

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR DO MICROSPORÍDIO *MICROGEMMA CAROLINUS*, PARASITA DO PEIXE *TRACHINOTUS CORALINUS* (CARANGIDAE) DO SUDESTE DO BRASIL

Graça Casal^{1,2,3}, Patrícia Garcia⁴, Edilson Matos⁵ e Carlos Azevedo^{1,2}

¹Dep. de Biol. Celular, Inst. Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Univ. Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal; ²Lab. de Patologia, Centro Investigação Marinha e Ambiental, Univ. Porto (CIIMAR/UP), Porto, Portugal; ³Dept. de Ciências, Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte, Gandra, Portugal; ⁴Lab. de Patologia de Sanidade de Animais Aquáticos, Univ. Federal Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil; ⁵Lab. Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

Introdução:

Estudos de microsporídios na ictiofauna Brasileira são escassos, comparativamente a outras áreas geográficas. Nos últimos anos foram descritos 2 novos gêneros e espécies *Amazonospora hassar* (Azevedo & Matos, 2003) e *Potaspora morhaphis* (Casal et al. 2008) e 4 novas espécies: *Loma myrophis* (Azevedo & Matos 2002), *L. psittaca* (Casal et al. 2009), *Spraguea gastrophysus* (Casal et al. 2012) e *Microsporidium brevirostris* (Azevedo & Matos 2004).

Materiais e Métodos:

Alguns exemplares da espécie *Trachinotus coralinus* (Teleostei, Carangidae) (nome comum: Pampo) foram coletados na costa Atlântica na praia da Barra da Lagoa, Ilha de Florianópolis (22° 50' S / 42° 03' W), Estado de Santa Catarina, Brasil. Fragmentos de fígado parasitado foram processados para microscopia eletrônica de transmissão, enquanto que os esporos isolados foram observados através do microscópio óptico de contraste interferência diferencial (Nomarski). Paralelamente, algumas amostras foram processadas para Biologia Molecular. O gene da SSU rRNA foi amplificado com o par de primers V1F/1492r, clonado através do pGEM-T Easy Vector System II (Promega) e, por fim, sequenciadas ambas as cadeias. As sequências obtidas foram alinhadas através do "software" MEGA 5 com o programa Clustal W. Análises moleculares evolutivas e filogenéticas foram efetuadas para o modelo Kimura-2 parâmetros, sendo a árvore construída para o máximo parcimônio (MP), máxima verosimilhança (ML) e para o método de distância Neighbor Joining (NJ).

Resultados:

Este parasita desenvolve-se em contacto com o parênquima hepático formando xenomas esbranquiçados contendo numerosos esporos e diferentes estados de desenvolvimento (Fig. 1), bem como um núcleo hipertrófico ramificado da célula hospedeira (Fig. 3). Plasmódios merogoniais e esporogoniais são observados sempre em contacto directo com o citoplasma da célula hospedeira (Figs. 3 - 5). Os esporos maduros uninucleados de forma elipsoidal medem ~ 3,8 x 2,4 µm (Fig. 2). A parede dos esporos com ~ 85 nm é formada por 2 camadas de material: uma camada electronodensa (exosporo) com ~ 30 nm e uma mais interna electronolúcida (endosporo) com ~ 55 nm de espessura (Fig. 6). Internamente, pode observar-se o núcleo, o polaroplasto, o filamento polar isofilar que se enrola em torno do vacúolo posterior em 8 a 9 voltas dispostas, por vezes, em duas fiadas (Fig. 6). O vacúolo posterior ocupa cerca 1/3 do comprimento do esporo (Fig. 2).

Discussão:

Os dados ultraestruturais obtidos do xenoma e dos diferentes estádios de desenvolvimento do parasita, bem como os dados moleculares e filogenéticos (Fig. 7) sugerem que se trata de uma espécie nova do género *Microgemma* (Ralphs & Mathews, 1986) (família Tetramicridae), tendo sido classificada como *Microgemma carolinus* (artigo aceite recentemente para publicação).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Azevedo, C. & Matos, E. (2002) *Eur. J. Protistol.* 37: 445-452.
Azevedo, C. & Matos, E. (2003) *J. Parasitol.* 89: 336-341.
Casal, G., Clemente, S.C.S., Matos, P., Knoff, M., Matos, E. & Azevedo, C. (2012) *Parasitol. Res.* (In press)
Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M.L. & Azevedo, C. (2008) *Parasitology* 135: 1053-1064.
Casal G., Matos, E., Teles-Grilo, M.L. & Azevedo, C. (2009) *Parasitol. Res.* 105: 1261-1271.
Casal G., Matos, E., Teles-Grilo, M.L. & Azevedo, C. (2010) *J. Parasitol.* 96: 1155-1163.
Matos, E. & Azevedo, C. (2004) *Acta Protozool.* 43: 261-267.
Ralphs, J.R. & Mathews, R.A. (1986) *J. Fish Dis.* 9: 225-242.

Agradecimentos:

À Fundação Engº António de Almeida (Porto), CESPU (Gandra), CNPq e CAPES -Brasil.

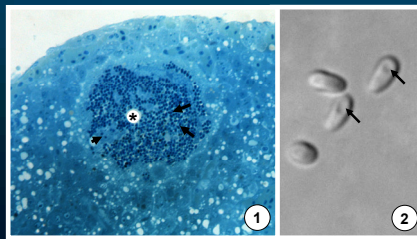


Fig. 1 - Corte semifino do fígado podendo observar-se um xenoma (*) contendo estados de desenvolvimento iniciais (cabeça de seta) e esporos (setas) (x 670). Fig. 2 - Esporos isolados observados em DIC: Vacúolo posterior (setas) (x 5.800).

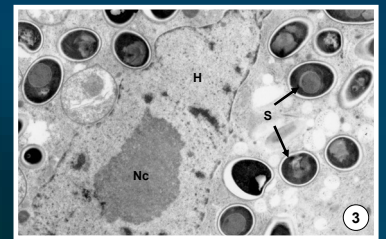


Fig. 3 - Aspecto ultraestrutural do núcleo hipertrófico de uma célula hospedeira (H) contendo um nucléolo (Nc) bem visível. Vários esporos maduros (S) rodeiam o núcleo (x 13.200).

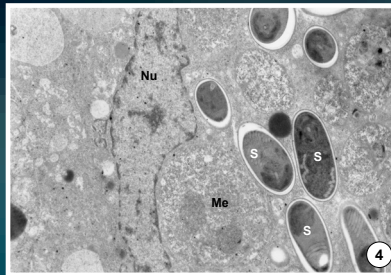


Fig. 4 - Corte ultrafino mostrando algumas fases do ciclo de vida, incluindo um meronte binucleado (ME), esporos maduros (S), bem como o núcleo da célula hospedeira (Nu) muito alongado com cromatina dispersa (x 16.700).

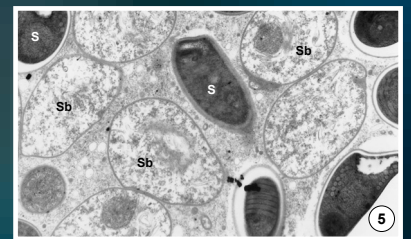


Fig. 5 - Pormenor ultraestrutural de esporoblastos (Sb) e de esporos maduros (S) (x 24.200).

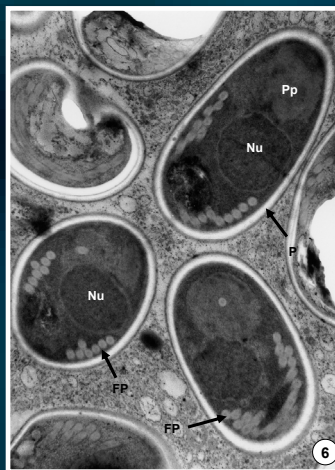


Fig. 6 - Corte ultrafino de esporos maduros mostrando as diferentes estruturas e organelos: parede (P), núcleo (Nu), filamento polar (FP), polaroplasto (Pp) (x 50.000).

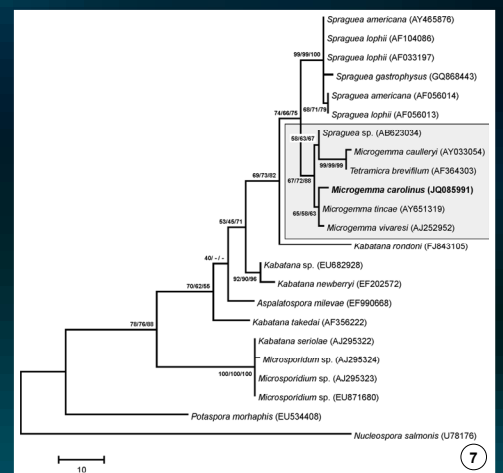


Fig. 7 - Árvore filogenética de consenso para o máximo parcimônio, do gene da SSU rRNA de *Microgemma carolinus* com algumas espécies de microsporídios afins. Os números nos ramos são os níveis de confiança, "bootstrap" em 100 repetições, para os métodos filogenéticos MP, ML e NJ respectivamente. A espécie *Nucleospora salmonis* (U78176) foi selecionada como "outgroup" para ser construída a árvore filogenética.