS & BOWLES, 1996), com o conhecimento progressivo do genoma dos parasitas (MATEJUSOVÁ *et al.*, 2001; OLSON & LITTLEWOOD, 2002) e com a utilização da técnica adequada para cada situação (MONIS & ANDREWS, 1998; MONIS, 1999), pode-se somar esse novo conhecimento ao montante de informações já disponíveis, e, assim, refinar a classificação morfológica clássica (HUYSE & VOLCKAERT, 2002).

A sistemática, baseada em métodos moleculares, ocupa um papel crescente e privilegiado nos estudos atuais, e em taxonomia, especialmente nos casos onde métodos tradicionais não podem ser aplicados (MONIS, 1999). Como Prioli *et al.* (2002) destacaram, ferramentas moleculares associadas a análises morfológicas têm sido efetivamente aplicadas na definição do relacionamento entre organismos em diferentes níveis taxonômicos.

Em conclusão, Monis & Andrews (1998) e Monis

(1999) consideraram que os métodos baseados em marcadores moleculares podem ser usados com confiabilidade e precisão, desde que passem por testes e desenvolvimento adequados e, obviamente, quando forem aplicados sob as limitações pertinentes a cada método.

Comentários

Os dactilogirídeos apresentam muitos casos singulares, dentre os monogenéticos, em que apenas as soluções morfológicas parecem não esclarecer muitos aspectos filogenéticos.

Atualmente, em várias situações, a classificação baseada apenas em observações morfológicas está sendo revista a partir da utilização de técnicas ligadas à Biologia Molecular. A atual taxonomia em dactilogirídeos parece ser um dos casos em que há necessidade de uma revisão com a aplicação dessas novas técnicas.

Algumas vantagens inerentes à técnica por RAPD justificam a sua utilização em estudos de classificação. Podemos destacar que é uma metodologia consagrada na investigação genética, e uma das mais importantes no processo inicial para a geração de marcadores moleculares baseados em PCR.

A técnica de RAPD pode representar o primeiro passo na geração de marcadores genéticos para o diagnóstico específico; a detecção de marcadores ligados a aspectos econômicos, como a identificação de cepas mais virulentas; a análise da diversidade genética e o estudo em sistemática molecular em dactilogirídeos de tilápias do Nilo.

Agradecimentos

A presente revisão faz parte de uma dissertação de mestrado financiada pelo CNPq (Processo 304056/2002-2).

Referências

- ALAM, M. S.; ISLAM, M. S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 246, p. 151-160, 2005.
- ALMEIDA, F. S. *et al.* RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *J. Zool. London*, v. 253, p. 113-120, 2001.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v. 73, p. 117-123, 1994.
- BARMAN, H. K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified Polymorphic DNA assay. *Aquaculture*, Mississippi State, v. 217, n. 1/4, p. 115-123, Mar. 2003.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Mississippi State, v. 219, n. 1/4, p. 157-167, Apr. 2003.
- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C. Phylogenetic relationships of the Monogeneoidea. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor & Francis, 2001. p. 92-102.
- BROOKS, D. R.; McLENNAN, D. A. *Parasites and the Language of Evolution*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993.

- CHAMBERS, R. J.; McQUAID, C. D.; KIRBY, R. The use of randomly amplified polymorphic DNA to analyse the genetic diversity, the systematic relationships and the evolution of intertidal limpets, *Siphonaria* spp. (Pulmonata: Gastropoda), with different reproductive modes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Amsterdam, v. 227, p. 49-66, 1998.
- CONE, D. K. Monogenea (Phylum Platyhelminthes) In: WOO, P. T. K. *Fish diseases and disorders - Protozoan and metazoan infections*. Wallingford: CAB International, 1995. p. 289-327.
- CONROY, G.; CONROY, D. A. *Enfermedades y parasitos de cachamas, pacus y tilápias*. Maracay: UDATPA. 1998.
- COUTINHO, L. L.; REGINATO, L. C. A. *Uso de marcadores moleculares na indústria animal*. Brasília: Embrapa, 2001.
- CRIBB, T. H.; CHISHOLM, L. A.; BRAY, R. A. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 32, n. 3, p. 321-328, Mar. 2002.
- DAHLE, G.; RAHMAN, M.; ERIKSEN, A. G. RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*). *Fisheries Research*, Aberdeen, v. 32, n. 3, p. 263-269, Dec. 1997.
- DESVIGNES, J. F. *et al.* Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) base don allozymes and microsatellites. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 194, p. 291-301, 2001.
- DIAS NETO, E. *et al.* The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 57, n. 1, p. 83-88, jan. 1993.
- DINESH, K. R. *et al.* RAPD analysis: an efficient of DNA fingerprinting in fishes. *Zoological Science*, Singapore, v. 10, p. 849-854, 1993.
- DINESH, K. R. *et al.* Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 4, p. 19-30, 1996.
- DÓRIA, C. R. C.; LEONHARDT, J. H. Avaliação econômica de um sistema de policultivo semi-intensivo com ração e adubo orgânico. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 7., 1995. Peruíbe. *Anais...* Peruíbe: ACIESP, 1995, p. 93-95.
- EIRAS, J. C. *Elementos de Ictioparasitologia*. Porto: Afrontamento. 1994.
- ELO, K. *et al.* Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 152, p. 55-65, 1997.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN. 1996.
- FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. *Tilapia aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. p. 252-264.
- FUNDO DA ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO. *Estatísticas*. Disponível em: < <http://www.fao.org/pesca/estatistica>>. Acesso em: 20 jun. 2003.
- GUSEV, A. V.; STRELKOV, Y. A. [*Ancylo-discoides* (Monogenoidea) of Far-East sheat-fishes (*Silurus* and *Parasilurus*)] (in Russian). *Trudy Zoologicheskogo Instituta Leningrad, Leningrado*, v. 28, p. 197-255, 1960.
- HUYSE, T.; VOLCKAERT, F. A. M. Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with the description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 32, n. 7, p. 907-919, Jun. 2002.
- KAUKAS, A. *et al.* A phylogenetic analysis of *Schistosoma Haematobium* group species based on randomly amplified Polymorphic DNA. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 24, n. 2, p. 285-290, Apr. 1994.
- KEARN, G. C. Evolutionary expansion of the Monogenea. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 24, n. 8, p. 1227-1271, Dec. 1994.
- KEARN, G. C.; WHITTINGTON, I. D. Ancyrocephaline monogeneans of the genera *Chauhanellus* and *Hamatopeduncularia* from the gills of the blue catfish, *Arius graeffei*, in the Brisbane River and Moreton Bay, Queensland, Australia, with descriptions of four new species. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 24, n. 4, p. 569-588, Jul. 1994.
- KUBITZA, L. M. M. Principais parasitoses e doenças em tilápias. In: KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. p. 179-234.
- LIU, Z. J.; ARGUE, P. L.; DUNHAM, R. A. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 174, p. 59-68, 1999.
- MATEJUSOVÁ, I. *et al.* Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 31, n. 7, p. 738-745, May, 2001.
- McMANUS, D. P.; BOWLES, J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 26, n. 7, p. 687-704, Jul. 1996.
- MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 28, n. 6, p. 981-987, Jun. 1998.
- MONIS, P. T. The importance of systematics in parasitological research. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 29, n. 3, p. 381-388. Mar. 1999.
- MOREIRA, H. L. M. Genética e melhoramento de peixes. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. *Fundamentos da moderna aquicultura*. Maringá. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135-147.
- OLIVEIRA, A. V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, Maringá, v. 115, p. 259-267, 2002.
- OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogenetics of the Monogenea – evidence from a medley of molecules. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 32, n. 3, p. 233-244, Mar. 2002.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 2. ed. Maringá: EDUEM, 2002.

- PELAYO, L. *et al.* Genet characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. *Experimental parasitology*, v. 104, p. 162-166, 2003.
- POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, jan./mar. 2005.
- PLUMB, J. A. Overview of warm-water fish diseases In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Nutrition and fish health*. Binghamton: Food Products Press, 2001. p. 1-9.
- POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. *Worldwide prospects for commercial production of Tilapia*. Alabama: International Center for Aquaculture, 1996.
- POULIN, R. The evolution of Monogenean diversity. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 32, n. 3, p. 245-254, Mar. 2002.
- PRICHARD, R. Molecular biology in parasitology. *Veterinary Parasitology*, Michigan, v. 71, n. 2/3, p. 155-175, Jul. 1997.
- PRIOLI, S. M. A. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguacu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- ROLLINSON, D.; STOTHARD, J. R. Identification of pests and pathogens by random amplification of polymorphic DNA (RAPDs) In: HAWKSWORTH, D. L. *Identification and characterization of pests organisms*. Wallingford: CAB International, 1994. p. 447-459.
- ROLLINSON, D. *et al.* Some Molecular Insights into Schistosome Evolution. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 27, n. 1, p. 11-28, Jan. 1997.
- STEVENS, J.; WALL, R. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia caprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 25, n. 2, p. 81-97, 1997.
- SICARD, M.; DESMARAIS, E.; LAMBERT, A. Molecular characterisation of Diplozoidae populations on five Cyprinidae species: consequences for host specificity. *Life Sciences*, Paris, v. 324, n. 8, p. 709-717, Aug. 2001.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, Oct. 1997.
- STICKNEY, R. R. Status of research on tilapia In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. *Tilapia aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. p. 21-33.
- VALTONEN, E. T.; PROST, M.; RAHKONEN, R. Seasonality of two gill Monogeneans from two freshwater fish from an oligotrophic lake in northeast Finland. *Australian Society for Parasitology*, Queensland, v. 20, n. 1, p. 101-107, Feb. 1990.
- VARGAS, L. Patologia de peixes In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. *Fundamentos da moderna aqüicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p. 123-133.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.
- WHITTINGTON, I. D. Diversity "down under": monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. *International Journal for Parasitology*, Sydney, v. 28, n. 10, p. 1481-1493, Oct. 1998.
- WILLIAMS, J. G. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535. Nov. 1990.
- YAN, J. *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) x common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 243, p. 49-60, 2005.
- YAMAGUTI, S. *Monogenea and Aspidocotylca, Systema Helminthum IV*. New York: Interscience Publishers, 1963.

Recebido para publicação em 20/03/2004
Received for publication on 20 March 2004
Recibido para publicación en 20/03/2004
Aceito para publicação em 30/08/2004
Accepted for publication on 30 August 2004
Acepto para publicación en 30/08/2004

PÓS-GRADUAÇÃO UNIPAR | 2006

CIÊNCIAS DA SAÚDE

Campus Umuarama

- Atualização em Cirurgia Bucal
- Atualização em Endodontia com Ênfase em Molares
- Atualização em Prótese Dental
- Especialização em Análises Clínicas
- Especialização em Fisioterapia Respiratória Âmbito Hospitalar
- Especialização em Manipulação de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos
- Especialização em Nutrição Clínica Durante o Ciclo Vital
- Especialização em Personal Training
- Especialização em Vigilância Sanitária e Epidemiologia em Saúde

Campus Toledo

- Especialização em Reabilitação Fisioterapêutica em Traumato-Ortopedia e Desportiva
- Especialização em Treinamento Desportivo
- Especialização em Nutrição Humana com Área de Concentração em Nutrição Clínica ou Alimentação Institucional

Campus Paranavaí

- Atualização em Terapia Manual e Postural
- Especialização em Manipulação de Fármacos e Cosméticos

Campus Cascavel

- Especialização em Enfermagem do Trabalho e Saúde Ocupacional

Campus Francisco Beltrão

- Especialização em Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar



QUEM PENSA FAZ.

www.unipar.br