

Caracterização morfológica e molecular de uma espécie do género *Chloromyxum* (Myxozoa; Myxosporea) da vesícula biliar de *Raja clavata* (Chondrichthyes) da costa atlântica portuguesa

S. Rocha¹, G. Casal^{1, 2} e C. Azevedo^{1, 3}

¹ Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP)

² Laboratório de Ciências, Instituto Superior de Ciências da Saúde (ISCSN-CESPU)

³ Laboratório de Patologia, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/UP)

INTRODUÇÃO

A classe Myxosporea Bütschli, 1881 engloba organismos parasitários, alguns dos quais importantes agentes patogênicos de peixes com interesse socio-económico relevante. Filogeneticamente, os mixosporídios encontram-se agrupados em duas clades: de água marinha e de água doce. Estudos moleculares revelam ainda o estabelecimento de relações filogenéticas segundo o tropismo. Este trabalho descreve ultrastrutural e molecularmente uma espécie do género *Chloromyxum*, encontrada na vesícula biliar da raia lenga, *Raja clavata* Linnaeus, 1758 da costa atlântica portuguesa. Este género é caracterizado por esporos subsféricos constituídos por duas valvas e quatro cápsulas polares.

MATERIAL E MÉTODOS

Analisaram-se as vesículas biliares de 29 espécimes de *Raja clavata*. A bília infetada foi observada por contraste de interferência diferencial (DIC), e de seguida preparada para microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM). Amostras infetadas foram fixadas em glutaraldeído a 5% tamponado com cacodilato de sódio 0,2 M durante 24 h a 4 °C, lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão e à mesma temperatura. Seguiu-se a desidratação com etanol e óxido de propileno e a impregnação e inclusão em Epon. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranilo e citrato de chumbo e observados em TEM JEOL 100CXII operando a 60 kV. Para SEM, após a desidratação, as amostras foram secas até ao ponto crítico, revestidas por uma liga Au/Pd e observadas em JSM-6301F SEM operando a 15 kV. Para a sequenciação da pequena subunidade ribossomal, procedeu-se à extração do DNA da amostra fixada em etanol a 80% com o GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit e à amplificação com primers universais e específicos: 18e/MyxospecR para a extremidade 5', MyxospecF/ChloromyxR1 para a região central, e ChloromyxF1/18r para a extremidade 3'. Ambas as cadeias foram sequenciadas e, posteriormente, analisadas no software MEGA 5.

RESULTADOS

Não se observaram evidências macroscópicas de infeção. Em espécimes infetados, a vesícula biliar apresentava-se hipertrofica e continha bília acastanhada. A prevalência de infeção foi estimada em cerca de 48%. O DIC revelou a presença de esporos subsféricos com quatro cápsulas polares iguais situadas no pólo anterior e vários filamentos caudais aderentes ao pólo posterior. O SEM permitiu reconhecer o padrão superficial dos esporos, que apresentavam 6-8 cristas na zona posterior de cada uma das duas valvas constituintes. Observou-se também a organização dos filamentos caudais. O TEM evidenciou a assimetria das duas valvas unidas por uma linha de sutura proeminente (cabeças de seta). Observa-se o poro de extrusão (seta) de uma das cápsulas polares (CP), e o esporoplasma binucleado. Dentro das cápsula polares, o filamento polar formava um loop em torno da parede interna antes de enrolar do pólo anterior para o posterior em 7-8 voltas. Molecularmente, verificou-se maior similaridade filogenética a *C. leydigii* e *C. riorajum*.

DISCUSSÃO

A utilização combinada de diferentes técnicas microscópicas permite o reconhecimento de aspectos morfológicos específicos. O estudo comparativo dos dados ultrastruturais observados, em conjugação com a análise molecular da pequena subunidade ribossomal, indiciam esta como uma possível nova espécie do género *Chloromyxum*, família Chloromyxidae, ordem Bivalvulida, classe Myxosporea, filo Myxozoa. Filogeneticamente, *Chloromyxum* sp. forma uma clade com *C. leydigii* e *C. riorajum*, também coelozóicas em peixes marinhos, na base da clade de água doce. Desta forma constituindo uma exceção à divisão nas clades de água marinha e de água doce. Possivelmente por representarem um elo evolutivo entre estas clades. Por outro lado, os resultados apoiam a filogenia baseada no tropismo. *Chloromyxum* sp. é filogeneticamente mais próximo das restantes espécies coelozóicas do seu género e até mesmo de espécies coelozóicas de outros géneros, do que das espécies histozóicas do próprio género *Chloromyxum*.

REFERÊNCIAS

- Fiala I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal of Parasitology* 36: 1521-1534.
Fiala I. and Dyková I. (2004). The phylogeny of marine and freshwater species of the genus *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxosporea: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Folia Parasitologica* 51: 211-214.
Lom J. and Dyková I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53: 1-36.

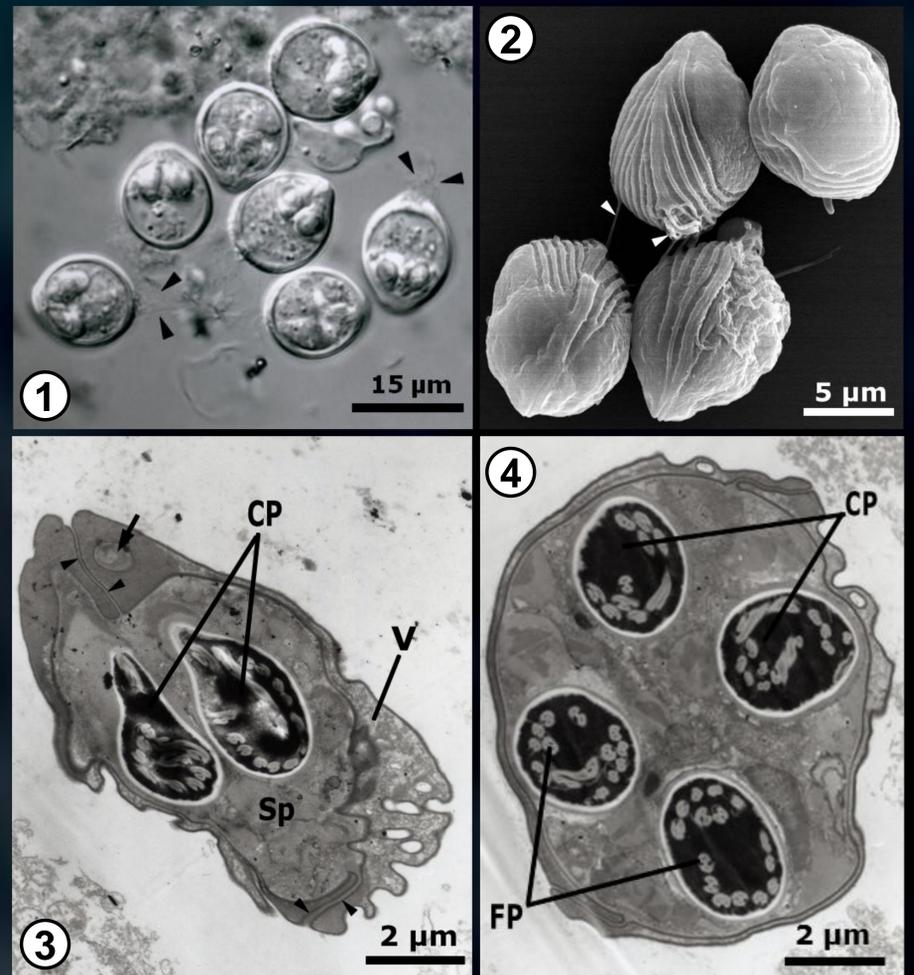


Fig. 1. Fotografia de DIC mostra a morfologia geral dos esporos, evidenciando a presença de filamentos caudais (cabeças de seta). Fig. 2. Microfotografia de SEM revela o padrão das cristas superficiais e filamentos caudais (cabeças de seta). Fig. 3. Corte longitudinal de um esporo em TEM revela duas valvas (V) unidas por uma linha de sutura proeminente (cabeças de seta). Observa-se o poro de extrusão (seta) de uma das cápsulas polares (CP), e o esporoplasma (Sp). Fig. 4. Corte transversal de um esporo em TEM, no qual se observam as quatro cápsulas polares (CP) e respectivos filamentos polares (FP).

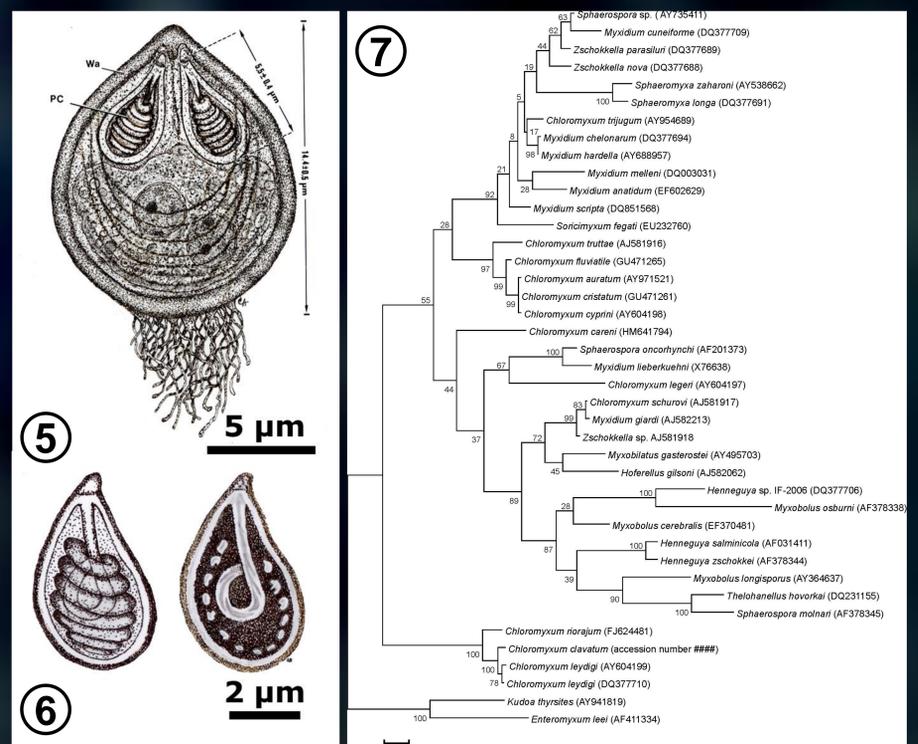


Fig. 5. Esquema geral de um esporo em corte longitudinal. Fig. 6. Esquema ilustrativo da organização dos filamentos polares. Fig. 7. Árvore filogenética de máxima parcimônia para o gene da SSU rDNA de *Chloromyxum* sp. e outras espécies selecionadas de mixosporídios. Os números nos ramos são os níveis de confiança, "bootstrap" em 100 replicações.