

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE HELMINTOS DE *Paracentrotus lividus* (LAMARCK, 1816) (ECHINODERMATA: PARECHINIDAE) DO PORTO, PORTUGAL

**THAINÁ DUTRA VIEIRA¹; LUIS FILIPE RANGEL²; MARIA JOÃO SANTOS²;
GERTRUD MÜLLER ANTUNES³**

¹Universidade Federal de Pelotas – thainadutravieira@hotmail.com

²Universidade do Porto, Porto, Portugal – luisfiliperangel@sapo.pt; mjsantos@fc.up.pt

³Universidade Federal de Pelotas – gertrudmuller40@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Parechinidae) é a espécie de ouriço-do-mar mais abundante na região do Porto, Portugal. Tem uma ampla distribuição no Mar Mediterrâneo e ao longo da costa nordeste atlântica, desde a Escócia e Irlanda até ao sul de Marrocos, incluindo os arquipélagos da Macaronésia (BOUDOURESQUE; VERLAQUE, 2007).

É tipicamente subtidal, distribuindo-se em poças intertidais de até 10-20m de profundidade, sendo encontrada geralmente em substratos rochosos horizontais e alimentando-se preferencialmente de algas folhosas moles e partículas orgânicas em suspensão (GIANGUZZA et al., 2006).

As gônadas de *P. lividus* são muito apreciadas como marisco, constituindo um produto gourmet comparável ao caviar, e por isso este ouriço-do-mar tem sido intensamente capturado. Seu consumo é principalmente limitado à França e Espanha e, em menor grau, a Itália e Grécia. (BOUDOURESQUE; VERLAQUE, 2007).

Em Portugal, a espécie é altamente abundante e as capturas atingem quase 3 toneladas ao ano, principalmente colhidas na região Norte. No entanto, estudos recentes sugerem que a colheita comercial pode ter um impacto sobre as populações selvagens desta espécie com possíveis implicações para sua conservação e para o manejo da pescaria local associada (BERTOCCI et al., 2014), sendo a aquicultura uma solução potencial para preencher a lacuna entre a crescente demanda e a queda do abastecimento.

O consumo de frutos do mar tem muitas vantagens em termos de saúde humana, porém esses produtos podem representar alguns riscos para os consumidores se a segurança deles como alimento não for assegurada. A presença de parasitos pode causar danos extensivos em organismos aquáticos, tornando-os frequentemente não adequados como alimentos. Assim, para garantir a qualidade dos frutos do mar, essas questões devem ser abordadas e vinculadas às condições de produção.

Com relação aos helmintos parasitos de *P. lividus*, registrou-se até o momento apenas metacercárias de *Zoogonus rubellus* (= *Zoogonus mirus*) (Olsson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) (TIMON-DAVID, 1934; JANGOUX, 1987) e metacercárias de Opecoelidae sp. (Digenea: Opecoelidae) (JOUSSON et al., 1999). Estudos de busca e investigação dos possíveis parasitos que acometem a espécie tornam-se necessários frente ao frequente consumo das gônadas cruas do ouriços-do-mar, sendo que esses animais podem servir como hospedeiros para parasitos com potencial zoonótico.

Dessa forma o presente estudo objetivou identificar morfológica e molecularmente os helmintos presentes em *P. lividus* do Porto, Portugal, bem

como estimar os parâmetros ecológicos de prevalência (P), intensidade média (IM) ± (range/mínimo e máximo) de infecção no hospedeiro.

2. METODOLOGIA

Este trabalho é parte de um projeto desenvolvido pela primeira autora durante um período de mobilidade realizado na Universidade do Porto, Porto, Portugal através do Programa de Doutorado Sanduíche no exterior/PDSE/CAPES de novembro de 2018 à abril de 2019.

Trinta (n=30) espécimes de *P. lividus* foram coletados manualmente da zona intertidal, durante a maré baixa nas praias da Foz do Porto, Portugal, entre os meses de março e abril de 2019. Os espécimes foram transportados até o Laboratório de Patologia Animal, na Universidade do Porto, e mantidos vivos em condições ideais em um tanque aerado, até serem examinados.

Foram dissecados e examinados sob estereomicroscópio Leica KL 300 LED (ampliação de até 40X) para análise quanto à presença de helmintos. Todas as partes internas do corpo do ouriço-do-mar foram consideradas para análise, ou seja, gônadas, ampolas, lanterna de Aristóteles (músculos e faringe), esôfago, intestino, canal pélvico, seio axial e fluido perivisceral.

Os helmintos encontrados foram lavados em placa de Petri contendo solução salina a 35% e, posteriormente, armazenados em etanol a 99% para futuras análises morfológicas e moleculares. Os parâmetros ecológicos de prevalência e intensidade média de infecção foram calculados de acordo com BUSH et al. (1997). Para a identificação específica, os helmintos foram submetidos à microscopia de luz para visualização morfológica e à análise molecular.

O DNA genômico dos parasitos foi extraído usando o kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit - Sigma-Aldrich (GN1N10- 1KT) seguindo as instruções do fabricante. As regiões 18S e ITS do DNA rRNA foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers 18e 5'CTGGTTGATCCTGCCAGT3' (HILLIS; DIXON, 1991)/18r 5'CTACGGAAACCTTGTACG3' (WHIPPS et al., 2003) e S18 5'TAACAGGTCTGTGATGCC3'/L3T 5'CAACTTCCCTCACGGTACTTG3' (JOUSSON et al., 1999) respectivamente.

A PCR foi realizada em um volume de reação de 25 µl, utilizando 2 µl (n/a) de DNA, 0,5 µl de cada primer (forward e reverse)(10pmol/ µl), 2,5 µl de solução tampão MgCl₂ (10X), 1,25 µl MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPmix (10mM), 0,25 µl de Taq DNA polimerase recombinante (5U/ µl) e 17,5 µl de água ultrapura para completar o volume final de 25 µl. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, 35 ciclos – desnaturação 95°C por 1 min, anelamento 55°C por 1 min, extensão 72°C por 2 min, seguido uma extensão final de 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, corados com GreenSafe Premium (NZYTech) e os amplicons purificados e sequenciados por STAB VIDA (Caparica, Portugal).

A identificação preliminar das sequências obtidas foi feita por comparação com as disponíveis na base de dados do GenBank através de pesquisa por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) (ZANG et al., 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas duas espécies de metacercárias encistadas nas ampolas ambulacrárias, músculos da lanterna de Aristóteles e gônadas de *P. lividus*.

As metacercárias apresentavam morfotipos e tamanhos diferentes, e foram identificadas com base na morfologia e confirmadas geneticamente como sendo *Zoogonus rubellus* (Olsson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) e *Macvicaria crassigula* (Linton, 1910) (Digenea: Opecoelida).

Z. rubellus apresentou $P=86,66\%$, e $IM=11,03 \pm 13,08$ (1-45) parasitos por hospedeiro, e *M. crassigula* $P=96,66\%$ e $IM=949,48 \pm 602,61$ (1-2210) parasitos por hospedeiro.

A prevalência das diferentes espécies de metacercárias variou também com relação aos sítios de infecção. *Z. rubellus* foi encontrado nos músculos da lanterna de Aristóteles com $P=70\%$, e $IM=5,57 \pm 6,36$ (1-30) parasitos por hospedeiro e nas gônadas $P=66,66\%$, e $IM=8,5 \pm 9,57$ (1-40) parasitos por hospedeiro. Enquanto que *M. crassigula* foi encontrada nas ampolas $P=93,33\%$, e $IM= 976 \pm 595,01$ (6-2131) parasitos por hospedeiro, nos músculos da lanterna de Aristóteles $P=46,66\%$, e $IM=2,42 \pm 1,77$ (1-6) parasitos por hospedeiro e nas gônadas $P=56,66\%$, e $IM=10,7 \pm 13,70$ (1-73) parasitos por hospedeiro.

Para *M. crassigula* foi obtida uma sequência de 1915bp da região 18S e uma sequência com 1147pb da região ITS DNAr. Ao realizar a pesquisa por BLAST verificou-se similaridade de 99,5% com *M. crassigula* (MF166837) para a região ITS e uma semelhança de 98,9% com a sequência de *Propycnadenoides philippinensis* Fischthal & Kuntz 1964 (Digenea: Opecolidae) (KU320591) para a região 18S DNAr.

Com relação a *Z. rubellus* foi obtida uma sequência de 1910bp da região 18S DNAr e uma sequência com 1282pb da região ITS DNAr. Segundo o BLAST há uma semelhança de 99,8% com *Z. rubellus* (AJ241804) para a região ITS e 92,9% com a sequência de *Zoogonoides viviparus* (Olson, 1868) (Digenea: Zoogonidae) (AY525634) para a região 18S DNAr.

A semelhança de *M. crassigula* e *Z. rubellus* com espécies diferentes, a partir da busca pela região 18S DNAr, verificada no BLAST pode ocorrer pelo fato de não haver sequências disponíveis dessa região para essas espécies no banco de dados do GenBank.

Estudos mais aprofundados sobre a caracterização molecular e análises filogenéticas das metacercárias encontradas estão em andamento, sendo que até o momento têm-se os dados morfológicos, os dados de parâmetros ecológicos e o resultado do BLAST.

4. CONCLUSÕES

Este é o primeiro registro de metacercárias presentes nas gônadas de *P. lividus*, bem como primeiro estudo a apresentar parâmetros ecológicos de infecção para o hospedeiro. As espécies encontradas não apresentam potencial zoonótico, infectando no estágio adulto peixes de diversas espécies.

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 (PDSE/Edital Nº 47 - 2017).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOCCI, I.; DOMINGUEZ, R.; MACHADO, I.; FREITAS, C.; GODINO, J.D.; SOUSA-PINTO, I.; GONÇALVES, M.; GASPAR, M.B. Multiple effects of

harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. **Fisheries Research**, v.150, p. 60-65, 2014.

BOUDOURESQUE, C. F; VERLAQUE, M. Ecology of *Paracentrotus lividus*. In LAWRENCE, J. M. **Edible Sea Urchins: Biology and Ecology**. Second Edition. Developments in Aquaculture and Fisheries Science,v.32, Elsevier, 2007. p. 243-285.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al revisited. **Journal of Parasitology**, v.83, p. 575–583, 1997.

GIANGUZZA, P.; CHIANTORE, M.; BONAVIRI, C.; CATTANEO-VIETTI, R.; VIELMINI, I.; RIGGIO, S. The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). **Fisheries Research**, v.81, p. 37-44, 2006.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, p. 411–453, 1991.

JANGOUX, M. Diseases of Echinodermata. II. Agents metazoans (Mesozoa to Bryozoa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.2, n.2, p. 205–234, 1987.

TIMON-DAVID, J. Recherches sur les Trématodes parasites des oursins en Méditerranée. **Bulletin de l'Institut Océanographique**, 652, 1–16, 1934.

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

WHIPPS, C. M.; ADLARD, R. D.; BRYANT, M. S.; LESTER, R. J. G.; FINDLAV, V.; KENT, M. L. First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilichnus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 215–219, 2003.