



**ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE EGAS MONIZ**  
**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE**

---

**ESTUDOS HISTOQUÍMICOS E GENÉTICOS**

**SOBRE A MEDUSA *CATOSTYLUS TAGI*:**

- (I) CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE  
COMPONENTES ESTRUTURAIS DOS NEMATOCISTOS**
- (II) COMPARAÇÃO DAS REGIÕES 18S, 28S E ITS1 DO rDNA DE  
EXEMPLARES DO TEJO E SADO**

Trabalho submetido por

**Tiago da Cunha Tomé Parracho**

Para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Novembro 2013



**ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE EGAS MONIZ**  
**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE**

---

**ESTUDOS HISTOQUÍMICOS E GENÉTICOS**  
**SOBRE A MEDUSA *CATOSTYLUS TAGI*:**

- (I) CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE  
COMPONENTES ESTRUTURAIS DOS NEMATOCISTOS**
- (II) COMPARAÇÃO DAS REGIÕES 18S, 28S E ITS1 DO RDNA DE  
EXEMPLARES DO TEJO E SADO**

Relatório de projecto de estágio elaborado no âmbito da obtenção do grau de  
Mestre em Biologia Molecular em Saúde  
(versão revista)

Tiago da Cunha Tomé Parracho  
Orientadora: Doutora Zilda Braga Morais

Membros do Júri  
Doutora Ana Clara Ribeiro, Presidente  
Doutora Evguenia Bekman, Arguente  
Doutora Catarina Bernardes, Vogal  
Doutora Veronique Sena, Vogal  
Doutora Zilda Morais, Vogal

Novembro 2013

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu saudoso pai que sempre me incentivou a prosseguir os meus estudos, ainda que hoje não possa assistir aos seus frutos.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta dissertação é o resultado do trabalho de muitas pessoas que colaboraram de variadas formas para o concretizar, muito obrigado a todos, inclusivamente aos integrantes do júri que contribuíram para a melhoria deste texto.

Destaco nominalmente,

A minha orientadora, Prof Zilda Morais, pelo apoio, estímulo e confiança na minha pessoa e no meu trabalho.

O Centro de Investigação da Cooperativa Egas Moniz, CiiEM, que financiou este trabalho.

Os professores e funcionários da Cooperativa Egas Moniz, que contribuíram para a minha formação desde a licenciatura, em especial a Prof Alexandra Maia e Silva e a Equipa de Apoio às Aulas Laboratoriais.

Os meus colegas de investigação, Rita Soeiro, Paulo Mascarenhas, Susana Bandarra, Joana Couceiro, Carlos Família e Ana Lages.

A Dr.<sup>a</sup> Fátima Gil, do Aquário Vasco da Gama, a Equipa do Albacora e os Bombeiros da Trafaria.

O Dr. Francisco Ruano, do laboratório de Histologia do IPIMAR,

A Eng<sup>a</sup> Isabel Nogueira, do laboratório de Microscopia Electrónica do IST.

A Dr.<sup>a</sup> Carla Clemente, da STAB Vida.

O Prof Michael Dawson, da Universidade da Califórnia – EUA.

Agradeço muito especialmente à minha mãe e família, pelo apoio incondicional.

## RESUMO

No presente trabalho, estudaram-se aspectos morfológicos, histoquímicos e moleculares da medusa *Catostylus tagi*.

As abordagens morfológica e histoquímica focalizaram-se nos nematocistos do animal. Através da análise por microscopia óptica e electrónica de varrimento, determinaram-se parâmetros em variedades de isorhizas e euryteles. Utilizando colorações histoquímicas constatou-se que as proteínas NOWA e “spinalin”, detectadas em Hydras, podem estar presentes na *C. tagi*, a primeira na membrana exterior da cápsula e a segunda integrando o mecanismo de ejeção. Ainda em relação às macromoléculas, verificou-se que a membrana da cápsula pode conter mucinas ácidas, com polissacáridos semelhantes à quitina, enquanto os componentes azotados, distribuídos no interior do nematocisto, assemelham-se a materiais colagénicos. Pela ausência de cobre, foi descartada a ocorrência de proteínas antioxidantes do tipo superóxido dismutase. Em relação ao cálcio, observou-se a sua presença na membrana envolvente dos nematocistos e no sistema contráctil, provavelmente complexado com as macromoléculas aniónicas.

A propósito das relações genéticas, compararam-se exemplares de *Catostylus* que ocorrem nos estuários do Tejo e do Sado, e estes com outras três medusas, nomeadamente *Catostylus mosaicus*, *Cyanea capillata* e *Aurelia aurita*, através das sequenciações parciais dos genes que codificam para os RNAs ribossomal 18S e 28S, além da sequenciação total do espaçador interno transcrito 1 (ITS1). A análise cladística, baseada no método da máxima verosimilhança, confirmou os resultados macroscópicos que indicam que os exemplares do Sado e Tejo pertencem à mesma espécie, denominada *C. tagi*. Na comparação da *C. tagi* com as outras medusas, comprovou-se a sua relação monofilética com a *C. mosaicus* e parafilética com a *C. capillata* e a *A. aurita*.

Os resultados deste estudo elucidaram, pela primeira vez, a tipologia e a composição química parcial dos nematocistos da *C. tagi*, e comprovaram que a recolha para análise pode ser feita indistintamente no Sado ou no Tejo.

**Palavras-chave:** morfologia de nematocistos, histoquímica de nematocistos, sequenciação ribossomal da *C. tagi*.

## ABSTRACT

In this work, the morphology, histochemistry and genetic aspects of the Portuguese jellyfish *Catostylus tagi* from both Tagus and Sado estuaries were studied.

Morphological and histochemical approaches were focused on the nematocysts. Through optical and scanning electron microscopy, isorhizas and euryteles were detected and characterized.

By histochemical staining, it was found that the proteins NOWA and spinalin, detected in Hydra, may also be present in *C. tagi*, the first integrating the capsule outer membrane, the second belonging to the ejection mechanism. Still in relation to macromolecules, it was found that the capsule outer membrane may contain acidic mucins, with chitin-like polysaccharides, as nitrogen components distributed within the nematocyst resemble collagenous materials.

No copper was detected in the nematocyst. On the other hand, calcium was detected: its position suggests interactions to the polysaccharides membrane, to the proteins of the contractile system or to both.

Regarding the genetic relationships, *Catostylus* specimens occurring in the Tagus and Sado were compared, and these with three other jellyfish, namely *Catostylus mosaicus*, *Aurelia aurita* and *Cyanea capillata*, through partial sequencing of the genes coding for RNAs ribosomal 18S and 28S, and total sequencing of internal transcribed spacer 1 (ITS1).

Cladistic analysis, based on the maximum likelihood method, confirmed the macroscopic indication that specimens of Tagus and Sado belong to the same species, called *C. tagi*. Comparing *C. tagi* with other jellyfish, its monophyletic relationship with *C. mosaicus* and paraphyletic with *C. capillata* and *A. aurita* were confirmed.

The results of this study have elucidated, for the first time, the typology and the partial chemical composition of *C. tagi* nematocysts. In addition, it was showed that *C. tagi* collection to analysis may be performed indistinctly in Sado or Tagus estuaries.

Keywords: morphology of nematocysts, nematocysts histochemistry, ribosomal sequencing of *C. tagi*.

## ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA -----	II
AGRADECIMENTOS -----	III
RESUMO -----	IV
ABSTRACT -----	V
ÍNDICE GERAL -----	VI
ÍNDICE DE FIGURAS -----	VIII
ÍNDICE DE TABELAS -----	XII
LISTA DE ACRÓNIMOS -----	XIII
GLOSSÁRIO -----	XIV

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.1 ÂMBITO E OBJECTIVOS .....	- 1 -
1.2 RESUMO DAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS SOBRE A <i>C. TAGI</i> .....	- 1 -
1.2.1 ORTOGRAFIA, TAXONOMIA E OCORRÊNCIA.....	- 1 -
1.2.2 CICLO DE VIDA E DADOS BIOMÉTRICOS.....	- 3 -
1.2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA GERAL DA <i>C. TAGI</i> .....	- 4 -
1.2.4 INTERACÇÃO ACIDENTAL DA <i>C. TAGI</i> COM SERES HUMANOS.....	- 6 -
1.3 RETROSPECTIVA RESUMIDA SOBRE OS NEMATOCISTOS .....	- 7 -
1.4 ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DOS NEMATOCISTOS DA <i>C. TAGI</i> .....	- 12 -
1.5 MÉTODOS HISTOQUÍMICOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO .....	- 14 -
1.5.1 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA .....	- 14 -
1.5.2 COLORAÇÃO DE ALCIAN BLUE E ALCIAN BLUE - PAS .....	- 15 -
1.5.3 COLORAÇÃO DE TRICRÓMIO DE MASSON.....	- 16 -
1.5.4 COLORAÇÃO DE VAN GIESON .....	- 17 -
1.5.5 COLORAÇÃO DE VON KOSSA.....	- 17 -
1.5.6 COLORAÇÃO ORCEÍNA-SHIKATA .....	- 17 -
1.6 RETROSPECTIVA RESUMIDA DOS CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO GENÉTICA .....	- 18 -
1.7 ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO GENÉTICO DA <i>C. TAGI</i> .....	- 21 -
2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	- 23 -
2.1 RECOLHA DOS EXEMPLARES, AMOSTRAGEM E ARMAZENAGEM.....	- 23 -
2.2 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO .....	- 24 -

2.3	ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA .....	- 24 -
2.4	PROCEDIMENTOS DE SEQUENCIAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO DNA .....	- 26 -
2.4.1	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA .....	- 26 -
2.4.2	EXTRACÇÃO DO DNA .....	- 27 -
2.4.3	ANÁLISE ELECTROFORÉTICA .....	- 29 -
2.4.4	AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	30
2.4.5	MÉTODO DE SEQUENCIAÇÃO DO DNA .....	33
2.4.6	COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS .....	33
2.4.7	MÉTODO DE CONSTRUÇÃO DOS CLADOGRAMAS .....	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
3.1	RESULTADOS DE MICROSCOPIA .....	35
3.1.1	MICROSCOPIA ÓPTICA .....	35
3.1.2	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO .....	38
3.2	RESULTADOS DAS COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS .....	39
3.2.1	COLORAÇÃO HEMATOXILINA – EOSINA .....	39
3.2.2	COLORAÇÃO ALCIAN BLUE E ALCIAN BLUE – PAS .....	40
3.2.3	COLORAÇÃO DE VON KOSSA .....	43
3.2.4	COLORAÇÃO TRICRÓMIO DE MASSON .....	44
3.2.5	COLORAÇÃO DE VAN GIESON .....	44
3.2.6	COLORAÇÃO ORCEINA-SHIKATA .....	45
3.2.7	RESUMO DOS RESULTADOS DAS COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS .....	46
3.3	RESULTADOS DO ESTUDO GENÉTICO .....	47
3.3.1	EXTRACÇÃO DO DNA .....	47
3.3.2	RESULTADOS PARA A REGIÃO 18S .....	47
3.3.3	RESULTADOS PARA A REGIÃO 28S .....	50
3.3.4	RESULTADOS PARA A REGIÃO ITS1 .....	52
3.3.5	RESUMO DOS RESULTADOS GENÉTICOS .....	55
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
5	BIBLIOGRAFIA .....	58
	ANEXO A PROCEDIMENTOS DE HISTOQUÍMICA .....	64
	ANEXO B - REGIÕES 18S; 28S E ITS1 DO rDNA DA C. TAGI DO TEJO E DO SADO: SEQUENCIAÇÕES PARCIAIS, ALINHAMENTOS E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CONTIG .....	70

## Índice de Figuras

### Todas as figuras sem indicação de autor são de Tiago Parracho

<b>Figura 1</b> – Principais regiões de ocorrência da <i>C. tagi</i> , em Portugal (mapa do Instituto Geográfico Português). -----	2
<b>Figura 2</b> - Esquema do ciclo de vida da medusa <i>C. mosaicus</i> (Adaptado de Pitt, 2000).----	3
<b>Figura 3</b> - <i>C. tagi</i> adulta (Saldanha, 1997). -----	4
<b>Figura 4</b> - Lesões provocadas na mão, perna e rosto de diferentes pessoas, pelo contacto acidental com a <i>C. tagi</i> (Fotografias de Z. Morais). -----	6
<b>Figura 5</b> . Esquema de um nematocisto (Saldanha,1997). -----	7
<b>Figura 6</b> . Representação esquemática da morfogénese dos nematocistos (adaptado de Beckmann e Ozbek, 2012). -----	8
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática dos principais passos da descarga de um nematocisto (Özbek et al, 2009). -----	9
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática de dois tipos de nematocistos. À esquerda, isorhiza; à direita, eurytele (Östman e Hyman, 1997). -----	9
<b>Figura 9</b> – Fotomicrografia em MO dos nematocistos da <i>C. mosaicus</i> (Peach & Pitt, 2005). A - Holotrichous isorhizae em forma de pêra; B - Holotrichous isorhizae em forma oval; C - Rhopaloids; D - Birhopaloids; (ca) - Parede da cápsula; (o) -Opérculo, (s) - Eixo central, (t) – Túbulo. Barra de escala, 1µm. -----	10
<b>Figura 10</b> – Fotomicrografia em MEV dos nematocistos da <i>C. mosaicus</i> (Peach & Pitt, 2005). A,B (i) Holotrichous Isorhizae; C-E (r) Rhopaloid; F-G (b) Birhopaloid; H tubos de vários tipos de nematocistos. Barra de escala A, F,H = 2 µm; B-E barra de escala = 1 µm. ---	11
<b>Figura 11</b> - À esquerda, selecção de diferentes nematocistos para a microdissecção a laser. À direita, eppendorf especial e sistema de recolha do material (Wiebring et al, 2010 a). ----	12
<b>Figura 12</b> - Esquema de preparação do corante hematoxilina e sua reacção com o DNA (Wako-chem, 2013). -----	14
<b>Figura 13</b> - Estrutura da eosina y. (Nº CAS 17372-87-1) -----	14
<b>Figura 14</b> – Estrutura do alcian-blue (Nº CAS 33864-99-2) -----	15
<b>Figura 15</b> – Coloração PAS, mecanismo de formação do produto corado -----	16
<b>Figura 16</b> – Tecido de ligação corado com Tricrómio de Masson (Caceci, 2008) -----	16

<b>Figura 17</b> - Estruturas dos corantes da coloração Van Gieson. À esquerda, ácido pícrico (Nº CAS 88-89-1); à direita, fúscina ácida (Nº CAS 3244-88-0) (Nielson & Moe, 1998). -----	17
<b>Figura 18</b> – À esquerda: esquema reaccional da precipitação do fosfato com a prata. À direita: corante vermelho neutro, usado como contraste (Nº CAS 553-24-2)	17
<b>Figura 19</b> - Oxidação da cisteína com permanganato ácido. -----	18
<b>Figura 20</b> - $\alpha$ - aminoorceína (Nº CAS 1400-62-0). -----	18
<b>Figura 21</b> - Diagrama da organização do rDNA <i>Aurelia</i> sp.1 (Ki <i>et al.</i> , 2008) -----	20
<b>Figura 22</b> – À esquerda, captura da <i>C. tagi</i> no estuário do Tejo. À direita, acondicionamento da <i>C. tagi</i> após a captura. -----	24
<b>Figura 23-</b> À esquerda, um exemplar de <i>C. tagi</i> na bancada do laboratório. À direita, umbrela da <i>C. tagi</i> para remoção das gónadas. -----	24
<b>Figura 24</b> - Preparação das lâminas para observação microscópica. À esquerda: 1- amostra no bloco de parafina em molde de Leuckart, 2- lâmina com o corte da amostra corada com H&E. À direita: 1- amostra armazenada em tubo falcon, 2- lâmina auxiliar de esfregaço, 3- lâmina com o esfregaço da amostra, 4- lâmina com amostra corada pelo método de Van Gieson.	25
<b>Figura 25</b> – Preparação da amostra para extracção do DNA. A: diálise com agitação; B: diálise, vista de cima; C: amostra no liofilizador; D: detalhe da amostra liofilizada. -----	27
<b>Figura 26</b> – Gel padrão para ilustração de DNA genómico não degradado. M-marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder (Zymo, 2013). -----	29
<b>Figura 27</b> - Marcadores padrão de DNA. À esquerda, GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb. À direita, GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb. -----	29
<b>Figura 28</b> – Sequenciador de DNA modelo 3730xl, Applied Biosystems.-----	33
<b>Figura 29-</b> Fotomicrografias em MO de nematocistos da <i>C. tagi</i> , sem coloração. Ampliação 1000x. (A) isorhizas. (B) euryteles. -----	35
<b>Figura 30</b> – Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> , despoletados. Ampliação 1000x. (A) isorhiza redondo e túbulo atrichous. (B) eurytele com túbulo curto e secção alargada: birhopaloid, seta branca. (C) e (D) possível isorhiza e isorhiza homotrichous (espinhos do mesmo tipo) com túbulo longo. As setas destacam os “espinhos”.	36
<b>Figura 31</b> – Fotomicrografias em MO, com régua, de nematocistos da <i>C. tagi</i> sem coloração. Ampliação 1000x. (A) isorhiza, (B) euryteles. -----	38
<b>Figura 32</b> – Fotomicrografias em MEV, nematocistos fechados da <i>C. tagi</i> . Cortesia de I. Nogueira, IST/UTL. -----	38
<b>Figura 33</b> – Fotomicrografias em MEV, A, B, C, nematocistos despoletados da <i>C. tagi</i> . Cortesia de I. Nogueira IST/UTL. -----	39

<b>Figura 34</b> – Fotomicrografia em MO, braço da <i>C. tagi</i> corado com hematoxilina-eosina. Ampliação 1000x. 1-núcleo celular, 2- nematocisto em formação, 3- citoplasma. -----	39
<b>Figura 35</b> - Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com hematoxilina – eosina. Ampliação 1000x. A, B, C, D, G – euryteles; C, E, F – isorhizas; 1- eixo central; 2- túbulo enrolado; 3-opérculo; 4-estruturas circulares. -----	40
<b>Figura 36</b> – Fotomicrografias em MO, coloração alcian blue, testes iniciais. (A) padrão positivo, saliva humana. (B) padrão negativo, insulina. -----	40
<b>Figura 37</b> – Fotomicrografias em MO, euryteles e isorhizas da <i>C.tagi</i> corados com alcian-blue. Ampliação 1000x. 1- membrana basófila. -----	41
<b>Figura 38</b> – Fotomicrografias em MO, testes iniciais com alcian blue – PAS. (A) padrão positivo, saliva humana. (B) padrão negativo, insulina. -----	42
<b>Figura 39</b> – Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com alcian blue-PAS. Ampliação 1000x.-----	42
<b>Figura 40</b> - Fotomicrografias em MO, ensaio de Von Kossa. (A) padrão positivo, caseína. (B) padrão negativo, insulina. -----	43
<b>Figura 41</b> - Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com Von kossa. Ampliação 1000x. 1- deposição dos sais de cálcio no contorno do nematocisto. -----	43
<b>Figura 42</b> – Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com tricrómio de Masson. Ampliação 1000x. (A), (B), (C), (D), (E): euryteles; (F): isorhiza; 1- material colagénico; 2- eixo central liso; 3- túbulo enrolado preenchendo todo o interior; 4- eixo central com formação em oito; 5- eixo central com pequenos filamentos laterais. -----	44
<b>Figura 43</b> – Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com reagente de Van Gieson. Ampliação 1000x. -----	45
<b>Figura 44</b> – Fotomicrografias em MO, ensaio Orceína – Shikata. (A) padrão positivo, superóxido dismutase. (B) padrão negativo, insulina.-----	45
<b>Figura 45</b> – Fotomicrografias em MO, nematocistos da <i>C. tagi</i> corados com orceina-shikata. Ampliação 1000x. -----	46
<b>Figura 46</b> – Extracção do DNA da <i>C. tagi</i> ; 1- GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 2- Amostra <i>C. tagi</i> Tejo. -----	47
<b>Figura 47</b> - Produtos de PCR da região 18S do rDNA da <i>C. tagi</i> . Geis de agarose a 1%. Gel 1: M- Marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb; 5 e 6- <i>C. tagi</i> do Tejo. Gel 2: M- Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 4- <i>C. tagi</i> do Sado. -----	48
<b>Figura 48</b> – Cladograma das relações filogenéticas entre a <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente à região 18S do rDNA. -----	50

<b>Figura 49</b> – Produtos de PCR da região 28S do rDNA da <i>C. tagi</i> . Geis de agarose a 1%. Gel 1: M- Marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb; 3, 4, 7 e 8 – <i>C. tagi</i> do Tejo. Gel 2: M- Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 3- <i>C. tagi</i> do Sado. -----	50
<b>Figura 50</b> – Cladograma das relações filogenéticas entre a <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente à 28 rDNA. -----	52
<b>Figura 51</b> - Produto de PCR da região ITS1 de amostras do Tejo, 1ª tentativa. Gel de agarose a 0,8% em TAE 1X. 1- Marcador 1kb DNA Ladder; 2 e 3- <i>C. tagi</i> Tejo, 1º ensaio; 4 e 5- <i>C. tagi</i> Tejo, 2º ensaio. -----	53
<b>Figura 52</b> - Produto de PCR da região ITS1 de amostras do Tejo e Sado. Géis de agarose. Gel 1: 1- Marcador 1kb DNA Ladder; 2- Reamplificação do poço 3 da Fig 51; 3- Reamplificação do poço 5 da Fig 51. Gel 2: M- Marcador 1kb DNA Ladder; 1- <i>C. tagi</i> do Sado. -----	53
<b>Figura 53</b> – Cladograma das relações filogenéticas entre a <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente à ITS1 rDNA. -----	55

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Ocorrência mundial das oito espécies do género <i>Catostylus</i> (Kramp, 1961) -----	2
<b>Tabela 2</b> - Composição geral da <i>C. tagi</i> (Morais <i>et al.</i> , 2009) -----	5
<b>Tabela 3</b> - Vantagens e desvantagens de cada região genética para análise metagenética (Machida <i>et al.</i> , 2012).-----	19
<b>Tabela 4</b> - Comprimento de cada rDNA da <i>Aurelia</i> sp.1 e comprimento total do genoma ribossomal (Ki <i>et al.</i> , 2008). -----	20
<b>Tabela 5</b> - Padrões positivos e negativos das colorações efectuadas -----	26
<b>Tabela 6</b> - Iniciadores utilizados na sequenciação dos fragmentos do DNA da <i>C. tagi</i> .-----	30
<b>Tabela 7</b> - Programa de PCR (Dawson, 2005). -----	32
<b>Tabela 8</b> - Programa de PCR otimizado. -----	32
<b>Tabela 9</b> - Resumo dos resultados das colorações histoquímicas dos nematocistos. -----	46
<b>Tabela 10</b> - Número de bases da <i>C. tagi</i> sequenciadas para a região 18S; alinhamento entre as <i>C. tagi</i> do Tejo e do Sado; alinhamento da sequência de consenso com a <i>C. mosaicus</i> . ----	49
<b>Tabela 11</b> – Distâncias entre <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente a 18S rDNA. ----	50
<b>Tabela 12</b> - Número de bases da <i>C. tagi</i> sequenciadas para a região 28S; alinhamento entre as <i>C. tagi</i> do Tejo e do Sado; alinhamento da sequência de consenso com a <i>C. mosaicus</i> . ----	51
<b>Tabela 13</b> - Distâncias entre <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente a 28S rDNA. -----	52
<b>Tabela 14</b> – Número de bases da <i>C. tagi</i> sequenciadas para a região ITS1; alinhamento entre as <i>C. tagi</i> do Tejo e do Sado; alinhamento da sequência de consenso com a <i>C. mosaicus</i> . ----	54
<b>Tabela 15</b> – Distâncias entre <i>C. tagi</i> e outras Scyphozoa relativamente a ITS1. -----	55
<b>Tabela 16</b> – Similaridade entre as <i>C. tagi</i> do Tejo e do Sado, e da sequência de consenso com a <i>C. mosaicus</i> , nas regiões estudadas. -----	56
<b>Tabela 17</b> - Distâncias entre as <i>C. tagi</i> do Tejo & Sado e outras medusas. -----	56

## LISTA DE ACRÓNIMOS

- ASTM - American Society for Testing and Materials
- A-T- Adenina-Timina
- ATPase - Classe de enzimas que catalizam a decomposição do trifosfato de adenosina
- COI - Citocromo C oxidase I
- CTAB - Brometo de cetil-trimetilamónio
- DNA - Àcido desoxirribonucleico
- FTA<sup>®</sup> - Fast Technology for Analysis of Nucleic Acids, Whatman<sup>™</sup>
- G-C - Guanina-Citosina
- H&E - Hematoxilina e Eosina
- ITS1 - Espaçador interno transcrito 1
- MET - Microscopia Electrónica de Transmissão
- MEV - Microscopia Electrónica de Varrimento
- mtCOI - Citocromo c oxidase I mitocondrial
- mtDNA - Àcido desoxirribonucleico mitocondrial
- NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida
- N° CAS - Número de registo no Chemical Abstracts Service (abreviatura adoptada pela Agência Portuguesa do Ambiente)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information
- NOWA - Nematocyst Outer Wall Antigen
- PAS - Ácido periódico de Schiff
- Phred - Programa informático de cálculo da qualidade de uma sequência de DNA, obtida num sequenciador automático
- PMA - Ácido fosfomolibdico
- p/v - Peso de soluto em volume de solução
- Q > 20 - Índice de qualidade de uma sequência de DNA, calculado pelo programa Phred. Q > 20 indica 99% de probabilidade de acerto na identificação da base
- RNA - Ácido ribonucleico
- rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal
- TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA
- Tampão PBS - Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline. A solução PBS 1X é isotónica (contém NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM) e possui pH = 7,4.

## **GLOSSÁRIO**

- Atrichous – sem espinhos
- Cubozoa – uma das classes do filo Cnidaria (Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Staurozoa)
- Eurytele – tipo de nematocisto com nítida visualização do eixo central
- Holotrichous – possui espinhos em toda a superfície
- Hydra – género da classe Hydrozoa
- Isorhiza - tipo de nematocisto em que visualizam-se saliências (pontos) laterais equidistantes
- Nematocisto ou cnidocisto ou cnida – vesícula interior do nematócito produzido exclusivamente por cnidários como sistema de defesa e ataque
- Nematócito ou nematoblasto ou cnidoblasto ou cnidócito - célula urticante presente nos cnidários, principalmente nos braços e tentáculos
- Rhizostomae – ordem da classe Scyphozoa
- Rhopaloid (birhopaloid) – tipo de nematocisto cujo túbulo enrola-se em toda a cápsula não permitindo a visualização do interior
- Scyphozoa – uma das classes do filo Cnidaria
- Umbela ou umbrela - órgão da parte superior da medusa, em forma de campânula

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ÂMBITO E OBJECTIVOS

Este trabalho está inserido na linha de investigação “Utilização dos Recursos do Mar em Saúde”, do Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, CiiEM. Actualmente, o objecto de estudo é a medusa *Catostylus tagi* (Haeckel, 1869), de ocorrência natural na costa portuguesa, que apresenta um notável potencial de utilização, especialmente nas áreas de nutrição humana, nutrição animal e desenvolvimento de fármacos (Morais, 2006; Morais *et al*, 2009; Calejo *et al*, 2009; Morais e Raposo, 2012; Morais e Soeiro, 2012).

O objectivo geral do presente trabalho foi contribuir para o esclarecimento da química e da biologia da *C. tagi*, com vista à sua utilização sustentada. Neste sentido, pretendeu-se: (1) determinar a morfologia e caracterizar os principais componentes estruturais dos seus nematocistos e (2) comparar geneticamente os exemplares que ocorrem nos estuários dos rios Tejo e Sado, e estes com outras Scyphozoa de interesse. A estratégia adoptada está apresentada nos tópicos 1.4 e 1.7.

## 1.2 RESUMO DAS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS SOBRE A *C. TAGI*

### 1.2.1 GRAFIA, TAXONOMIA E OCORRÊNCIA

A grafia, a sistemática e a taxonomia dos seres vivos têm sido alteradas ao longo do tempo. No que respeita à *C. tagi*, o artigo “Synopsis of the Medusae of the World”, descreve-a na ordem RHIZOSTOMAE, família CATOSTYLIDAE, género *Catostylus* (Kramp, 1961). Por sua vez, no livro “Fauna submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira”, a *C. tagi* é referida como uma espécie pertencente ao filo Cnidaria (CNIDÁRIOS), classe SCHYPHOZOA (Cifozoários), ordem RHIZOSTOMAE (Saldanha, 1997).

Neste trabalho, adoptou-se escrever a sistemática e a taxonomia das espécies segundo a grafia simplificada indicada no Registo Europeu de Espécies Marinhas, ERMS, pertencente ao Marine Biodiversity and Ecosystem Functioning, MarBEF. Assim, a *Catostylus tagi* (Haeckel, 1869) classifica-se integralmente como Biota > Animalia > Cnidaria > Scyphozoa > Discomedusae > Rhizostomeae >

Daktyliophorae > Catostylidae > Catostylus, e apresenta o identificador único numérico, AphiaID: 135296 (MarBEF, 2004).

Quanto à ocorrência, o género *Catostylus* engloba oito espécies distribuídas em áreas bem definidas, com predominância em águas pouco frias (Kramp, 1961). Como pode ver-se na tabela 1, a *C. tagi* é a única representante do género *Catostylus* no continente europeu.

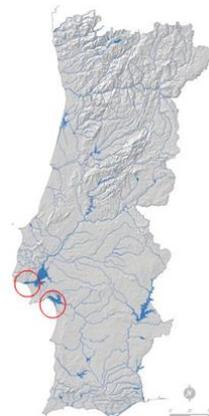
**Tabela 1** - Ocorrência mundial das oito espécies do género *Catostylus* (Kramp, 1961)

Espécie	Ocorrência	Descrita por	Oceano	Hemisfério
<i>C. cruciatus</i>	Ilha de Santa Catarina, Brasil	Lesson 1830	Atlântico	Sul
<i>C. mosaicus</i>	NSWales, Austrália, Filipinas, N. Guiné	Quoy e Gairmand 1824	Pacífico	Sul
<i>C. ornatellus</i>	Equador	Vanhoffen 1888	Pacífico	Sul
<i>C. perezi</i>	Arábia, golfo Iraniano	Ranson 1945	Índico	Norte
<i>C. tagi</i>	África Ocidental (Senegal, Cabo Verde, Congo), Portugal continental, baía de Biscaia, baía de Loire (costa atlântica francesa)	Haeckel 1869	Atlântico	Norte
<i>C. toiensendi</i>	Bornéu, Malásia, Indonésia	Mayer 1915	Índico/ Pacífico	Equador, Sul
<i>C. tripterus</i>	África Ocidental Fernando Pó (Malabo)	Heackel 1880	Atlântico	Equador
<i>C. viridescens</i>	África Oriental, Zanzibar, Zâmbia, rio Pangani	Chun 1896	Índico	Equador, Sul

Ao descrever a *C. tagi*, Saldanha (1997) referiu que a umbela pode atingir o diâmetro máximo de 50 cm e registou a sua ocorrência em Portugal como “muito comum”.

Os investigadores do CiiEM, ao longo dos últimos 8 anos, têm observado a ocorrência sazonal da *C. tagi*, em geral entre os meses de Julho e Outubro, e predominantemente nos estuários dos rios Tejo e Sado (Figura 1).

É de referir um frequente desfasamento temporal entre os avistamentos nestes estuários, o surgimento e o



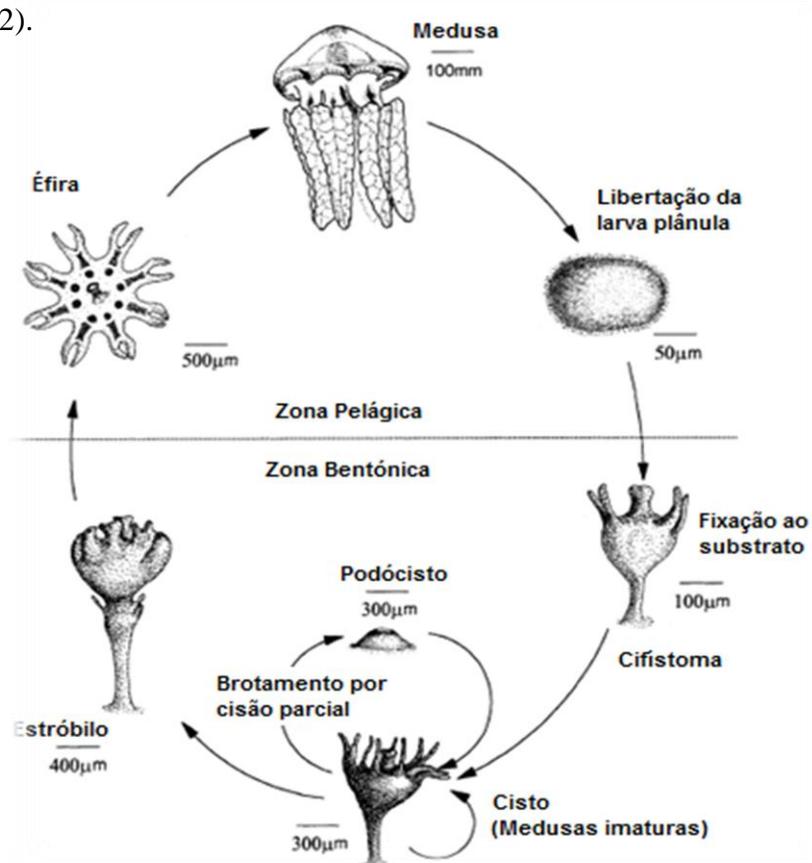
**Figura 1** - Principais regiões de ocorrência da *C. tagi* em Portugal (mapa do Instituto Geográfico Português).

desaparecimento dos grandes aglomerados, costuma ser mais precoce no Sado.

Relativamente às outras *Catostylus*, até o momento, a mais estudada tem sido a *C. mosaicus*, que ocorre em New South WALES- Austrália, Filipinas e N. Guiné (Pitt, 2000; Wiltshire *et al.*, 2000; Pitt & Kingsford, 2003; Dawson, 2005b; Peach & Pitt, 2005; Carr & Pitt, 2008; Pitt *et al.*, 2008; West *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2011).

### 1.2.2 CICLO DE VIDA E DADOS BIOMÉTRICOS

Ainda não existem dados sobre o ciclo de vida da *C. tagi*, contudo, é de supor que seja semelhante ao da *C. mosaicus*, o qual inclui os estádios de pólipo e de medusa (Figura 2).



**Figura 2** - Esquema do ciclo de vida da medusa *C. mosaicus* (Adaptado de Pitt, 2000).

A figura 3 mostra um exemplar adulto da *C. tagi*. Os dados biométricos da medusa adulta foram determinados com 30 exemplares seleccionados por um diâmetro de umbela na ordem dos 25 cm. Os resultados mostraram que a um diâmetro médio de  $22,9 \pm 1,2$  cm correspondeu uma massa média total de  $2424,7 \pm 642,4$  g, sendo  $1024,8 \pm 212,6$  g referentes à umbela. Relativamente aos braços, estes possuíam em média um comprimento de  $26,8 \pm 6,4$  cm (Morais *et al.*, 2009).



**Figura 3** - *C. tagi* adulta (Saldanha, 1997).

### **1.2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA GERAL DA *C. TAGI***

A *C. tagi* tem uma composição geral semelhante à de outras medusas edíveis. Os estudos realizados por Moraes *et al* (2009) mostraram que, em termos de peso seco, a umbela e os braços do animal são aproximadamente equivalentes, ou seja, cada uma das partes aproxima-se de 50% do peso seco total. No que respeita às proteínas e lípidos totais, os braços contêm aproximadamente 70% das proteínas e 75% dos lípidos. Tendo em conta os minerais, os elementos mais abundantes na *C. tagi* são o cloro, sódio, fósforo, magnésio, potássio, cálcio e enxofre. Não foram encontradas diferenças com significância estatística na composição dos minerais da umbela e dos braços (Tabela 2).

Para além destes componentes foi estudado o colagénio da umbela, correspondente aproximadamente a 33% das proteínas totais, o qual revelou-se similar aos tipos V/XI dos vertebrados, com três cadeias peptídicas diferentes em que duas têm uma massa molecular aproximada de 85 kDa e a terceira cerca de 100 kDa (Calejo *et al*, 2009). O referido polímero foi posteriormente estudado com vista à sua utilização em veiculação de fármacos (Calejo, 2009).

Comparativamente a outras medusas, a *C. tagi* apresenta uma composição total em proteínas inferior à descrita para a *Stomolophus nomurai*, uma medusa da ordem das Rhizostomae existente na Coreia (Kimura *et al.*, 1983). Por sua vez, o conteúdo de lípidos totais é semelhante ao apresentado pela medusa *A. aurita* do mar Egeu (Kariotoglou & Mastrinocolis, 2001).

**Tabela 2-** Composição geral da *C. tagi* (Morais *et al.*, 2009)

<b>Parâmetro</b>	<b>Umbela g/kg peso bruto</b>	<b>Braços g/kg peso bruto</b>
Peso seco	22,01±1,79	24,02±2,32
Proteínas	1,85±0,08	4,32±0,09
Lípidos totais	0,22±0,06	0,53±0,06
Minerais totais	18,85 ± 3,14	18,27 ± 2,83
<b>Macro minerais</b>	<b>g/kg peso seco</b>	<b>g/kg peso seco</b>
Cl	369,69 ± 7,39	330,08 ± 6,60
Na	196,68 ± 5,87	164,99 ± 7,67
P	59,55 ± 3,42	50,42 ± 2,97
Mg	32,87 ± 0,48	24,07 ± 2,39
K	16,56 ± 0,49	13,09 ± 1,78
Ca	10,26 ± 0,48	7,36 ± 0,83
S	10,05 ± 3,43	8,84 ± 1,61
<b>Micro minerais</b>	<b>mg/kg peso seco</b>	<b>mg/kg peso seco</b>
B	155,73 ± 15,92	123,30 ± 9,80
Zn	110,92 ± 2,72	226,73 ± 3,38
Fe	70,64 ± 8,48	59,12 ± 9,19
Si	49,04 ± 0,04	81,76 ± 1,27
Cu	5,64 ± 0,80	8,32 ± 0,96
Mn	8,32 ± 0,96	3,60 ± 0,44
Ni	1,88 ± 0,26	4,02 ± 1,56
Cr	1,08 ± 0,20	4,20 ± 0,08

Como se vê pela tabela 2, a composição química anteriormente estudada foi geral, isto é, analisou-se a medusa sem diferenciar os seus componentes, para além da umbela e dos braços.

Na continuação do trabalho, o projecto *C. tagi* da Cooperativa Egas Moniz pretende caracterizar quimicamente os diversos órgãos do animal. Neste sentido, seleccionaram-se em primeiro lugar os nematocistos, devido ao facto destes organelos serem os mais característicos dos cnidários. O estudo dos nematocistos da *C. tagi* foi iniciado com o presente trabalho.

#### 1.2.4 INTERACÇÃO ACIDENTAL DA *C. TAGI* COM SERES HUMANOS

A picada dos cnidários é um problema sério de saúde pública em zonas de ocorrência de medusas ou anémonas altamente venenosas como, por exemplo, em várias regiões do Pacífico, em especial na Austrália. Na região do Mediterrâneo, os perigos com as picadas de medusas são substancialmente menores, embora possam ter algum impacto do ponto de vista das actividades humanas de recreação, na altura do Verão, e também implicações ecológicas, sobretudo quando se verifica o fenómeno designado por “bloom”, ou seja, a ocorrência de grandes concentrações de medusa (Mariottini & Pane, 2010). Nos últimos anos, têm-se registado muitos “blooms” de medusa em várias regiões do planeta. É razoável supor que o aumento dos “blooms” esteja relacionado com as alterações climáticas, contudo, esta hipótese ainda não está provada (Richardson *et al.*, 2009).

O efeito da *C. tagi*, em contactos acidentais com seres humanos, é semelhante ao das medusas do Mediterrâneo, podendo causar irritações cutâneas, de graus variados, que se traduzem em rubor, prurido e edema, acompanhadas da sensação de queimadura. Os edemas, em geral, são arredondados, com cerca de 0,5 cm de diâmetro, e têm uma duração média de 40 min, com um pico máximo aos 20 min, (Figura 4).



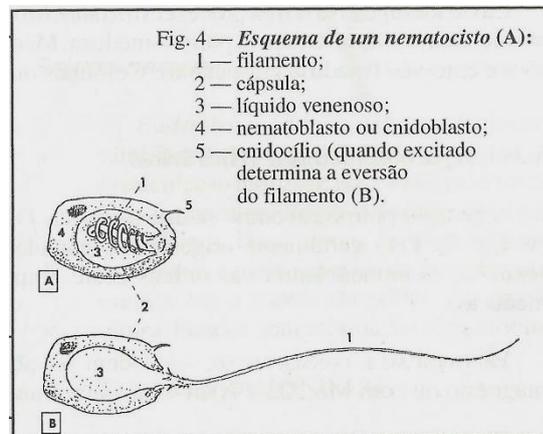
**Figura 4-** Lesões provocadas na mão, perna e rosto de diferentes pessoas, pelo contacto acidental com a *C. tagi* (Fotografias de Z. Morais).

Para além dos contactos acidentais, importa estudar aprofundadamente a acção das toxinas da *C. tagi* nos seres humanos com vista, por exemplo, à descoberta de novos agentes terapêuticos. Muitos animais produzem venenos que actuam sobre a transmissão dos impulsos nervosos (neurotoxinas) e/ou que apresentam efeitos intensos no sistema cardiovascular (Hodgson & Isbister, 2009).

### 1.3 RETROSPECTIVA RESUMIDA SOBRE OS NEMATOCISTOS

A utilização do termo «nematocisto» generalizou-se, internacionalmente, em detrimento dos termos originais «cnida» ou «cnidocisto\*», os quais eram mais elucidativos sobre a sua existência e ocorrência, uma vez que, todos os cnidários, e apenas eles, o possuem.

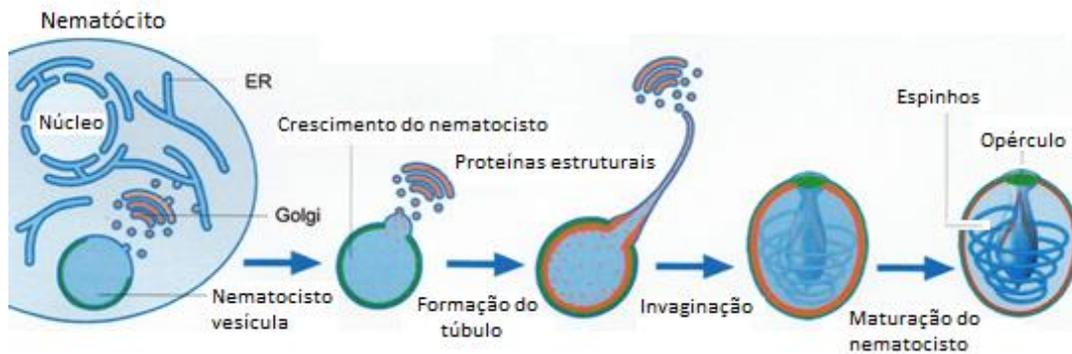
A propósito de terminologia relacionada com os nematocistos, em português, Saldanha (1997) refere na página 58: “os cnidários possuem células venenosas, os nematoblastos ou cnidoblastos que contêm nematocistos (filamentos urticantes alojados em vesículas, v. fig.4)”. A figura 5 reproduz o esquema apresentado por aquele autor.



**Figura 5.** Esquema de um nematocisto (Saldanha,1997)

Nos textos em inglês, os nematocistos são frequentemente descritos como “ the Cnidarian stinging organelle”. Segundo Beckmann e Ozbek (2012) a formação do nematocisto começa no citoplasma do nematócito (cnidócito) e a vesícula nematocisto vai crescendo por adição de proteínas oriundas do aparelho de Golgi. A formação do túbulo inicia-se por tubulação membranar no ponto apical da vesícula do nematocisto. Depois da formação, o túbulo é invaginado na cápsula a qual é fechada pelo opérculo. Os espinhos são adicionados ao túbulo após a invaginação. A maturação do nematocisto envolve a compactação da membrana exterior da cápsula através da polimerização de proteínas estruturais. A figura 6 apresenta um esquema da morfogênese dos nematocistos.

\* **Nota:** Alguns autores referem que determinados cnidários, nomeadamente os antozoários, podem possuir outros cnidocistos, designados espirocistos e pticocistos. Outros autores porém consideram que os espirocistos e pticocistos são nematocistos altamente especializados. No caso dos cifozoários, como a medusa *C. tagi*, há consenso em torno da designação única de nematocisto (Ozbek *et al*, 2009).

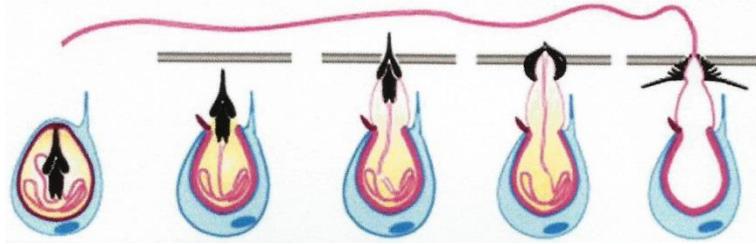


**Figura 6.** Representação esquemática da morfogênese dos nematocistos (adaptado de Beckmann & Ozbek, 2012).

Devido ao facto de armazenarem a toxina dos cnidários, há autores que referem os nematocistos como “cápsulas com veneno” (Brinkman *et al.*, 2012).

Em relação ao mecanismo de descarga dos nematocistos, Özbek *et al* (2009) consideram que todos os cnidários obedecem a um mesmo padrão. Segundo estes autores, os nematocistos maduros alojam-se no polo apical do nematócito, estando a vesícula nematocisto envolvida numa rede de microtúbulos e filamentos intermédios que a suportam na célula. As cápsulas intactas estão sob alta pressão osmótica. Quando ocorre a descarga, a cápsula abre libertando o túbulo e as toxinas. Neste processo, o organelo é ancorado pelo citoesqueleto e não altera a sua posição no interior da célula. (Figura 7). Pelo facto do nematocisto maduro ocupar a quase totalidade da célula e não se desprender do nematócito, mesmo depois de despoletado, é frequente encontrar na literatura a utilização do termo «nematocisto» para referir o conjunto, por exemplo no trabalho de Östman (2000). No presente trabalho também adoptou-se esta aproximação.

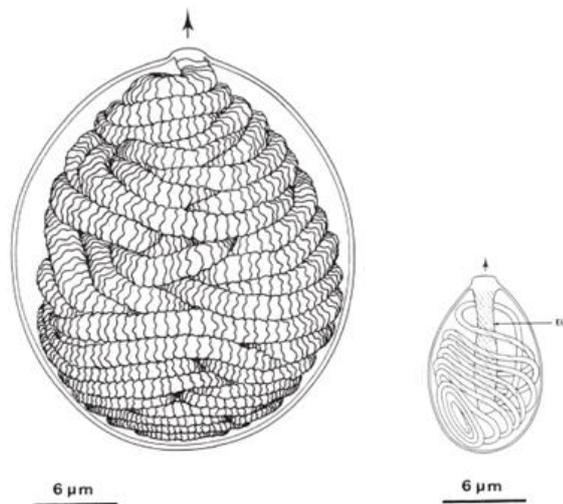
A descarga urticante dos cnidários é um dos mais rápidos movimentos no reino animal. Ensaio realizados com pólipos da hydra *Stauridiosarsia producta* indicaram que a descarga do nematócito pode ser induzida por aplicação de uma suave diferença de potencial (80 mV) e/ou pela variação no teor de cálcio extracelular (baixos teores retardam a descarga): para 6-8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  registou-se um tempo de 180  $\mu\text{s}$  (Özbek *et al*, 2009).



**Figura 7** – Representação esquemática dos principais passos da descarga de um nematocisto (Özbek et al, 2009).

A intenção de sistematizar o estudo dos nematocistos foi inicialmente proposta em 1929, por Stephenson; actualmente são conhecidos mais de 30 tipos morfológicamente diferentes, mas ainda não há uma nomenclatura consensualmente aceite. Do mesmo modo, ainda não há informação suficiente que relacione a morfologia do nematocisto com a sua toxicidade ou mesmo com a taxonomia dos cnidários (Fautin, 2009).

De todos os nematocistos conhecidos, os mais frequentes são os designados por birhopaloid/isorhiza e eurytele (Figura 8). Resumidamente, nos birhopaloid/isorhiza não há nítida visualização de um eixo central enquanto os euryteles apresentam uma constrição da zona basal seguida por um túbulo delgado enrolado sobre um eixo central; são nematocistos mais penetrantes (Peach & Pitt, 2005).

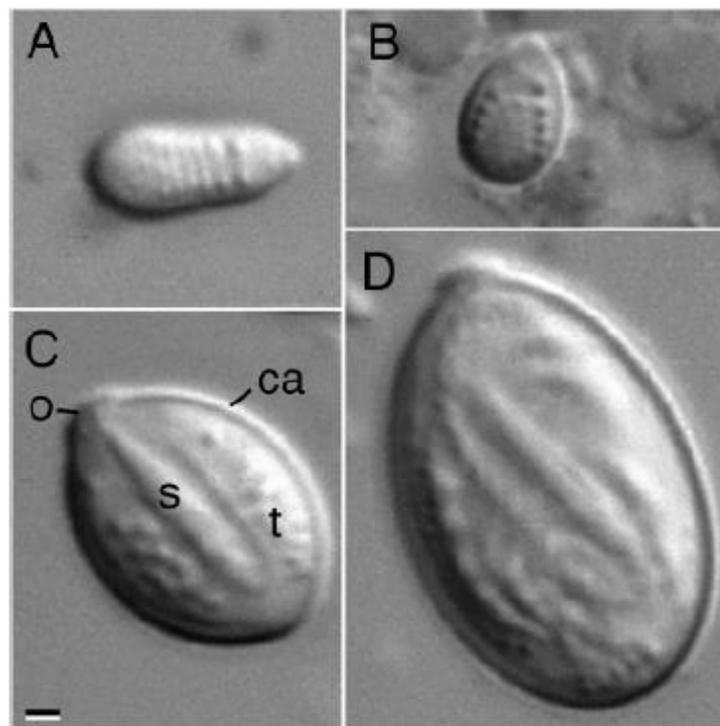


**Figura 8** – Representação esquemática de dois tipos de nematocistos. À esquerda, birhopaloid/isorhiza; à direita, eurytele (Östman & Hyman, 1997).

Num mesmo animal, os nematocistos variam em forma, dimensão e abundância. Os diferentes predadores e presas com que um cnidário se relaciona durante a vida podem ser alguns dos factores responsáveis pelos seus diferentes tipos de nematocistos (Carrette *et al.*, 2002).

Baseando-se na morfologia, Östman (2000), propôs uma classificação detalhada e exaustiva dos diferentes tipos de nematocistos das diferentes classes de cnidários. Embora seja referido por todos os autores que estudam nematocistos, a nomenclatura proposta por Östman (2000) não costuma ser seguida rigidamente, em parte pela sua difícil leitura e também devido a algumas incoerências do texto (Peach & Pitt, 2005; Fautin, 2009).

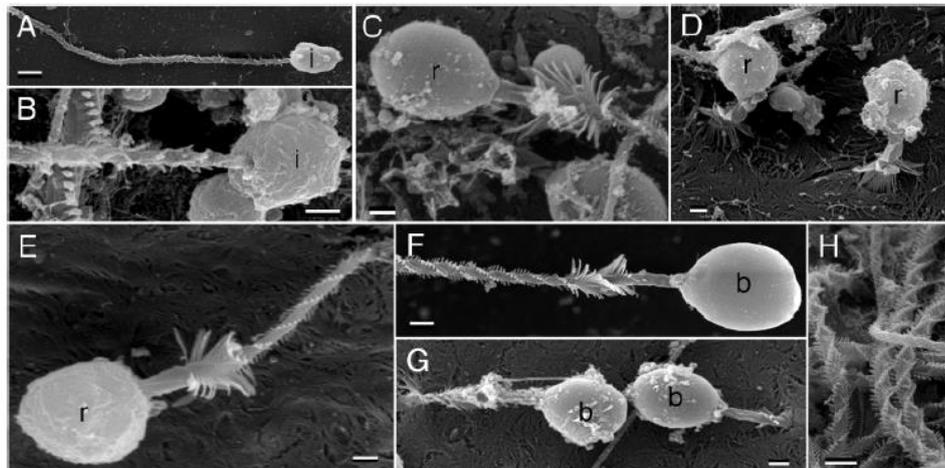
Peach e Pitt (2005) estudaram a morfologia dos nematocistos da *C. mosaicus*, por microscopia óptica (MO), (Figura 9) e por microscopia electrónica de varrimento, (MEV) (Figura 10), tendo encontrado quatro tipos de nematocistos os quais designaram por: isorhizae holotrichous em forma de pera, isorhizae holotrichous em forma oval, rhopaloids e birhopaloids. No presente trabalho adoptou-se a terminologia utilizada por Peach e Pitt (2005) para designar os nematocistos da *C. tagi*.



**Figura 9** – Fotomicrografia em MO dos nematocistos da *C. mosaicus* (Peach & Pitt, 2005). A - Holotrichous isorhizae em forma de pêra; B - Holotrichous isorhizae em forma oval; C - Rhopaloids; D - Birhopaloids; (ca) - Parede da cápsula; (o) - Opérculo, (s) - Eixo central, (t) – Túbulo. Barra de escala, 1µm.

A designação holotrichous aplica-se às características do túbulo, indica a presença de “espinhos” em toda a extensão do túbulo, as quais só são evidenciadas no nematocisto despoletado, (Figura 10 - F). Os nematocistos rhopaloid e birhopaloid possuem ambos um eixo central sendo, portanto, variações de euryteles. A distinção

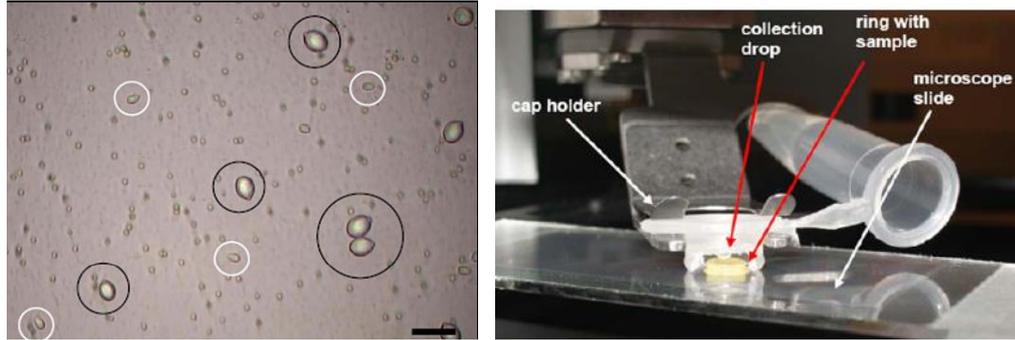
entre rhopaloid e birhopaloid faz-se no nematocisto despoletado: o túbulo do birhopaloid é o mais curto dos túbulos mas possui um maior diâmetro, além de um alargamento na extremidade.



**Figura 10** – Fotomicrografia em MEV dos nematocistos da *C. mosaicus* (Peach & Pitt, 2005). A,B (i) Holotrichous Isorhizae; C-E (r) Rhopaloid; F-G (b) Birhopaloid; H tubos de vários tipos de nematocistos. Barra de escala A, F,H = 2  $\mu$ m; B-E barra de escala = 1  $\mu$ m.

desenvolvimento de novas técnicas para o seu isolamento (Wiebring *et al.*, 2010 a e b; Satori *et al.*, 2012), a caracterização química dos seus componentes (Balasubramanian *et al.*, 2012; Weston *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013), a determinação da sua citotoxicidade (Cuiping *et al.*, 2012), os mecanismos de acção das toxinas e possíveis terapias (Birsa *et al.*, 2010).

A propósito de novas técnicas para o isolamento dos nematocistos, Wiebring *et al.* (2010 a e b) propuseram um procedimento inovador baseado no método de microdissecção e captura a laser, desenvolvido inicialmente por Schütze *et al.* (2003). A técnica de microdissecção a laser e extração celular baseia-se num impulso de laser UV-A, o qual corta o material sem gerar calor nos tecidos envolventes (Figura 11 à esquerda). A seguir, o material cortado é catapultado para dentro de um tubo de recolha com um simples impulso do laser (Figura 11 à direita).



**Figura 11** - À esquerda, selecção de diferentes nematocistos para a microdissecção a laser. À direita, eppendorf especial e sistema de recolha do material (Wiebring *et al*, 2010 a).

Wiebring *et al.* (2010 a) aplicaram esta técnica aos nematocistos de *A. aurita* e de *Cyanea lamarckii*. Os dois principais desafios referidos pelos autores foram: manter a integridade do nematocisto e conseguir extrair das cápsulas quantidades suficientes para a posterior análise bioquímica das proteínas contidas nos nematocistos.

No que respeita à composição química das proteínas estruturais dos nematocistos, os estudos para a determinação do proteoma da *Hydra magnipapillata* desvendaram a existência de 3 proteínas, denominadas em inglês como NOWA (Nematocyst Out Wall Antigen), Spinalin e Cnidoin, que os autores propõem serem típicas de todos os cnidários (Balasubramanian *et al*, 2012).

Em relação à composição química das toxinas contidas nos nematocistos, os estudos já efectuados referem que trata-se de compostos azotados com características peptídicas (Li *et al*, 2013; Moran *et al*, 2013). Nalgumas espécies de medusas, como a cubozoa *Chironex fleckeri*, já foram identificados alguns componentes da toxina, nomeadamente proteínas com cerca de 12 kDa, mas é amplamente reconhecida a dificuldade de obter a toxina intacta, devido à sua instabilidade (Brinkman *et al.*, 2012).

#### 1.4 ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DOS NEMATOCISTOS DA *C. TAGI*

No presente trabalho planeou-se esclarecer primeiramente os tipos de nematocistos presentes na *C. tagi*, o seu tamanho e a sua distribuição no corpo da medusa. Para isso, seleccionaram-se as microscopias óptica, MO, e de varrimento

electrónico, MEV, sendo a MO realizada na Cooperativa Egas Moniz e a MEV no Instituto Superior Técnico, em colaboração com o laboratório de Microscopia Electrónica, na pessoa da Eng<sup>a</sup> Isabel Nogueira.

Além da morfologia pretendeu-se também iniciar o estudo químico dos nematocistos, tendo-se inicialmente seleccionado para o seu isolamento a técnica de microdissecção e captura a laser. Contudo, no que respeita à *C. tagi*, este método mostrou-se de difícil execução prática. Em colaboração com a Doutora Luísa Cortes, técnica especialista responsável pela unidade de microscopia, realizaram-se ensaios preliminares com o equipamento existente no Centro de Neurociência e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. Os resultados mostraram que o sistema de ampliação disponível era insuficiente para uma selecção rigorosa do interior do nematocisto. Além disso, uma reflexão posterior evidenciou o facto de que o interior do nematocisto é constituído por vários componentes, pelo que, o material a obter necessitaria de uma purificação posterior. Tendo em conta a ocupação do equipamento de microdissecção com vários trabalhos e o tempo necessário para a obtenção de material, verificou-se que este ensaio era inviável dentro de um prazo razoável de um ano, pelo que, a microdissecção a laser foi abandonada.

Como já foi referido, os estudos químicos anteriormente realizados com a *C. tagi* determinaram apenas a composição geral da umbela e dos braços, sem distinguir as diferentes partes que os compõem. A utilidade do processo de microdissecção a laser seria poder seleccionar especificamente os nematocistos mas esta não era a única possibilidade. De facto, a histoquímica é uma técnica conhecida e utilizada há muito tempo em seres vivos para estudos localizados. Recentemente, vários autores aplicaram a histoquímica aos cnidários, com vista ao esclarecimento da sua composição sob condições específicas (Ferreira, 2010) e/ou à detecção dos seus efeitos em outros seres (Wang *et al.*, 2013).

Havendo na Cooperativa Egas Moniz toda a infra-estrutura necessária para os ensaios, optou-se por esta via e estabeleceu-se uma colaboração com o Laboratório de Histopatologia do IPIMAR, na pessoa do Dr Francisco Ruano, veterinário responsável, para a adaptação dos ensaios histoquímicos aos invertebrados marinhos.

As diversas técnicas de coloração desenvolvidas para o estudo histológico de seres vivos são, efectivamente, reacções químicas que podem indicar a presença ou ausência de compostos químicos nas células. Nesse sentido, seleccionaram-se sete métodos frequentemente utilizados. A descrição das reacções envolvidas está

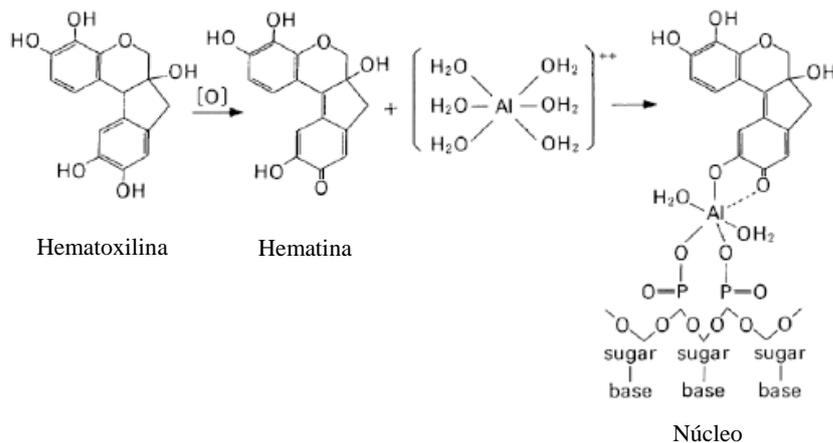
apresentada no t3pico 1.5, o procedimento experimental geral adoptado consta em 2.1 e 2.2 e o procedimento detalhado de cada t3cnica histoqu3mica no anexo A. Os resultados e a discuss3o do estudo dos nematocistos da *C. tagi* apresentam-se em 3.1.

## 1.5 M3TODOS HISTOQU3MICOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO

### 1.5.1 COLORA3O DE HEMATOXILINA-EOSINA

A colora3o com hematoxilina-eosina, H&E, 3 a t3cnica mais frequentemente utilizada em colora3o histol3gica e tem vindo a ser aplicada h3 mais de cem anos.

A hematoxilina por si s3o n3o pode ser utilizada como um corante, pois 3 incolor. Assim, deve ser oxidada e complexada com i3es alum3nio, resultando numa subst3ncia azul-p3rpura escura. Uma vez aplicado 3 c3lula, o alum3nio do complexo vai ligar-se a zonas ani3nicas, sobretudo aos grupos fosfato dos 3cidos nucleicos do n3cleo, corando-os de p3rpura (Figura 12).

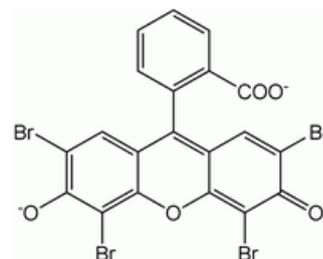


**Figura 12** - Esquema de prepara3o do corante hematoxilina e sua reac3o com o DNA (Wako-chem, 2013).

A eosina y 3 frequentemente utilizada como corante de contraste, sendo um corante ac3dico vermelho, resultante da ac3o do bromo sobre a fluoresce3na (Figura 13). Em meios aquosos, a eosina pode ser

representada como Na<sup>+</sup> eosina<sup>-</sup>. A sua regi3o ani3nica permite liga3es por pontes salinas 3s

estruturas celulares carregadas positivamente, nomeadamente 3s prote3nas cati3nicas do citoplasma.



**Figura 13** - Estrutura da eosina y. (N3 CAS 17372-87-1)

Recentemente, Wang *et al* (2013) usaram hematoxilina-eosina para estudar o efeito da toxina da *C. capillata* em órgãos de ratos.

### 1.5.2 COLORAÇÃO DE ALCIAN BLUE E ALCIAN BLUE - PAS

O corante alcian blue é constituído por um anel de ftalocianina com centro de cobre ligado a quatro grupos com características básicas (Figura 14). Desde a sua introdução por Steedman em 1950, como um corante selectivo de mucinas, o alcian blue tornou-se um dos corantes mais importantes em histoquímica e citoquímica.

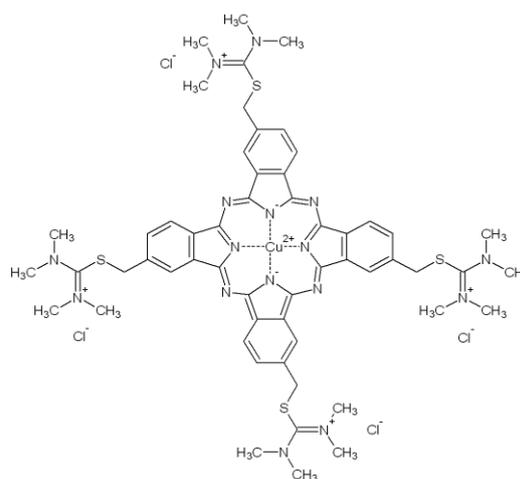
As mucinas são constituídas por uma proteína central ligada a múltiplas cadeias de polissacáridos, através de serinas e treoninas. O conteúdo em polissacáridos de uma mucina pode oscilar entre 60 e 80% da massa molecular total da molécula.

A proteína central das mucinas não costuma ter reactividade histoquímica, pelo que, a detecção das mucinas faz-se pelos seus polissacáridos.

Quando os polissacáridos são compostos por monossacáridos simples, sem grupos ionizáveis, as mucinas são denominadas neutras. As mucinas com monossacáridos modificados por grupos carboxilato ou sulfonato podem tornar-se aniões e são denominadas mucinas ácidas.

A pH 2,5 o corante alcian blue reage com as mucinas ácidas: a sua carga positiva interage com os grupos aniónicos dos carboxilatos e sulfonatos resultando numa cor azul. As mucinas neutras não reagem com alcian blue (Myers, 2009).

A técnica da coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS) baseia-se na reactividade dos grupos aldeído da amostra, formados pela acção do ácido periódico sobre grupos hidroxilo adjacentes da amostra, os quais seguidamente oxidam a fucsina-sulfito (Figura 15). A intensidade da cor rosa será proporcional à

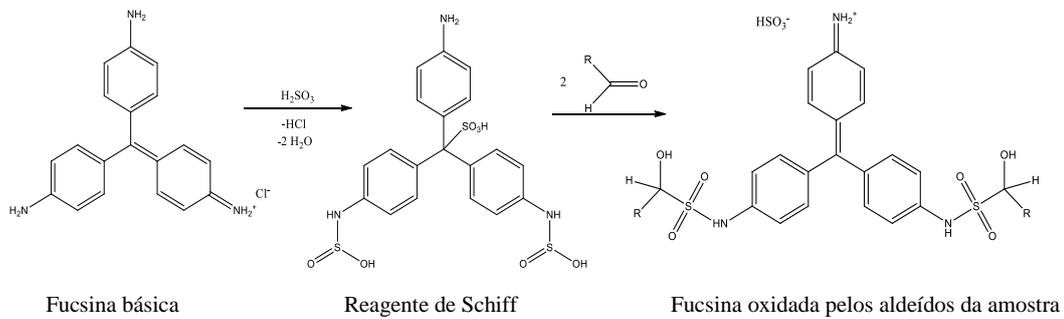


**Figura 14** – Estrutura do alcian-blue (Nº CAS 33864-99-2)

concentração dos grupos aldeído nos glúcidos em geral, inclusivamente glucosaminoglicanos, e também nas glicoproteínas e mucinas.

A combinação do alcian blue com o PAS, pode ser usada para distinguir as mucinas neutras das ácidas pois o alcian blue só cora as ácidas e o PAS cora ambas.

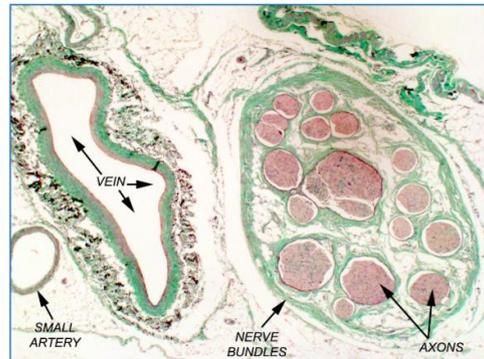
A aplicação do reagente PAS a seguir ao alcian blue vai corar de magenta as mucinas neutras e de azul-escuro ou púrpura as mucinas ácidas.



**Figura 15** – Coloração PAS, mecanismo de formação do produto corado (Kessler, 2013).

### 1.5.3 COLORAÇÃO DE TRICRÓMIO DE MASSON

Na técnica desenvolvida por Pierre Masson utilizam-se três corantes distintos, cada qual selectivo para um elemento dos tecidos. O primeiro corante a ser aplicado é a hematoxilina de ferro (hematoxilina de Weigert's) que irá corar o núcleo celular.



**Figura 16** – Tecido de ligação corado com Tricrómio de Masson (Caceci, 2008).

Seguidamente é aplicada a solução A, composta essencialmente por fucsina ácida

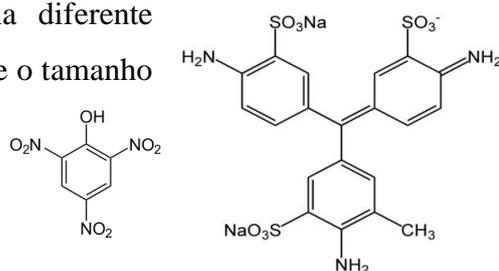
e xilidina ponceau. Estes dois corantes ácidos vão actuar principalmente sobre estruturas do tecido conjuntivo com características básicas, como o citoplasma e as fibras de colagénio. A seguir a amostra é tratada com a solução B, composta por ácido fosfomolibdico (PMA). Por fim, é aplicada a solução C, constituída pelo corante ácido verde luz, o qual irá, através de uma reacção de substituição, ocupar os sítios de ligação do corante PMA e corar de verde as fibras de colagénio (Figura 16).

#### 1.5.4 COLORAÇÃO DE VAN GIESON

A técnica de Van Gieson baseia-se na diferente capacidade de penetração na célula, consoante o tamanho do corante utilizado. O corante de menor tamanho, ácido pícrico, consegue facilmente penetrar nos tecidos e ligar-se por pontes de

hidrogénio ao citoplasma, corando-o de amarelo. Já a fucsina ácida, com maior tamanho, não consegue

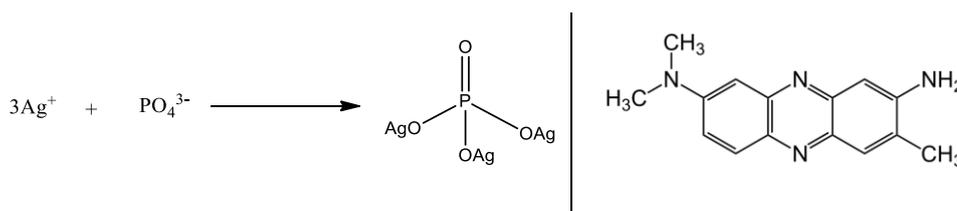
penetrar as estruturas tecidulares e liga-se principalmente às estruturas localizadas à superfície, como o colagénio, corando-o de vermelho (Figura 17). A ligação da fucsina ácida ao colagénio ocorre por interacções electrostáticas entre a zona aniónica do corante e os aminoácidos com carácter básico do colagénio.



**Figura 17-** Estruturas dos corantes da coloração Van Gieson. À esquerda, ácido pícrico (Nº CAS 88-89-1); à direita, fúscina ácida (Nº CAS 3244-88-0) (Nielson e Moe, 1998).

#### 1.5.5 COLORAÇÃO DE VON KOSSA

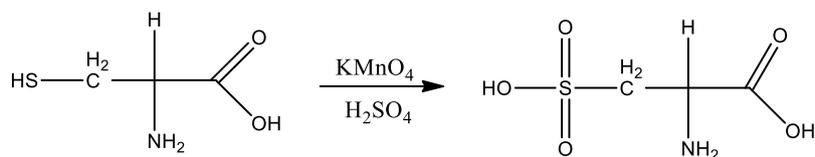
A técnica desenvolvida por Von Kossa (1901) baseia-se na reacção de precipitação de sais de prata - reduzida pela luz solar - com os iões fosfato, resultando num precipitado negro visualizável contra o corante vermelho neutro. Dado que o fosfato ocorre nas células concomitantemente com o cálcio, a detecção de fosfato é também uma detecção de cálcio, embora indirecta (Figura 18).



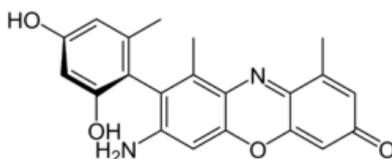
**Figura 18** – À esquerda: esquema reaccional da precipitação do fosfato com a prata (Meloan, 1985). À direita: corante vermelho neutro, usado como contraste (Nº CAS 553-24-2).

#### 1.5.6 COLORAÇÃO ORCEÍNA-SHIKATA

Na técnica da orceína modificada por Shikata (1974) existe um primeiro passo oxidativo conseguido com o permanganato acídico durante o qual os grupos tiol dos aminoácidos são oxidados a ácido sulfónico (Figura 19). Seguidamente recorre-se à orceína (Figura 20) para corar as proteínas associadas ao cobre, que apresentam agora maior afinidade para o corante.



**Figura 19** - Oxidação da cisteína com permanganato ácido.



**Figura 20** -  $\alpha$ - aminoorceína (Nº CAS 1400-62-0).

## 1.6 RETROSPECTIVA RESUMIDA DOS CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO GENÉTICA

O estudo das relações genéticas entre os seres vivos tem progredido muito rapidamente, graças ao desenvolvimento da análise molecular dos genes.

Tendo em conta os procariotas, Woese (1987) demonstrou que as relações filogenéticas podiam ser determinadas através da comparação de uma parte estável do genoma, como os genes que codificam para o ácido ribonucleico ribossómico (rRNA). Desde então, o rRNA e os seus genes correspondentes vêm sendo muito utilizados como biomarcadores. Actualmente, para avaliações de diversidade microbiana, é consensualmente aceite a amplificação do DNA que codifica para o ácido ribonucleico da região 16S da grande subunidade ribossomal, 16S rRNA, (Mitra *et al.*, 2011). Contudo, para a obtenção de resultados verdadeiros, é decisiva a correcta selecção dos iniciadores. No recente trabalho de Klindworth *et al* (2013) foram testados 512 pares de iniciadores, indicados na literatura para a amplificação do DNA que codifica para 16S rRNA; destes, efectivamente, apenas 10 mostraram ser iniciadores de utilização geral na sequenciação de DNA de procariotas.

Em relação às comparações genéticas nos eucariotas, têm sido propostos genes nucleares que codificam para regiões do ribossoma e também diversos genes mitocondriais, os quais contêm sequências codificantes para proteínas usadas na função celular como, por exemplo, as enzimas citocromo oxidase, ATPase e NADH desidrogenase. No entanto, ainda não há um consenso sobre a região a adoptar ou mesmo se é possível seleccionar uma região única para todos os eucariotas. Por exemplo, tendo em vista o estudo da diversidade de pequenos eucariotas em amostras como areia e água do mar (uma área recente denominada metagenética ambiental) Fonseca *et al* (2012) seleccionaram a região 18S rDNA. Por outro lado, Machida *et*

al (2012) estudaram a compatibilidade inter-espécie dos iniciadores de cinco regiões, nomeadamente mtCOI, mt12S, ncITS, nc28S e nc18S (o autor utiliza os prefixos mt para mitocôndria e nc para núcleo), tendo composto uma tabela com as vantagens e desvantagens do uso de cada região com os seguintes critérios: taxa de evolução, desenho de iniciadores universais, genes codificantes, codificação de proteína e facilidade de alinhamento. A tabela 3 transcreve os resultados descritos no artigo.

**Tabela 3** - Vantagens e desvantagens de cada região genética para análise metagenética (Machida *et al.*, 2012).

Parâmetro	mtCOI	mt12S	ncITS	nc28S	nc18S
<b>Taxa de evolução</b>	Muito rápida	Rápida	Lenta	Lenta	Muito lenta
<b>Desenho de iniciadores universais</b>	Muito difícil	Difícil	Fácil	Fácil	Muito fácil
<b>Gene codificantes</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
<b>Codificação de Proteínas</b>	Sim	Não	Não	Não	Não
<b>Alinhamento</b>	Fácil	Muito difícil	Muito difícil	Fácil	Fácil

Como conclusão, os autores recomendaram os iniciadores que desenvolveram para as regiões 18S e 28S, para estudos metagenéticos, e referiram que para estudos filogenéticos seriam precisos iniciadores com sequências mais longas.

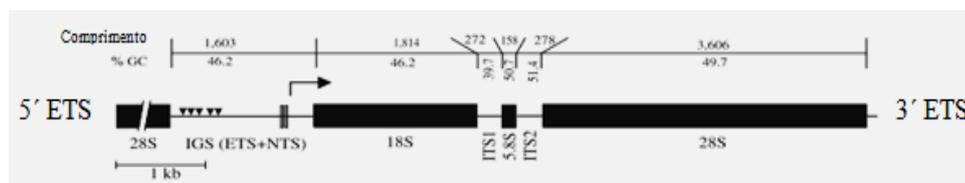
Tendo em vista o caso particular das Scyphozoa, Bayha *et al* (2010) propuseram a análise filogenética de 48 espécies de medusas, baseada na comparação de segmentos das regiões 18S e 28S do rDNA. Para isso, utilizaram 9 iniciadores para a região 18S e 8 para a 28S. As sequenciações parciais dos nucleótidos obtidos no referido trabalho estão disponíveis na base de dados do NCBI em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>.

A sequenciação completa do rDNA da Scyphozoa *Aurelia* sp.1 apresentou um total de 7731 pares de base, não tendo sido detectada a presença de 5S rDNA (Ki *et al.*, 2008). A tabela 4 detalha os comprimentos das várias sequências da *Aurelia* sp.1, em pares de bases, e a figura 21 ilustra a organização do seu rDNA.

**Tabela 4** - Comprimento de cada rDNA da *Aurelia* sp.1 e comprimento total do genoma ribossomal (Ki *et al.*, 2008).

Região	Pares de base, pb
18S	1814
ITS1	272
5,8S	158
ITS2	278
28S	3606
IGS	1603
Comprimento total	7731

A análise do rDNA *Aurelia* sp.1 mostra uma percentagem de 47,8% em G-C e de 52,3% em A-T.



**Figura 21** - Diagrama da organização do rDNA *Aurelia* sp.1 (Ki *et al.*, 2008)

Apesar dos progressos na análise molecular dos genes, não há um consenso quanto à similaridade necessária para atribuir uma sequência a um género ou espécie. No caso das bactérias, em geral, aceita-se que uma similaridade acima de 97% é indicativa do género e uma similaridade acima de 99% define a espécie (Bosshard *et al.*, 2003). No caso das Scyphozoas, os especialistas consideram que não existe um padrão único para comparar as espécies sendo indispensável a integração da análise molecular com a morfologia, e às vezes também com a fisiologia. Por exemplo, no estudo morfológico e genético de seis populações da medusa *Mastigias papua*, em que cinco ocorrem em lagos marinhos e uma em lagoa, todas em Palau, Micronésia, encontraram-se diferenças morfológicas significativas entre as populações, como a coloração do animal, a presença ou não de pontos escuros na umbela, a forma dos braços. Contudo as diferenças moleculares, nas regiões COI e ITS1, foram inferiores a 2,2%. Como consequência deste estudo, as cinco populações foram classificadas como sub-espécies, embora existam registos de espécies de Scyphozoas com diferenças intraespécie superiores a 6% nestas regiões, ou seja, a diferença morfológica foi considerada mais significativa que a similaridade genética (Dawson, 2005).

Nota: Nos artigos consultados para este trabalho, encontrou-se alguma ambiguidade na abreviatura do DNA nuclear referente ao RNA ribossomal, por exemplo, nSSU rDNA (Fonseca *et al.*, 2012), 18S ncDNA (Machida *et al.*, 2012) e 18S rDNA (Bayha *et al.*, 2010). A abreviatura adoptada foi a apresentada em Bayha *et al* (2010).

## **1.7 ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO GENÉTICO DA *C. TAGI***

Tal como já foi referido, até ao momento, a *C. mosaicus* é a espécie mais estudada do género *Catostylus*, sendo a *C. tagi* a segunda. A *C. mosaicus*, que ocorre sobretudo na Austrália, tem sido objecto de vários estudos existindo, em Março de 2013, mais de 110 referências genéticas na base de dados do National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), nomeadamente as sequenciações parciais do gene mitocondrial da citocromo c oxidase I (COI) - 65 referências-, e dos fragmentos do DNA nuclear e dos RNAs da pequena subunidade ribossomal, 18S - 12 referências -, da grande subunidade ribossomal 28S – 1 referência -, e do fragmento do espaçador interno transcrito 1, ITS1 – 47 referências.

Até ao momento, não há informações na literatura sobre a composição genética da *C. tagi*. No presente trabalho pretendeu-se comparar geneticamente os exemplares que ocorrem no estuário do Tejo com os do Sado e também com medusas de outras regiões geográficas, especialmente a *C. mosaicus*. Para a síntese dos iniciadores e a sequenciação dos fragmentos amplificados, estabeleceu-se uma colaboração com o laboratório STAB Vida, localizado na FCT/UNL, na pessoa da Doutora Carla Clemente, <http://www.stabvida.com/index.php/en/support/contacts>.

Como ponto de partida, seleccionou-se o trabalho de Dawson (2005b) com a *C. mosaicus*, no qual utilizou iniciadores para amplificar o DNA mitocondrial que codifica para a subunidade I da enzima citocromo C oxidase, mtCOI, e também iniciadores para amplificar o DNA nuclear que codifica para o espaçador interno transcrito 1, ITS1, ribossomal. No caso da *C. tagi*, após vários ensaios de optimização do procedimento total, sucedeu que, com os iniciadores indicados para mtCOI, as sequências obtidas alinhavam apenas com bactérias. Testaram-se então, alternativamente, os iniciadores de mtCOI propostos por Ki *et al* (2008). O resultado foi o mesmo, ou seja, as sequências obtidas alinhavam apenas com bactérias. Um maior aprofundamento na literatura revelou a dificuldade registada no correcto

desenho de iniciadores para regiões mitocondriais, como mtCOI e mt12S (Machida *et al.*, 2012), (Tabela 3), pelo que não se continuou a insistir na optimização desta sequenciação.

A estratégia final adoptada foi a comparação genética através das sequenciações parciais relativas a ITS1, 18S rDNA e 28S rDNA. Para isso seleccionaram-se os iniciadores e as condições de amplificação descritos em Dawson (2005) e Bayha *et al* (2010), por serem as principais referências na biologia molecular das Scyphozoa, sobretudo da *C. mosaicus*.

O procedimento experimental optimizado está descrito no tópico 2.3, as sequências obtidas estão apresentadas no anexo B. Os resultados e discussão constam no tópico 3.3.

## 2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

**Nota:** Em todos os ensaios realizados na Cooperativa Egas Moniz, utilizou-se unicamente água de grau analítico (água tipo II na classificação da ASTM), obtida do equipamento Elix 10 - Millipore, com uma condutividade menor que 1,0.  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 20°C. A referida água tipo II está mencionada como água, no presente trabalho.

### 2.1 RECOLHA DOS EXEMPLARES, AMOSTRAGEM E ARMAZENAGEM

Para a captura da *C. tagi* no Tejo, contou-se algumas vezes com a colaboração da Dr.<sup>a</sup> Fátima Gil, do Aquário Vasco da Gama, conjuntamente com a Equipa do Albacora – barco da Marinha Portuguesa – e outras vezes com a dos Bombeiros da Trafaria (Figura 22). A captura no Sado realizou-se em colaboração com o Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas, que disponibilizou o barco e o funcionário – Sr. Carlos Silva.

As amostras de *C. tagi* adulta, com diâmetro de umbela entre 19 e 27 cm, recolhidas no Tejo e Sado, foram imediatamente transportadas ao laboratório da Cooperativa Egas Moniz onde procedeu-se à preparação da amostra. Para os ensaios de microscopia e histoquímica, utilizaram-se principalmente os braços do animal, enquanto a extracção do DNA foi feita a partir das gónadas (Figura 23).

Quanto à armazenagem, as condições variaram consoante a utilização pretendida. As amostras para microscopia electrónica foram armazenadas a 4°C em etanol absoluto por não mais de 48h. As amostras utilizadas nos ensaios histoquímicos foram ou mantidas sem tratamento a 4°C, por não mais de 48h, ou conservadas em formaldeído. Verificou-se, contudo, que a *C. tagi* fresca pode ser congelada a -20°C e a -80°C, por pelo menos 30 dias, sem que ocorram alterações significativas nas características morfológicas dos nematocistos, observáveis ao microscópio óptico.

As amostras, de *C. tagi* fresca, destinadas à extracção de DNA foram inicialmente armazenadas sem tratamento a 4°C, sendo iniciado o procedimento de preparação da amostra num intervalo inferior a 48h após a captura.



**Figura 22** – À esquerda, captura da *C. tagi* no estuário do Tejo. À direita, acondicionamento da *C. tagi* após a captura.



**Figura 23**- À esquerda, um exemplar de *C. tagi* na bancada do laboratório. À direita, umbrela da *C. tagi* para remoção das gónadas.

## 2.2 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

As amostras, armazenadas em etanol absoluto, foram transportadas para o laboratório de Microscopia Electrónica do Instituto Superior Técnico e preparadas, pela Eng<sup>a</sup> Isabel Nogueira, para análise no microscópio de alta resolução Hitachi S-2400, com base no procedimento descrito por Peach e Pitt (2005) para a *C. mosaicus*.

## 2.3 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA

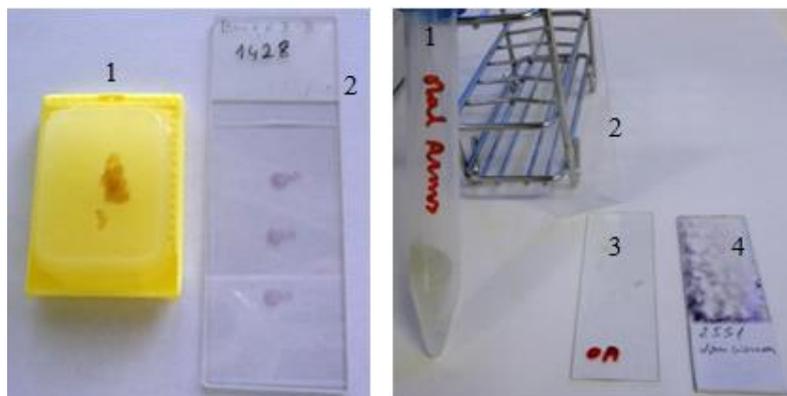
Os ensaios foram realizados na Cooperativa Egas Moniz, utilizando um microscópio Leica ATC 2000. As fotomicrografias foram obtidas com uma máquina fotográfica Sony cyber shot DSC-W215, a qual foi adaptada manualmente na ocular do microscópio.

Os procedimentos de preparação da lâmina variaram consoante a observação pretendida. Para as observações de amostra sem coloração as lâminas foram preparadas segundo Peach e Pitt (2005), com ligeiras modificações. Em resumo, uma

pequena amostra da extremidade dos braços da medusa fresca foi aplicada sobre a lâmina. Seguidamente, com o auxílio de outra lâmina, procedeu-se ao esmagamento e espalhamento da amostra (técnica do esfregaço). Deixou-se a amostra ao ar por 10-15 min, para evaporar o excesso de água. A seguir, adaptou-se a lamela sobre a lâmina e procedeu-se à observação com ampliações de 40x, 100x e 1000x.

Para as observações de amostra com coloração, empregaram-se dois procedimentos de preparação da lâmina, consoante a coloração em causa. Na condição da coloração Hematoxilina-Eosina, a lâmina foi preparada a partir da amostra imobilizada em parafina, segundo o protocolo utilizado rotineiramente no IPIMAR, o qual baseia-se no método descrito por Martoja *et al* (1967) (Figura 24).

Em todas as outras colorações a amostra foi preparada pela técnica do esfregaço, já descrita acima, com a diferença de ter sido deixado ao ar por cerca de 20 minutos, à 4°C, para consolidar a sua aderência à lâmina (Figura 24).



**Figura 24** - Preparação das lâminas para observação microscópica. À esquerda: 1- amostra no bloco de parafina em molde de Leuckart, 2- lâmina com o corte da amostra corada com H&E. À direita: 1- amostra armazenada em tubo falcon, 2- lâmina auxiliar de esfregaço, 3- lâmina com o esfregaço da amostra, 4- lâmina com amostra corada pelo método de Van Gieson.

Os protocolos de técnicas histológicas em moluscos bivalves marinhos (Howard & Smith, 1983; Kim, Ashton-Alcox & Powell, 2006) foram utilizados como ponto de partida, devido a ausência de literatura específica para medusas.

Para cada coloração histoquímica foi realizado um padrão positivo e outro negativo (Tabela 5), por forma a ajudar a interpretação dos resultados obtidos com a medusa.

**Tabela 5** - Padrões positivos e negativos das colorações efectuadas

<b>Coloração</b>	<b>Padrão positivo</b>	<b>Padrão negativo</b>
Alcian blue e Alcian blue - PAS	Mucina humana, saliva	Insulina
Tricrómio de Masson e Van Gieson	Colagénio de bovino, C-103	Albumina
Von Kossa	Caseína do leite	Insulina
Orceína-Shikata	Superóxido dismutase de eritrócitos de bovino EC.1.15.1.1-Copper-Zinc	Albumina

Os procedimentos de histoquímica estão descritos no anexo A.

## **2.4 PROCEDIMENTOS DE SEQUENCIAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO DNA**

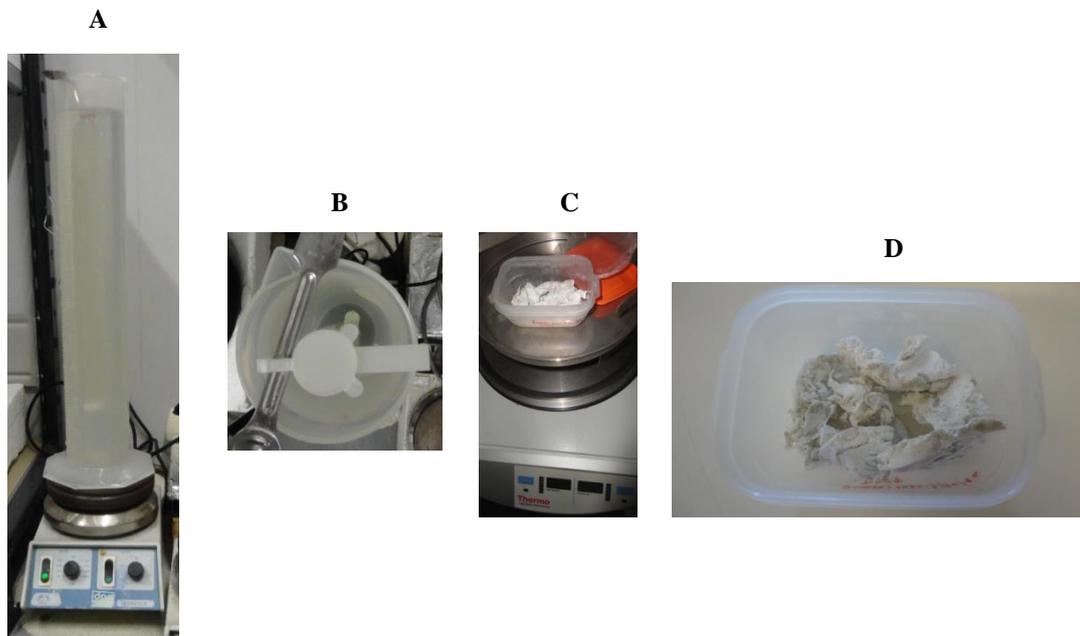
O DNA foi extraído a partir das gónadas do animal. Para a optimização da extracção realizaram-se, em ordem cronológica, as três seguintes combinações de condição da amostra e procedimento de extracção: (1) gónadas liofilizadas e procedimento de extracção descrito por Dawson (1998); (2) gónadas frescas e método de extracção com cartão FTA<sup>®</sup>; (3) gónadas dialisadas e liofilizadas e kit E.Z.N.A.<sup>®</sup> Mollusc DNA. Nas duas primeiras combinações não se obteve DNA com qualidade e quantidade suficiente para realizar com sucesso a reacção de PCR com os iniciadores, pelo que foram descartadas. A terceira combinação apresentou os melhores resultados e foi a adoptada: descreve-se a seguir o procedimento correspondente.

### **2.4.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Com o objectivo de remover sais e outras impurezas contidas na amostra, colocaram-se aproximadamente 300 g de gónadas frescas de *C. tagi* numa membrana de diálise Cellu-Sep H1<sup>®</sup> com MWCO nominal de 15000 (Membrane Filtration Products Inc, ref 1-1550-45), dentro de uma proveta com água numa câmara fria a 4°C com agitação constante (Figura 25). A diálise teve uma duração de cinco dias e durante esse período renovou-se 1,5 litros de água de 12 em 12 horas.

As gónadas purificadas foram colocadas num pequeno recipiente e congeladas a -80°C. Após a sua congelação, a amostra foi colocada no liofilizador (Modulyod-230, Thermo Electron Corporation), a fim de ser retirada toda a água da amostra, para que esta ficasse mais concentrada. Ao fim de dois dias a amostra já se encontrava

desidratada, sendo então armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 25). Para fins de comparação, realizou-se também a diálise em membrana com MWCO nominal de 1000 ((Membrane Filtration Products Inc, ref 1-0150-45) e não se observaram diferenças relevantes, no que toca aos resultados finais de extracção do DNA.



**Figura 25** – Preparação da amostra para extracção do DNA. A: diálise com agitação; B: diálise, vista de cima; C: amostra no liofilizador; D: detalhe da amostra liofilizada.

#### 2.4.2 EXTRACÇÃO DO DNA

A amostra dialisada e liofilizada foi macerada com o auxílio de um almofariz e pilão. De seguida, ressuspendeu-se o material liofilizado em tampão PBS 1X (diluído a partir de tampão PBS 10X, ref Merck 6508-OP) e procedeu-se à sua centrifugação a 12000 rpm e removeu-se o sobrenadante, com muito cuidado para não perturbar o sedimento. Com o precipitado obtido, seguiu-se o protocolo do kit E.Z.N.A.® Mollusc DNA (Omega Bio-tek), comercializado em Portugal pela VWR, descrito a seguir.

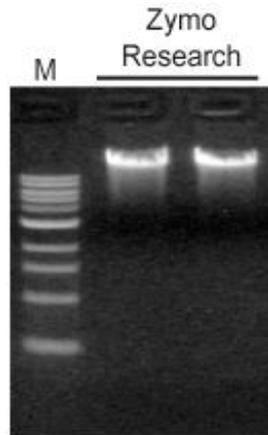
Adicionou-se ao precipitado 350  $\mu\text{L}$  de tampão ML1 e 25  $\mu\text{L}$  de proteinase K e, com a ajuda do vortex, misturou-se a solução até ficar totalmente homogeneizada. Incubou-se a solução a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Após este procedimento, adicionou-se 350  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool-isoamílico, na proporção 24:1. Centrifugou-se a 10000 rpm durante por 2 min à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa (fase de

cima) para um tubo Eppendorf, evitando-se a parte leitosa, pois esta contém contaminantes e inibidores. De seguida, juntou-se à solução um volume igual de tampão MBL e 10 µL de RNAase A. Agitou-se a solução com a ajuda do vortex à velocidade máxima durante 15 segundos. A suspensão foi a incubar a 70°C por 10 min, após este procedimento a solução ficou à temperatura ambiente durante uns minutos, até arrefecer. Adicionou-se à solução um volume igual de etanol a 100% e misturou-se com o vortex à velocidade máxima, por 15 segundos. Inseriu-se uma mini-coluna de extracção de HiBind® DNA do kit (E.Z.N.A. Mollusc DNA) num tubo de recolha de 2 mL. À mini-coluna adicionou-se 100 µL de tampão “Equilibration Buffer” e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 min; o filtrado foi descartado e o tubo de recolha reaproveitado. Transferiu-se a totalidade da amostra, cerca de 750µL, para dentro da mini-coluna e voltou-se a centrifugar a 10000 rpm, durante 1 min.

No final da centrifugação, descartou-se o filtrado e o tubo de recolha. Introduziu-se a mini-coluna num novo tubo de recolha de 2 mL, adicionando-se 500 µL de tampão HB do kit. Fez-se nova centrifugação a 10000 rpm durante 30 segundos e descartou-se o filtrado, reutilizando o tubo de recolha, e adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem do kit (o procedimento de lavagem foi efectuada duas vezes). Voltou-se a centrifugar-se a 10000 rpm durante 1 min e descartou-se o filtrado, reaproveitando o tubo de recolha. Fez-se a centrifugação à velocidade máxima durante 2 min da mini-coluna vazia, com o objectivo de secar a membrana. A mini coluna Hibind foi transferida para um tubo Eppendorf de 2 mL livre de nucleases, adicionando-se entre 50 a 100 µL de tampão de eluição pré aquecido a 70°C. Deixou-se ficar a coluna à temperatura ambiente durante 2 min. Centrifugou-se durante 1 min e guardou-se o tubo Eppendorf contendo a solução com o DNA a -20°C, para utilizações posteriores.

**Nota:** o fabricante do kit não fornece a composição dos tampões HB, MBL, ML1, tampão de equilíbrio e tampão de eluição.

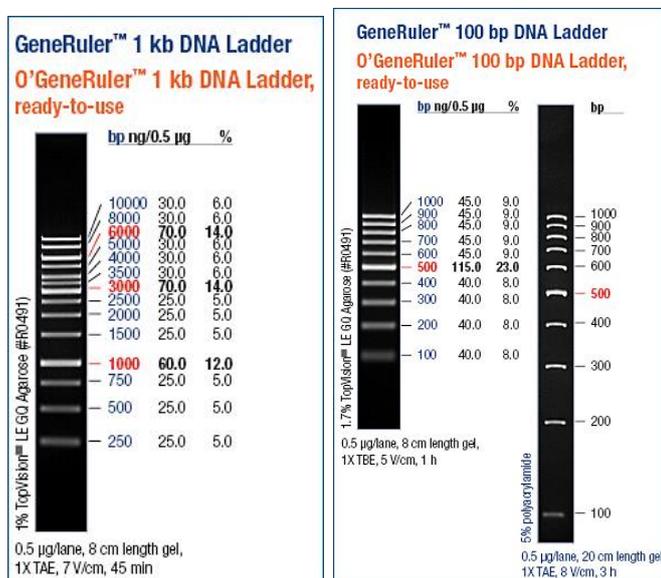
Após a extracção do DNA fez-se o gel de agarose, com o objectivo de observar as condições em que se encontrava o DNA extraído. A figura 26 mostra um padrão de DNA, extraído em quantidade adequada e sem degradação, para fins de comparação.



**Figura 26** – Gel padrão de DNA genómico não degradado. M-marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder (Zymo, 2013).

### 2.4.3 ANÁLISE ELECTROFORÉTICA

A electroforese do DNA genómico de amostras da *C. tagi* do Tejo e Sado, foi executada num gel de agarose a 0,8% em solução tampão TAE 1X a 100 V durante 45 min a 250 mA. Em cada poço colocou-se 1 µL de DNA mais 3 µL de loading dye 6x. Existindo a necessidade de um padrão para a comparação das bandas foi colocado num poço, em separado, 1 µL de marcador padrão Ladder Fermentas (Figura 27). No final, as bandas foram visualizadas no ultravioleta.

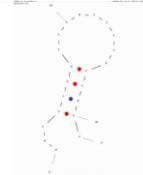
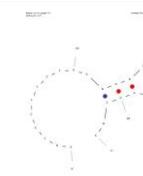


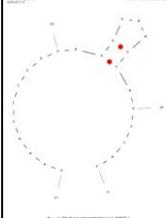
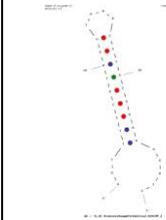
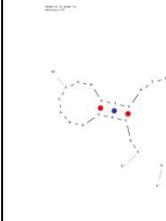
**Figura 27** - Marcadores padrão de DNA. À esquerda, GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb. À direita, GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb.

## 2.4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A tabela 6 apresenta os iniciadores utilizados para amplificar as regiões 18S, 28S e ITS1 e as suas características, nomeadamente comprimento, % de GC, temperatura de fusão, massa molecular e possível desenho (Kibbe, 2010).

**Tabela 6** - Iniciadores utilizados na sequenciação dos fragmentos do DNA da *C. tagi*.

Região	Referência	Sequência do iniciador	Comprimento (pb)	% de GC	Temperatura de fusão (°C)	Massa molecular (g/mole)	Possível desenho do iniciador
18S	Bayha <i>et al</i> (2010)	18Sa 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	21	52,4	58,9	6397,2	
		18Sb 5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'	23	52,2	57,2	6950,5	

28S	<b>Bayha et al (2010)</b>	Aa_H28S_1078 5'-GAAACTTCGGAGGGAACCAGCTAC-3'	24	54,2	59,4	7395,9	
		Aa_L28S_21 5'-GAACRGCTCAAGCTT <sup>R</sup> AAATCT-3'	22	40,9	53,5	6727,4	
ITS1	<b>Dawson (2005b)</b>	jfITS1 5f 5'-GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3'	30	56,7	65,0	9303,1	
		jfITS1 3r 5'-CGCACGAGCCGAGTGATCCACCTTAGAAG-3'	29	58,6	65,0	8896,8	

**Nota:** a letra R indica o local ou locais da degenerescência.

A tabela 7 apresenta o programa de temperaturas inicialmente utilizado para a reacção em cadeia da polimerase, PCR, o qual foi retirado de um artigo sobre a medusa *C. mosaicus* (Dawson, 2005b) e realizado no equipamento MJ Mini (Bio-Rad). No entanto, para a *C. tagi*, este programa revelou-se pouco eficaz no emparelhamento dos iniciadores, tornando-se necessário um programa de PCR diferente.

**Tabela 7-** 1º Programa de PCR testado (Dawson, 2005b).

6 ciclos	94°C por 8 min
	49°C por 2 min
	72°C por 2 min
	94°C por 4 min
	50°C por 2 min
	72°C por 2 min
33 ciclos	94°C por 45s
	51°C por 45s
	72°C por 60s
	72°C por 10 min
Termina a 4°C	

A tabela 8 apresenta o programa final de PCR adoptado neste trabalho, o qual foi optimizado pela STAB VIDA.

**Tabela 8-** Programa de PCR optimizado.

1x	95°C por 15 min
35 ciclos	94°C por 30s
	60°C por 15s
	70°C por 30s
	72°C por 6 min
Termina a 4°C	

#### 2.4.5 MÉTODO DE SEQUENCIAÇÃO DO DNA

Os fragmentos amplificados pela PCR foram purificados em coluna MicroSpin Sephadex™ G-50 (GE Healthcare) após o que procedeu-se à sequenciação das bases, por electroforese capilar (“Sanger method”), no equipamento 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) (Figura 28), utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®), no laboratório da STAB VIDA. Para cada sequência obteve-se o Phred\*, ou seja, o número de bases cuja probabilidade de erro de atribuição da identidade é de 1 em 100.

\* Índice de qualidade Phred =  $Q > 20$  onde  $Q = -10 \log_{10} P$ , sendo  $P$  a probabilidade (Ewing *et al*, 1998).



**Figura 28** – Sequenciador de DNA modelo 3730xl, Applied Biosystems.

#### 2.4.6 COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS

A homologia entre as sequências em estudo foi testada através do programa BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. As sequências foram introduzidas em modo FASTA. Para o alinhamento das sequências da *C. tagi*, seleccionou-se a opção Megablast. Deste modo obteve-se a percentagem de identificação máxima entre as duas medusas que ocorrem nos estuários do Tejo e Sado. A sequência de consenso foi obtida através do programa Codoncode Aligner versão 4.2.3.

A sequência de consenso da *C. tagi* foi a seguir comparada com a da medusa *C. mosaicus* - por ser a única medusa do género *Catostylus* com resultados publicados-, através do programa BLAST, opção Blastn.

Para a comparação das regiões 18S, 28S e ITS1, seleccionaram-se, respectivamente, as sequências da *C. mosaicus* com os seguintes códigos no GenBank: HM194779.1; HM194832.1; AY737170.1.

#### 2.4.7 MÉTODO DE CONSTRUÇÃO DOS CLADOGRAMAS

Para a comparação filogenética da *C. tagi* seleccionaram-se, além da *C. mosaicus*, mais duas medusas Scyphozoa de interesse e cujas sequências estivessem disponíveis na base de nucleótidos do NCBI. Assim, foram escolhidas a *Aurelia aurita* - por ser a medusa mais cosmopolita e mais estudada, sob todos os aspectos- e a *Cyanea capillata* - por ser muito comum no norte da Europa. Para a comparação das regiões 18S, 28S e ITS1, seleccionaram-se, respectivamente, as sequências com os seguintes códigos no GenBank: *Cyanea capillata* HM194820.1, HM194873.1, AY903056.1; *Aurelia aurita* HM194813.1; HM194866.1; FR851959.1

O programa utilizado para a construção dos cladogramas foi o MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS, Mega 5.1 versão beta 3, disponível em [http://www.megasoftware.net/mega\\_beta.php](http://www.megasoftware.net/mega_beta.php).

Em resumo, as sequências de outras medusas já sequenciadas foram retiradas da base de dados do NCBI acima transcrito e inseridas no programa. A seguir, alinharam-se as sequências pelo método MUSCLE (Edgar, 2004).

Os cladogramas foram obtidos automaticamente através da aplicação Neighbor-Join e algoritmos BioNJ a uma matriz de distâncias, composta pela Máxima Verosimilhança (MCL) (Tamura *et al*, 2001). Os cladogramas estão desenhados à escala, com o comprimento dos ramos indicando o número de substituições por sítio.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

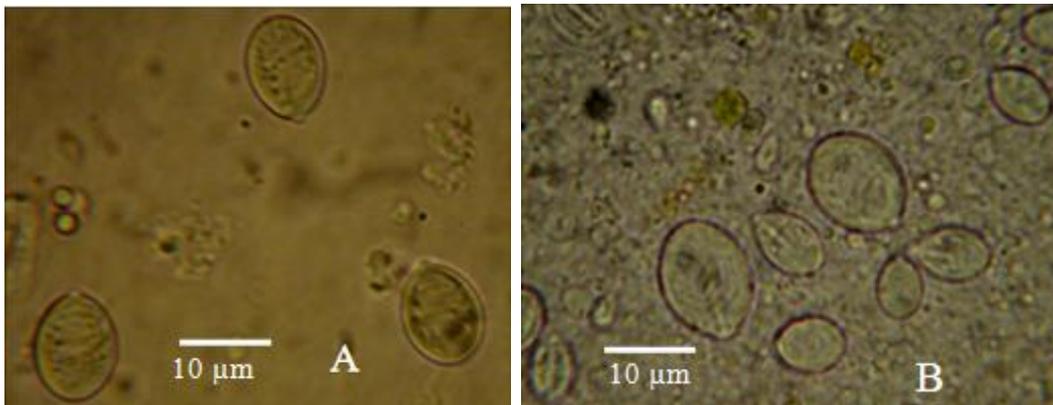
#### 3.1 RESULTADOS DE MICROSCOPIA

##### 3.1.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Os resultados microscopia óptica (MO) e de microscopia de varrimento electrónica (MEV) obtidos para os nematocistos da *C. tagi* não indicaram diferenças relevantes entre os exemplares do Tejo e do Sado, pelo que as fotomicrografias a seguir não fazem menção ao local da recolha.

A observação ao microscópio óptico, com objectivas de 40x e 100x, de esfregaços frescos da extremidade do braço e da extremidade da umbela (designada por bainha) da *C. tagi* evidenciou os seus dois principais tipos de nematocistos, os isorhizas e os euryteles, os quais não apresentaram diferenças morfológicas relevantes pelo facto de ocorrerem no braço ou na bainha. Assim, as fotomicrografias a seguir não fazem menção à região do animal.

A figura 29, mostra os nematocistos não descarregados, as cápsulas estão fechadas e intactas. Como pode ver-se na figura 29-A, os isorhizas são desprovidos de um eixo central. Na figura 29-B, visualizam-se euryteles de vários tamanhos, com o seu túbulo delgado enrolado sobre um eixo central.



**Figura 29-** Fotomicrografias em MO de nematocistos da *C. tagi*, sem coloração. Ampliação 1000x. (A) isorhizas. (B) euryteles.

No estudo da *C. mosaicus*, Peach e Pitt (2005) referiram uma notável diferença entre o tamanho dos nematocistos do braço e os da bainha da umbela, sendo os últimos significativamente superiores em tamanho. No presente estudo comparou-se o tamanho dos nematocistos consoante a região do animal mas não se encontraram diferenças relevantes. Em resumo, a bainha e os braços da *C. tagi* contêm

nematocistos de tamanhos variados não sendo possível distinguir, num mesmo animal, um tamanho típico de cada região.

No que respeita à abundância, aqueles autores referiram que aparentemente poderia haver mais abundância de nematocistos nos braços que na bainha da *C. mosaicus*. Em relação à *C. tagi* não há qualquer dúvida: os braços contêm uma concentração de nematocistos muito superior à da bainha, onde praticamente não existem nematocistos. Este facto é evidenciado pelo próprio procedimento de observação ao microscópio: no caso da bainha não se recorre à diluição da amostra para visualizar os nematocistos em separado. Já no braço a diluição é indispensável, por serem muito abundantes.

Outra diferença entre a *C. mosaicus* e a *C. tagi* é o nematocisto do tipo isorhiza: Peach e Pitt (2005) referiram a ocorrência de isorhizae holotrichous em forma de pera e isorhizae holotrichous em forma oval (Figura 9). Neste trabalho encontraram-se isorhizas redondas e ovais – mais abundantes, sendo que os redondos apresentam túbulos aparentemente atrichous (sem espinhos). Entre os nematocistos despoletados da *C. tagi* podem ser distinguidos facilmente; os birhopaloid, pelo túbulo curto, e os isorhizas redondos, pela forma da cápsula. Já os isorhizas ovais e os rhopaloid são de mais difícil distinção. Na figura 30, a fotomicrografia (A) corresponde a um isorhiza redondo com túbulo atrichous e a (B) mostra um eurytele de túbulo curto e com uma secção alargada: birhopaloid. As fotomicrografias (C) e (D) são de nematocistos de cápsula oval e tubulo holotrichous, podendo corresponder a um eurytele de túbulo longo: rhopaloid, mas não se descarta a hipótese de um isorhiza, portanto, são indefinidos; as setas destacam os ”espinhos”.



**Figura 30** – Fotomicrografias em MO, nematocistos da *C. tagi*, despoletados. Ampliação 1000x.

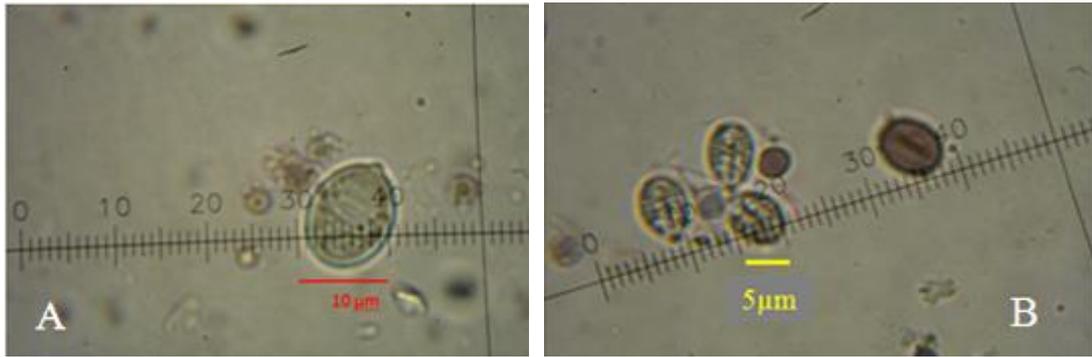
(A) isorhiza redondo e túbulo atrichous  
(B) eurytele com túbulo curto e secção alargada: birhopaloid, seta branca.  
(C) e (D) possível isorhiza e isorhiza homotrichous (espinhos do mesmo tipo) com túbulo longo  
As setas destacam os “espinhos”.

A propósito da abundância relativa dos nematocistos, Peach e Pitt (2005) relataram que a *C. mosaicus* apresenta diferente distribuição, consoante a região do animal. Assim, para a bainha, os autores encontraram uma abundância relativa de 56% de birhopaloid, 21% de isorhizae oval, 18% de rhopaloid e 5% de isorhizae em forma de pera, enquanto no braço as percentagens foram 74% de isorhizae oval, 19% de rhopaloid, 6% de birhopaloid e 1% de isorhizae em forma de pera.

No presente trabalho constatou-se que a *C. tagi*, tanto do Sado quanto do Tejo, contém uma elevada prevalência de euryteles, cerca de 80%, e nestes predominam os rhopaloid, cerca de 80%, tanto na bainha quanto no braço. Nos isorhiza, destaca-se a forma oval, cerca de 85%.

A diferença na abundância relativa dos tipos de nematocistos da *C. mosaicus* e da *C. tagi* explica-se pelo diferente meio ambiente em que as duas medusas estão inseridas, nomeadamente diferentes predadores e presas para os quais os nematocistos estão adaptados (Carrette *et al.*, 2002). É de ressaltar que neste trabalho só se estudou a *C. tagi* adulta, com diâmetro de umbela entre 19 e 27 cm. Durante as recolhas, vários animais continham pequenos crustáceos mortos no seu interior, indicando uma das suas fontes de alimento. No que toca às relações simbióticas, várias das medusas capturadas traziam pequenos carapaus vivos, os quais se mantinham nadando à volta da medusa durante algum tempo e depois morriam, devido à forte descarga de toxinas ejectadas pela medusa, como resposta à captura.

O procedimento de calibração das lâminas, descrito por Junqueira e Carneiro (2004), permitiu observar o tamanho real dos nematocistos (Figura 31). Embora se tenham verificado euryteles e isorhizas de todos os tamanhos na *C. tagi* adulta, o rhopaloid mais frequente apresentou um tamanho médio de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  e o isorhiza de forma oval aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , ou seja, em geral, o tamanho dos isorhiza mostrou ser o dobro dos euryteles (Figura 31). Neste aspecto, os resultados da *C. tagi* novamente não coincidem com os da *C. mosaicus*, na qual os euryteles costumam ser maiores que os isorhizas, chegando os birhopaloids ao triplo do comprimento dos isorhizas (Peach & Pitt, 2005), o que não se verifica na *C. tagi*.

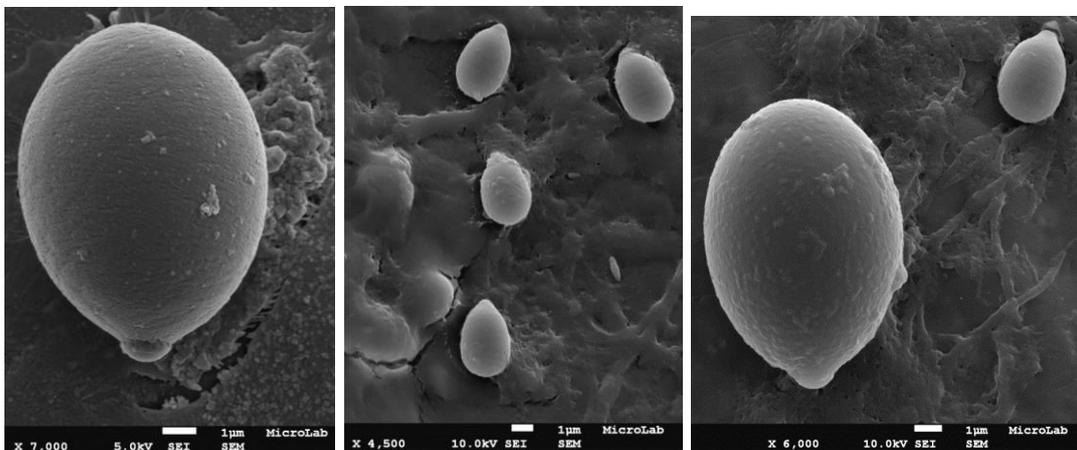


**Figura 31** – Fotomicrografias em MO, com régua, de nematocistos da *C. tagi* sem coloração. Ampliação 1000x. (A) isorhiza, (B) euryteles.

Em resumo pode dizer-se que os nematocistos encontrados na *C. tagi* têm formas semelhantes às relatadas por Peach & Pitt (2005) para a *C. mosaicus*. Contudo, as percentagens relativas dos principais tipos são opostas, assim como os seus tamanhos.

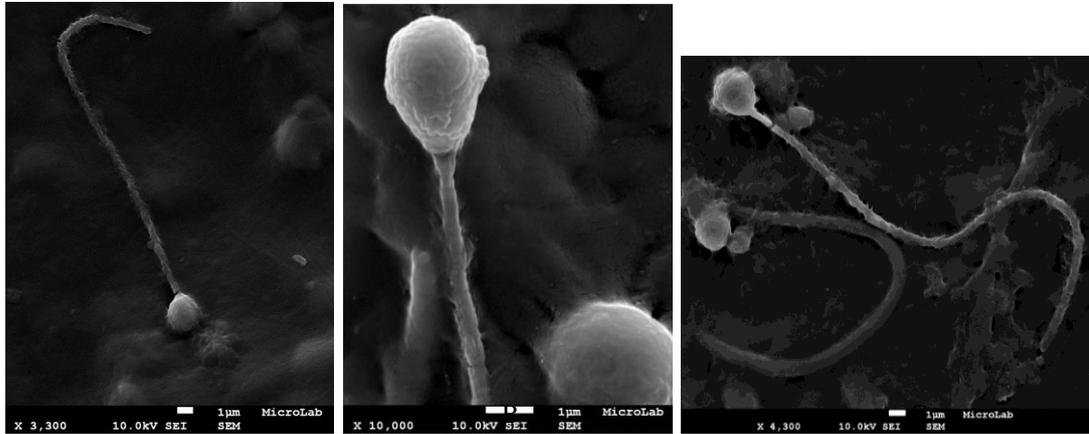
### 3.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

A microscopia de varrimento permitiu visualizar a forma exterior do nematocisto. Quando fechado, observa-se numa das extremidades o opérculo, pequena saliência por onde o túbulo é libertado (Figura 32).



**Figura 32** – Fotomicrografias em MEV, nematocistos fechados da *C. tagi*. Cortesia de I. Nogueira, IST/UTL.

Os nematocistos despoletados detectados neste trabalho apresentaram um comprimento médio de túbulo da ordem dos 25  $\mu\text{m}$ . Aparentemente, poderiam ser do tipo rhopaloid e/ou isorhiza oval e túbulo atrichous mas não foi possível observar diferenças detalhadas entre eles (Figura 33).



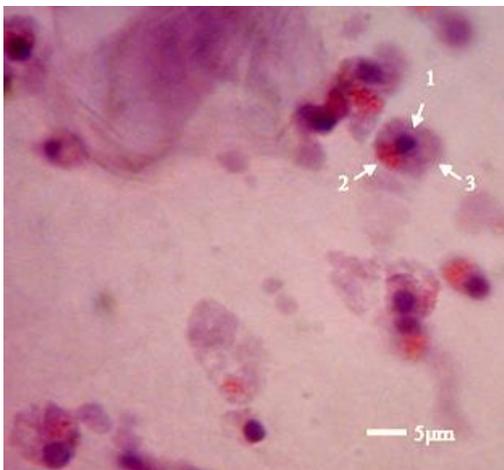
**Figura 33** – Fotomicrografias em MEV, A, B, C, nematocistos despoletados da *C. tagi*. Cortesia de I. Nogueira IST/UTL.

### 3.2 RESULTADOS DAS COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS

Os resultados dos ensaios histoquímicos dos nematocistos, não revelaram diferenças significativas entre os exemplares de *C. tagi* do Tejo e do Sado. Assim, as fotomicrografias a seguir não fazem menção ao local da recolha.

#### 3.2.1 COLORAÇÃO HEMATOXILINA – EOSINA

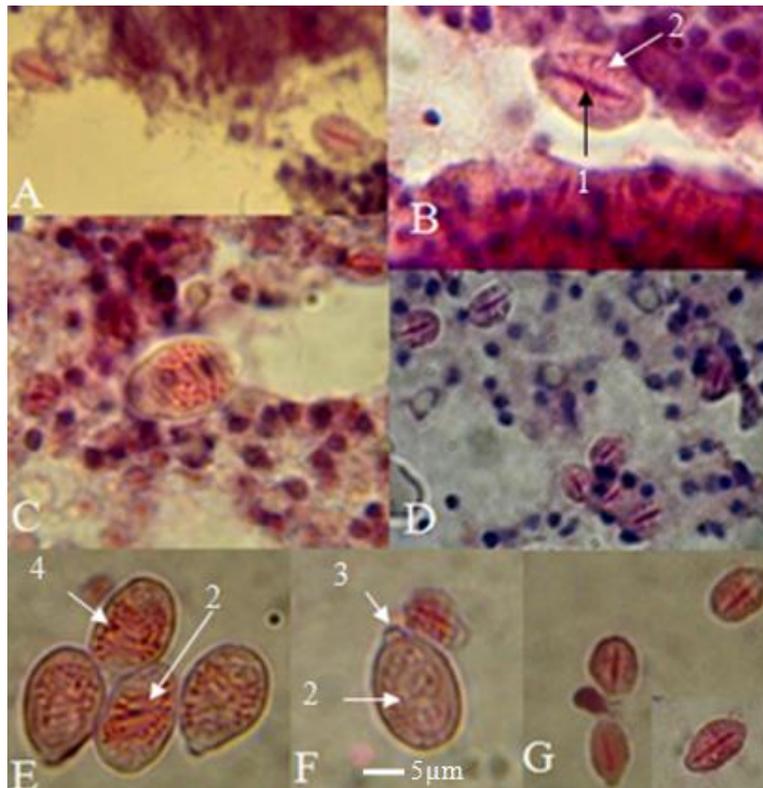
A (figura 34) mostra células do braço da *C. tagi* coradas com hematoxilina- eosina que podem ser nematócitos. Como se vê na célula assinalada, para além do núcleo e do citoplasma, há pequenas estruturas circulares eosinófilas (cor vermelha/ alaranjado) as quais podem ser os nematocistos em formação.



**Figura 34** – Fotomicrografia em MO, braço da *C. tagi* corado com hematoxilina-eosina. Ampliação 1000x.

1-núcleo celular, 2- nematocisto em formação, 3- citoplasma.

Na figura 35 veem-se nematocistos euryteles e isorhizas, distinguíveis pelo seu interior. A cor vermelha intensa no eixo central do eurytele sugere tratar-se de material proteico com características básicas (Figura 35-B). Nos túbulos enrolados dos isorhiza a coloração também é avermelhada (Figura 35-E). Estes resultados são coerentes com a hipótese de que o material do filamento é o mesmo nos euryteles e isorhizas.

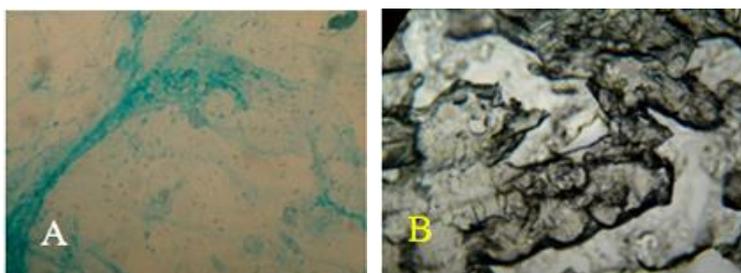


**Figura 35 -**  
Fotomicrografias em MO,  
nematocistos da *C. tagi*  
corados com hematoxilina  
– eosina. Ampliação  
1000x

A, B, C, D, G - euryteles  
C, E, F - isorhizas  
1- eixo central;  
2- túbulo enrolado;  
3-opérculo;  
4-estruturas circulares.

### 3.2.2 COLORAÇÃO ALCIAN BLUE E ALCIAN BLUE – PAS

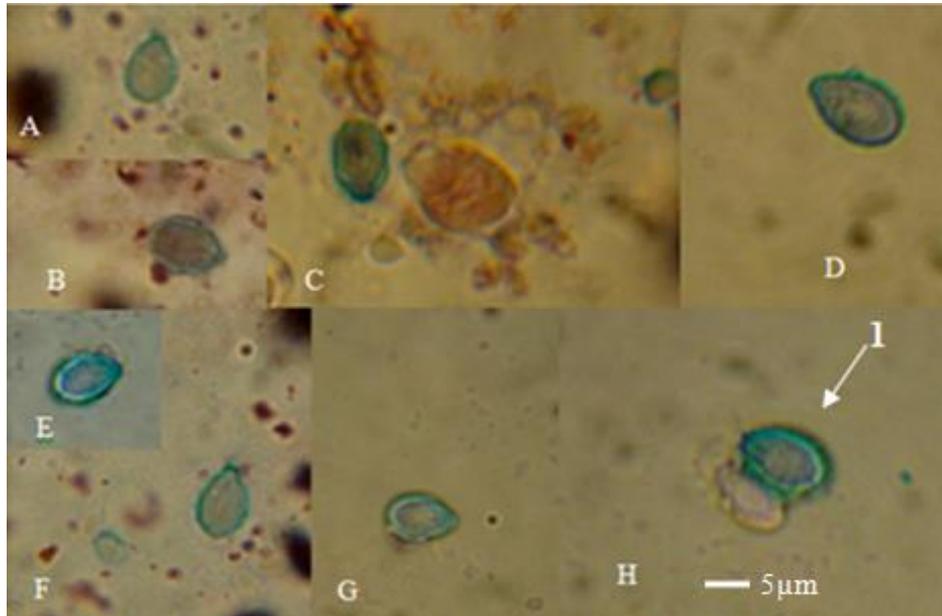
Na técnica do alcian-blue são corados de azul as macromoléculas que contêm glúcidos com grupos carboxilo e/ou sulfato, como as mucinas ácidas, entre outras, (Figura 36).



**Figura 36 –** Fotomicrografias  
em MO, coloração alcian blue,  
testes iniciais.

(A) padrão positivo, saliva  
humana.  
(B) padrão negativo, insulina.

As imagens obtidas para a *C. tagi* mostram uma cor azul intensa, uniformemente distribuída em torno da cápsula do nematocisto, quer seja eurytele ou isorhiza (Figura 37).

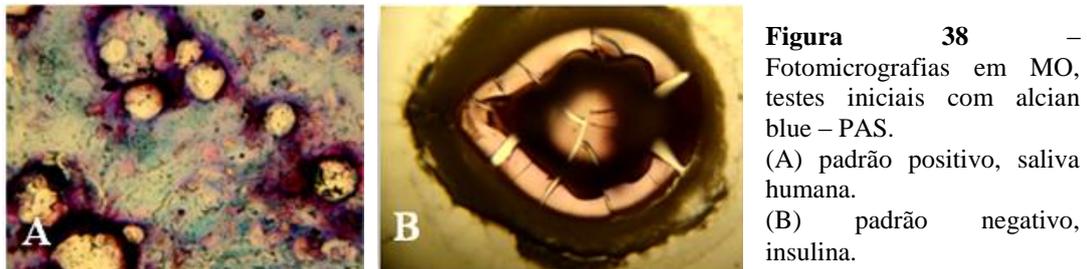


**Figura 37** – Fotomicrografias em MO, euryteles e isorhizas da *C.tagi* corados com alcian-blue. Ampliação 1000x. 1- membrana basófila.

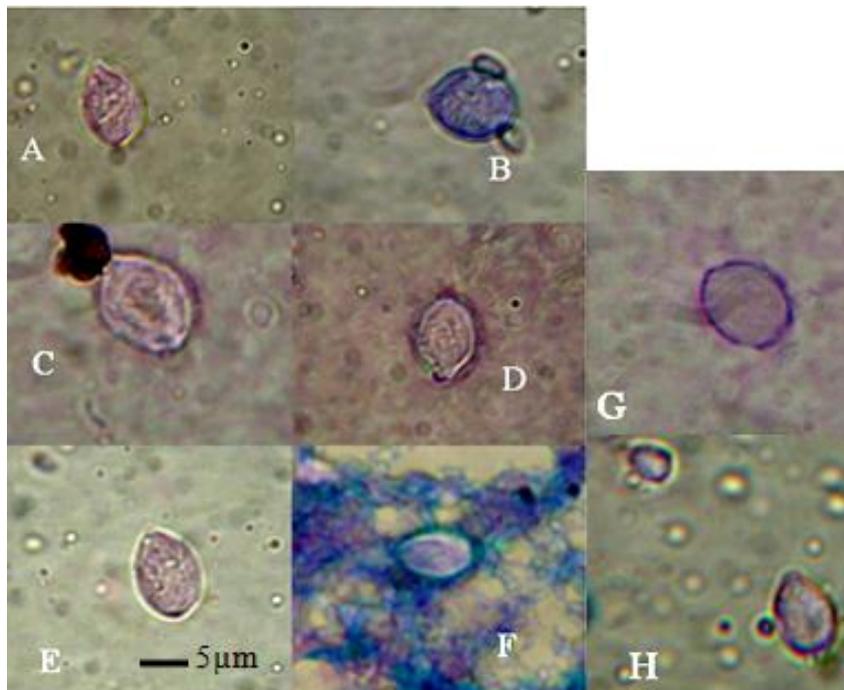
Este resultado indica a presença de uma macromolécula com características aniónicas, a qual poderia ser uma mucina ácida (ou proteoglicano), uma glicoproteína com grupos aniónicos ou um polipéptido/proteína com muitos grupos ácidos (Asp ou Glu). Tendo em conta os componentes já identificados nos nematocistos de outros cnidários e o resultado da coloração alcian blue, verifica-se que o nematocisto da *C. tagi* poderá possuir macromoléculas semelhantes à glicoproteína NOWA, detectada na *Hydra magnipapillata* (Balasubramanian *et al*, 2012), ou à glicoproteína nematogalactina, detectada na *Hydra viridis*, *Hydra oligactis* e *Hydra vulgaris* (Hwang *et al*, 2010) ou ao complexo poli-gama-glutamato ligado à condroitina (Szczepek *et al*, 2002), detectado na *Hydra vulgaris*. É possível ainda que a macromolécula detectada seja um tipo de quitina, com carácter ácido, também já mencionada na literatura dos cnidários (Tibballs *et al*, 2012), tendo-se verificado uma grande semelhança visual entre o resultado do teste alcian blue da *C. tagi* com o obtido por Burketova *et al* (2003) para a quitina.

## COLORAÇÃO DE ALCIAN BLUE-PAS

A figura 38 mostra os resultados obtidos com o alcian blue-PAS para os padrões e a figura 39 mostra os nematocistos da *C. tagi* corados com o mesmo corante.



Como pode ver-se pelas imagens da figura 39, A-H, tanto os euryteles como os isorhizas assumiram uma coloração rosada/magenta uniformemente distribuída por todo o nematocisto. No caso das fotomicrografias B, D, G, H, nota-se também uma coloração azul escura ou púrpura no contorno mais exterior dos nematocistos.

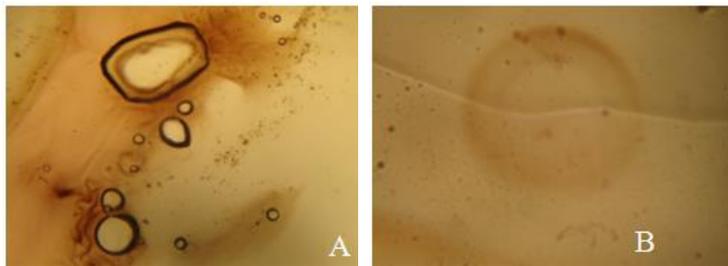


Estes resultados sugerem a existência de duas macromoléculas estruturais, provavelmente proteínas, formando um tipo de membrana dupla em que a mais externa tem características ácidas e a mais interna é neutra. Os estudos realizados em várias espécies de Hydra têm indicado a coexistência, através de ligações reticuladas, das proteínas NOWA e minicolagénios, sendo sugerido que esta é uma combinação típica de todos os cnidários (Balasubramanian *et al*, 2012). Os resultados da *C. tagi*

são concordantes com a proposta destes autores, uma vez que a cor magenta encontrada pode dever-se à reacção dos glúcidos dos minicolagénios com a fucsina.

### 3.2.3 COLORAÇÃO DE VON KOSSA

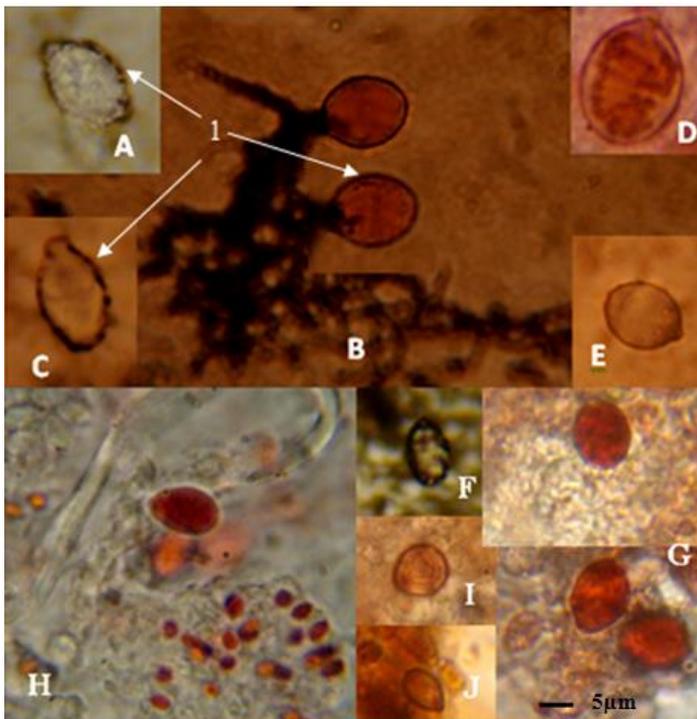
A figura 40 mostra os resultados de Von Kossa para os padrões positivo, caseína, e negativo, insulina, obtidos neste trabalho. Como pode ver-se, a presença do fosfato (cálcio) revela-se através de um precipitado negro.



**Figura 40** -  
Fotomicrografias em MO,  
ensaio de Von Kossa.

(A) padrão positivo,  
caseína  
(B) padrão negativo,  
insulina

Nos nematocistos da *C. tagi*, detectou-se cálcio associado aos túbulos no interior das estruturas mas também, e principalmente, na sua membrana externa (Figura 41). A presença de cálcio na membrana externa sugere interacções electrostáticas entre o cálcio e os aniões (carboxilato ou sulfato) já detectados na membrana externa, pela coloração de alcian blue.

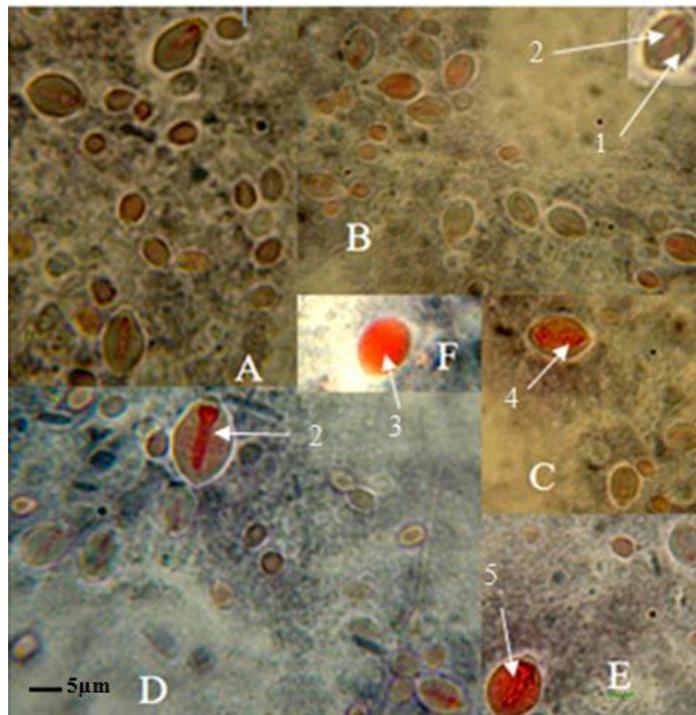


**Figura 41** - Fotomicrografias  
em MO, nematocistos da *C. tagi*  
corados com Von kossa.  
Ampliação 1000x.

1- deposição dos sais de cálcio  
no contorno do nematocisto.

### 3.2.4 COLORAÇÃO TRICRÓMIO DE MASSON

Em humanos, esta coloração revela o tecido conjuntivo corado de vermelho, as regiões verdes indicam colagénio e as negras núcleos. No caso dos nematocistos da *C. tagi*, detectou-se a presença de colagénio, o qual está distribuído principalmente na região interna, como pode ser visualizado na figura 42.



**Figura 42** – Fotomicrografias em MO, nematocistos da *C. tagi* corados com tricrómio de Masson. Ampliação 1000x. (A), (B), (C), (D), (E): euryteles; (F): birhopaloid.

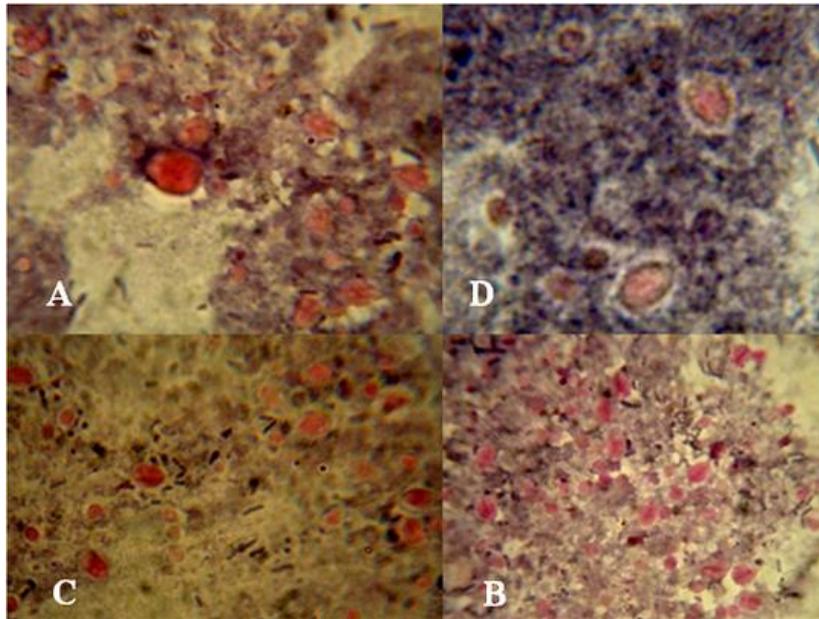
1- material colagénico; 2- eixo central liso; 3- túbulo enrolado preenchendo todo o interior; 4- eixo central com formação em oito; 5- eixo central com pequenos filamentos laterais.

De notar também que o eixo central dos euryteles corou de vermelho. Os isorhizas coram de vermelho os túbulos que os revestem, prejudicando a visualização do interior. Tal como no ensaio hematoxilina-eosina, o eixo central dos euryteles e os túbulos dos isorhizas aparentam ser constituídos do mesmo material proteico, com características básicas, o qual pode assemelhar-se à proteína “spinalin” – rica em histidina (Balasubramanian *et al*, 2012).

### 3.2.5 COLORAÇÃO DE VAN GIESON

A utilização da fucsina ácida e do ácido pícrico, no método de Van Gieson, leva a que o colagénio e materiais proteicos básicos corem de vermelho/rosa e outros

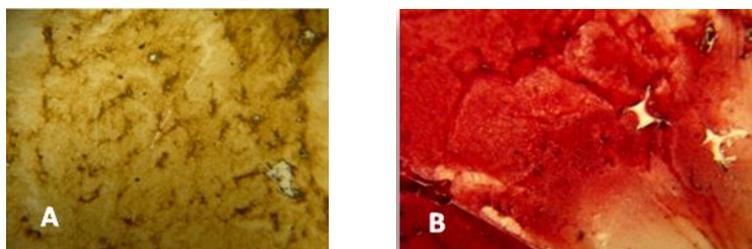
tecidos de amarelo. A figura 43 mostra muitas estruturas localizadas no interior dos nematocistos coradas de rosa, confirmando a presença de material proteico catiónico. Esta técnica, embora menos específica, serviu para confirmar os resultados da coloração de tricrómio de Masson.



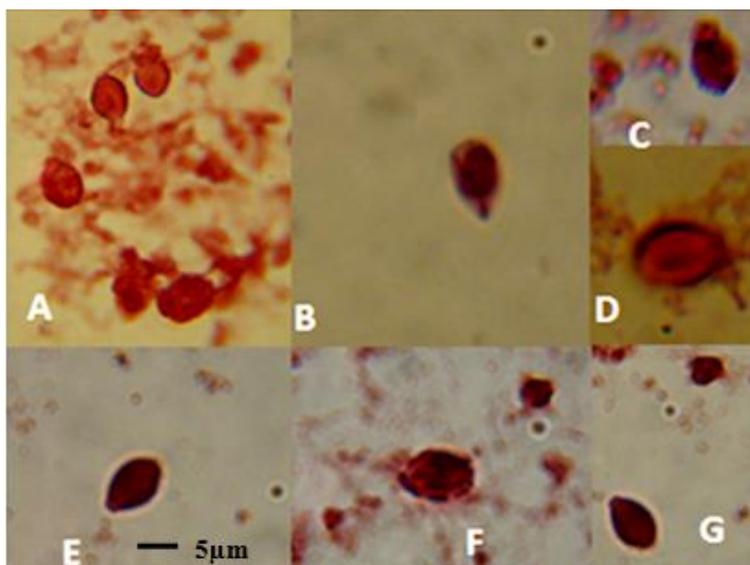
**Figura 43** – Fotomicrografias em MO, nematocistos da *C. tagi* corados com reagente de Van Gieson. Ampliação 1000x.

### 3.2.6 COLORAÇÃO ORCEINA-SHIKATA

O resultado desta técnica, para os nematocistos da *C. tagi*, foi negativo, como se pode verificar pela comparação entre os padrões (Figura 44) e as amostras (Figura 45). Desse modo, concluiu-se que há uma ausência de cobre no interior dos nematocistos, pelo menos numa quantidade detectável pelo método utilizado.



**Figura 44** – Fotomicrografias em MO, ensaio Orceína – Shikata. (A) padrão positivo, superóxido dismutase. (B) padrão negativo, insulina.



**Figura 45** –  
Fotomicrografias em MO,  
nematocistos da *C. tagi*  
corados com orceina-shikata.  
Ampliação 1000x.

### 3.2.7 RESUMO DOS RESULTADOS DAS COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS

A tabela 9 apresenta um resumo dos resultados das colorações histoquímicas.

**Tabela 9** - Resumo dos resultados das colorações histoquímicas dos nematocistos.

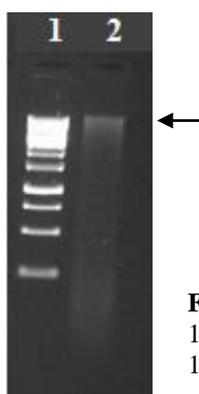
Coloração	Resultados
Hematoxilina- Eosina	- Detectados nematócitos com prováveis nematocistos em formação - Detectado, no sistema de ejeção da toxina, material proteico eosinófilo semelhante à “spinalin”
Alcian Blue	- Detectadas, na membrana exterior, macromoléculas com polissacáridos ácidos compatíveis com as glicoproteínas NOWA e nematogalectina, o complexo de poli-gama-glutamato, ácidos hialurónicos e quitinas ácidas
Alcian Blue – PAS	- Confirmados, na membrana exterior, polissacáridos ácidos - Detectados, na membrana interior, polissacáridos neutros semelhantes a glicosaminoglicanos e a minicolagêneos
Tricrómio de Masson	- Detectado material colagénico no interior, não associado aos túbulos, podendo estar no estado líquido - Confirmado material proteico catiónico nos túbulos, podendo tratar-se da proteína “spinalin”
Van Gieson	- Confirmado material colagénico e/ou proteico catiónico, no interior do nematocisto
Von Kossa	- Detectada a presença de cálcio na membrana exterior da cápsula e nos túbulos
Orceína	- Não foi detectado cobre nos nematocistos

### 3.3 RESULTADOS DO ESTUDO GENÉTICO

Os resultados mostrados a seguir dizem respeito a 3 regiões do DNA, nomeadamente ITS1, 18S rDNA e 28S rDNA, cujas sequenciações parciais foram usadas na comparação de exemplares de *C. tagi* do Tejo e do Sado e destes com as medusas *Catostylus mosaicus*, *Aurelia aurita* e *Cyanea capillata*. As sequências obtidas e seus alinhamentos estão apresentadas no anexo B.

#### 3.3.1 EXTRACÇÃO DO DNA

A extracção do DNA da medusa *C. tagi* exigiu várias repetições, uma vez que não foi fácil atingir uma concentração detectável de DNA genómico, a qual foi possível conseguir unicamente através do procedimento de diálise e liofilização das gónadas. O melhor resultado de extracção foi alcançado a partir do kit E.Z.N.A.® Mollusc DNA. A figura 46 mostra um exemplo do DNA de *C. tagi* do Tejo.



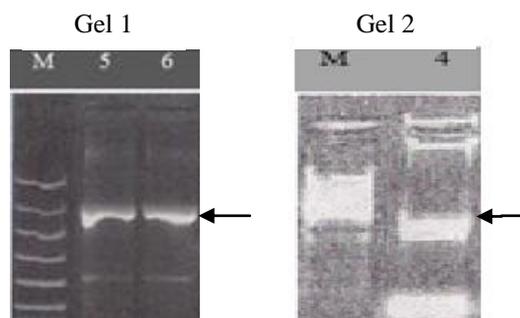
**Figura 46** – Extracção do DNA da *C. tagi*;  
1- GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 2- Amostra *C. tagi* Tejo.

#### 3.3.2 RESULTADOS PARA A REGIÃO 18S

##### 3.3.2.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A amplificação parcial da região 18S foi realizada utilizando os iniciadores apresentados na tabela 6, seguindo o programa de PCR descrito na tabela 8, para as amostras do Tejo e Sado.

Os geis da figura 47 mostram o resultado da amplificação. A seta no gel mostra a banda correspondente à amplificação do DNA que codifica para a região 18S da pequena subunidade ribossomal.



**Figura 47-** Produtos de PCR da região 18S do rDNA da *C. tagi*. Geis de agarose a 1%.  
 Gel 1: M- Marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb; 5 e 6- *C. tagi* do Tejo.  
 Gel 2: M- Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 4- *C. tagi* do Sado.

### 3.3.2.2 SEQUENCIAÇÃO E ANALISE DO FRAGMENTO 18S

Após a obtenção das bandas do produto da amplificação do DNA das amostras de *C. tagi* para a região 18S, procedeu-se à sua sequenciação automática através do equipamento 3730xl DNA Analyzer, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. No caso da *C. tagi* do Tejo, obteve-se uma sequência directa constituída por 282 bases, sendo 55,67% de A-T, 40,42% de G-C e os restantes 3,91% foram relativos aos nucleótidos inespecíficos (N). O número total de adeninas foi de 77, de citosinas 56, de timinas 80, de guaninas 58 e de nucleótidos inespecíficos (N) 10. Relativamente à amostra do Sado, esta apresentou uma sequência directo com 1100 bases, contendo 54,63% de A-T e 43,45% de G-C e os restantes 1,91% foram nucleótidos inespecíficos (N). O número total de adeninas e de timinas foi de 301, de citosinas 195, de guaninas 284 e de nucleótidos inespecíficos 19.

A tabela 10 mostra os resultados encontrados para a região 18S, em número de bases, a partir do iniciador directo, para as amostras do Tejo e do Sado. Tendo em conta os iniciadores utilizados neste trabalho (Bayha *et al*, 2010), esperava-se obter a sequenciação total da região, uma vez que, para as Scyphozoas descritas no artigo em causa, a região amplificada contém entre 1674 a 1775 nucleótidos, o que é concordante com os resultados de comprimento total de 1814 bases publicados para a Scyphozoa *Aurelia sp* (Ki *et al*, 2009). Contudo, relativamente aos resultados da sequenciação da medusa *C. tagi*, resultaram sequências menores que o esperado, sobretudo a amostra do Tejo. No caso da amostra do Sado, a sequenciação foi considerada boa, 1100 pares de bases.

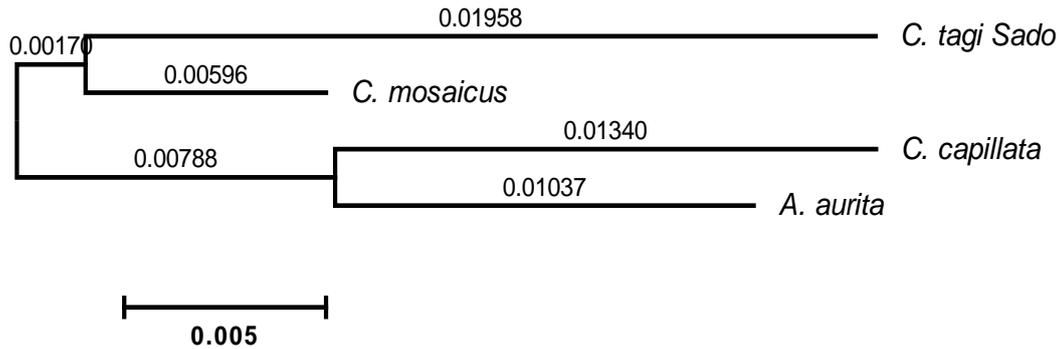
Apesar do pequeno tamanho da sequência da 18S da *C. tagi* do Tejo, testou-se o seu alinhamento com a sequência da *C. tagi* do Sado, através do programa BLAST. O resultado foi uma semelhança de 97%, referente a 200 nucleótidos entre os 207 analisados. Tendo em conta a sequência de consenso da *C. tagi*, efectuou-se a sua comparação com a da *C. mosaicus*, descrita por Bayha *et al* (2010) e disponível na base de dados do NCBI. O resultado foi uma semelhança de 97%, relativamente aos 1030 nucleótidos dos 1065 analisados, tabela 10.

**Tabela 10** – Número de bases da *C. tagi* sequenciadas para a região 18S; alinhamento BLAST entre as *C. tagi* do Tejo e do Sado; alinhamento BLAST da sequência de consenso com a *C. mosaicus*.

INICIADOR TABELA 6, BAYHA <i>ET AL</i> , 2010	<i>C. TAGI</i> LOCAL DE RECOLHA	COMPRIMENTO DO FRAGMENTO EM Nº DE BASES SEQUENCIADAS/Nº DE BASES COM ÍNDICE PHRED Q>20	BLAST <i>C. TAGI</i> TEJO & <i>C. TAGI</i> SADO  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)	BLAST <i>C. TAGI</i> & <i>C. MOSAICUS</i>  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)
Directo	Tejo	282/114	97	97
Directo	Sado	1100/884	(200/207)	(1030/1065)

### 3.3.2.3 ANÁLISE CLADÍSTICA DA REGIÃO 18S

Estudaram-se as relações filogenéticas da *C. tagi* com outras Scyphozoa, nomeadamente *C. mosaicus*, *A. aurita* e *C. capillata*, através da construção do cladograma para a região 18S rDNA (Figura 48). À excepção da *C. tagi*, todas as sequências foram obtidas da base de dados do NCBI. Não foi possível utilizar a sequência da amostra do Tejo para a construção da árvore, pelo facto desta ter ficado muito incompleta; para o efeito, apenas foi considerada a amostra do Sado. A análise envolveu quatro sequências de nucleótidos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. O conjunto final envolveu um total de 1067 posições. A análise foi realizada com o programa MEGA5.1 versão beta 3 (Tamura *et al*, 1969). A tabela 11 sumariza as distâncias entre a *C. tagi* e as outras medusas. O resultado encontrado está de acordo com o esperado, uma vez que a *C. tagi* Sado está agrupada com a *C. mosaicus* e a *C. capillata* com a *A. Aurita*, reflectindo o facto das primeiras pertencerem a uma ordem e as segundas a outra (Figura 48).



**Figura 48** – Cladograma das relações filogenéticas entre a *C. tagi* e outras Scyphozoa relativamente à região 18S do rDNA.

**Tabela 11**– Distâncias entre *C. tagi* e outras Scyphozoa relativamente a 18S rDNA.

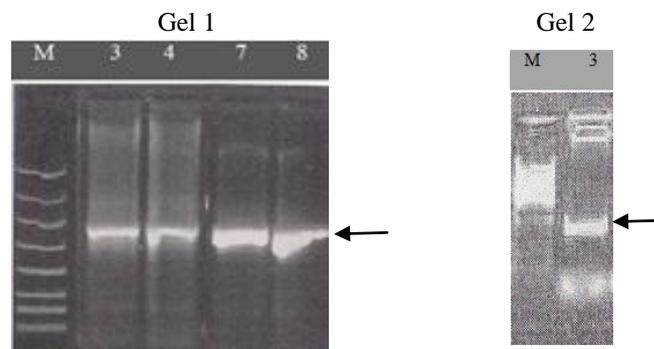
Espécie 1	Espécie 2	Distância
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. mosaicus</i>	0,025
<i>C. tagi Sado</i>	<i>A. aurita</i>	0,038
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. capillata</i>	0,040

### 3.3.3 RESULTADOS PARA A REGIÃO 28S

#### 3.3.3.1 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 28S

A amplificação parcial do 28S rDNA ribossomal da *C. tagi* foi executada com os iniciadores descritos anteriormente na tabela 6. O programa de PCR aplicado foi o descrito na tabela 8.

Os resultados podem ser observados nos géis 1 e 2 da figura 51. No gel 1 - poço 3, foi aplicada a amostra do Sado: a primeira banda corresponde ao fragmento 28S e a segunda banda visível corresponde aos iniciadores. No gel 2, poços 3, 4, 7 e 8, observa-se a banda correspondente à amostra do rio Tejo. As setas nos géis mostram a localização da banda correspondente ao fragmento do 28S rDNA da *C. tagi*.



**Figura 49** – Produtos de PCR da região 28S do rDNA da *C. tagi*. Géis de agarose a 1%. Gel 1: M- Marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder, de 100 a 1000 pb; 3, 4, 7 e 8 – *C. tagi* do Tejo. Gel 2: M- Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder, de 250 a 10000 pb; 3- *C. tagi* do Sado.

### 3.3.3.2 SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DO FRAGMENTO 28S

A medusa *C. tagi* capturada no Sado apresentou, relativamente à região 28S, um número total de 1036 nucleótidos, sendo 46,43% de A-T, 51,54% de G-C e os restantes 2,03% de nucleótidos inespecíficos (N). O número total de adeninas foi de 227, de citosina 306, de timina 254, de guanina 228 e de inespecíficos 20. Com relação à amostra do rio Tejo, esta apresentou um número total de 1021 nucleótidos, dos quais 47% de A-T, 52% de G-C e os restantes 0,7% são inespecíficos. O número total de adeninas foi de 230, de citosinas 307, de timinas 253, de guaninas 224 e de inespecíficos 7.

Relativamente à região 28S, a literatura refere 3606 bases para a *Aurelia* sp (Ki *et al*, 2009). Assim, os iniciadores utilizados neste trabalho (Bayha *et al*, 2010) permitiriam apenas a sequenciação parcial da região 28S, uma vez que os fragmentos descritos para as Scyphozoa estudadas estão entre 927 a 1154 nucleótidos (Bayha *et al*, 2010). Os resultados para a *C. tagi* levaram a 1021 e 1036 bases, o que é concordante com os fragmentos da literatura, (Tabela 12).

Testou-se o alinhamento das duas sequências da *C. tagi*, tendo-se encontrado 99% de similaridade (992 concordantes em 1004 bases testadas). O teste de alinhamento da sequência de consenso da *C. tagi* com a *C. mosaicus* forneceu 90% de similaridade (Tabela 12).

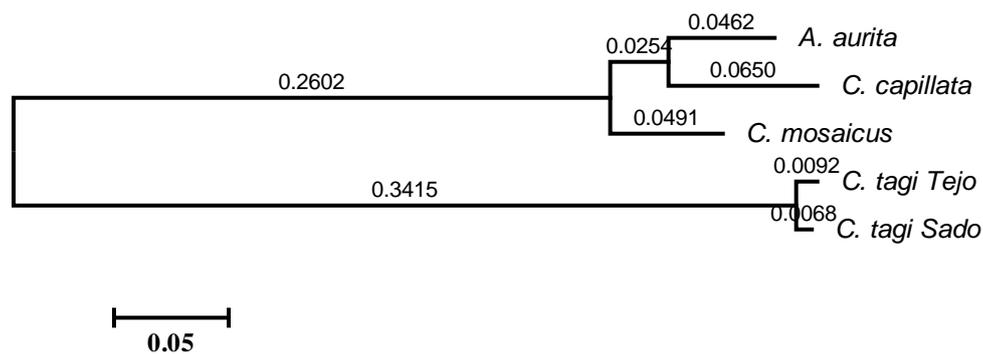
**Tabela 12-** Número de bases da *C. tagi* sequenciadas para a região 28S; alinhamento BLAST entre as *C. tagi* do Tejo e do Sado; alinhamento BLAST da sequência de consenso com a *C. mosaicus*.

INICIADOR TABELA 6, BAYHA ET AL, 2010	<i>C. TAGI</i> LOCAL DE RECOLHA	COMPRIMENTO DO FRAGMENTO EM Nº DE BASES SEQUENCIADAS/ Nº DE BASES COM ÍNDICE PHRED Q>20	BLAST <i>C. TAGI</i> TEJO & <i>C. TAGI</i> SADO  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)	BLAST <i>C. TAGI</i> & <i>C. MOSAICUS</i>  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)
Directo	Tejo	1036/787	99	90
Directo	Sado	1021/898	(992/1004)	(902/1005)

### 3.3.3.3 ANÁLISE CLADÍSTICA DA REGIÃO 28S

A figura 50 mostra o cladograma obtido com o programa MEGA5 (Tamura *et al*, 1969), após a introdução de cinco sequências de nucleótidos e da remoção de todas

as posições que continham lacunas e dados em falta; o conjunto final atingiu um total de 820 posições. Com excepção das sequências da *C. tagi* todas as outras sequências foram retiradas da base de dados do NCBI. Como pode ver-se, a *C. mosaicus* não ficou agrupada no mesmo ramo da *C. tagi*. Este facto pode estar relacionado com a menor homologia apresentada pelas duas medusas nesta região (Tabela 13). Não foi possível comparar a *C. tagi* com outra sequência da *C. mosaicus* na região 28S porque na base de dados só há uma sequência disponível.



**Figura 50**– Cladograma das relações filogenéticas entre a *C. tagi* e outras Scyphozoa relativamente à 28 rDNA.

A tabela 13 parece indicar, pelas distâncias relativamente altas encontradas, que a *C. tagi* pode ter desenvolvido uma especificidade para a região 28S.

**Tabela 13** - Distâncias entre *C. tagi* e outras Scyphozoa relativamente a 28S rDNA.

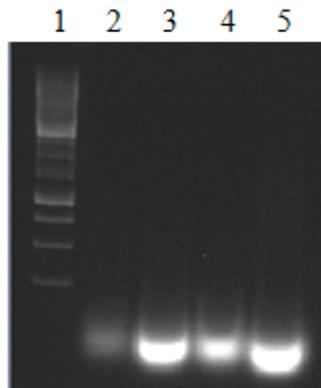
Espécie 1	Espécie 2	Distância
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. tagi Tejo</i>	0,019
<i>C. tagi Sado</i>	<i>A. aurita</i>	0,690
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. mosaicus</i>	0,691
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. capillata</i>	0,691
<i>C. tagi Tejo</i>	<i>A. aurita</i>	0,692
<i>C. tagi Tejo</i>	<i>C. capillata</i>	0,692
<i>C. tagi Tejo</i>	<i>C. mosaicus</i>	0,693

### 3.3.4 RESULTADOS PARA A REGIÃO ITS1

#### 3.3.4.1 AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO DNA DA REGIÃO ITS1

A amplificação da região ITS1 das amostras do Tejo e Sado foi realizada utilizando os iniciadores, directo jfITS1 5f e reverso jfITS 3r da tabela 6, retirados de Dawson (2005b) e com o programa de PCR descrito na tabela 8. Após a amplificação

do DNA das amostras, estas foram submetidas à electroforese em gel de agarose a 0,8% em TAE durante 40 min a 100V/250mA. Em cada poço foi colocado 1µL de DNA da amostra e 3 µL de loading Dye 6X, com excepção do poço 1 onde colocou-se o marcador de peso molecular. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta. Como pode ver-se, no poço 1 da Figura 51, observaram-se várias bandas, conforme o esperado, porém, nos restantes poços apenas foram observados os iniciadores no final do gel.



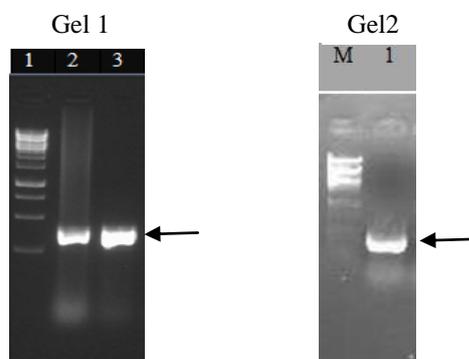
**Figura 51** - Produto de PCR da região ITS1 de amostras do Tejo, 1ª tentativa. Gel de agarose a 0,8% em TAE 1X. 1- Marcador 1kb DNA Ladder; 2 e 3- *C. tagi* Tejo, 1º ensaio; 4 e 5- *C. tagi* Tejo, 2º ensaio.

Por forma a obter-se um resultado positivo, foi realizada uma re-amplificação do produto de PCR com ExoSap na amostra do Tejo - poços 3 e 5 do gel da figura 51. As condições da nova electroforese foram as mesmas do gel anterior.

A figura 52 – gel 1 mostra, no poço 2, a banda da re-amplificação do produto amplificado do poço 3 da figura 51, e, no poço 3, a re-amplificação do produto da PCR do poço 5 da figura 51.

A figura 52 – gel 2, mostra o resultado da amplificação do fragmento do ITS1 rDNA, da amostra do Sado.

As setas nos géis mostram a banda correspondente à amplificação do fragmento de ITS1.



**Figura 52** - Produto de PCR da região ITS1 de amostras do Tejo e Sado. Géis de agarose. Gel 1: 1- Marcador 1kb DNA Ladder; 2- Reamplificação do poço 3 da Fig 51; 3- Reamplificação do poço 5 da Fig 51. Gel 2: M- Marcador 1kb DNA Ladder; 1- *C. tagi* do Sado.

### 3.3.4.2 SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE DO FRAGMENTO ITS1

A medusa *C. tagi* da amostra do Tejo apresentou, relativamente a região ITS1, um número total de 393 nucleótidos, contendo 53,43% de A-T e 46,56% de G-C; não se encontraram nucleótidos inespecíficos. O número total de adeninas foi 90, de citosinas 90, de timinas 120, e de guaninas 93. As amostras do Sado e do Tejo amplificaram o mesmo número total de bases, com o iniciador directo.

No que respeita à região ITS1, a literatura refere que, para os phyllos Cnidaria e Ctenophora, as sequências oscilam entre 118 e 422 nucleótidos sendo os valores de G-C entre 35,8% a 61,7% (Shao, 2006). Visto que os resultados obtidos para as duas amostras da *C. tagi* encontram-se dentro do intervalo proposto, tabela 13, é razoável supor que a sequência obtida representa, efectivamente, a totalidade da região ITS1 da medusa *C. tagi*.

Considerando o BLAST, testou-se o alinhamento das duas sequências da *C. tagi* tendo-se encontrado 99% de similaridade (374 concordantes em 378 bases testadas). O teste de alinhamento da sequência de consenso da *C. tagi* com a *C. mosaicus* forneceu 91% de similaridade *C. tagi* 88-132 e *C. mosaicus* 61-104 e 81% (44/54; *C. tagi* 194-247 e *C. mosaicus* 209-259) (tabela 14).

**Tabela 14** – Número de bases da *C. tagi* sequenciadas para a região ITS1; alinhamento BLAST entre as *C. tagi* do Tejo e do Sado; alinhamento BLAST da sequência de consenso com a *C. mosaicus*.

INICIADOR TABELA 6, DAWSON, 2005B	<i>C. TAGI</i> LOCAL DE RECOLHA	COMPRIMENTO DO FRAGMENTO EM Nº DE BASES SEQUENCIADAS/ Nº DE BASES COM ÍNDICE PHRED Q>20	BLAST <i>C. TAGI</i> TEJO & <i>C. TAGI</i> SADO  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)	BLAST <i>C. TAGI</i> & <i>C. MOSAICUS</i>  % SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES/BASES TESTADAS)
Directo	Tejo	393/380	99  (374/378)	91  (41/45; <i>C. tagi</i> 88-132 e <i>C. mosaicus</i> 61-104)
Directo	Sado	393/357		81  (44/54; <i>C. tagi</i> 194- 247 e <i>C. mosaicus</i> 209- 259)



compatíveis com populações da mesma espécie, tal como sucedeu com as análises morfológica e histoquímica. O facto da região 18S ter apresentado o valor mais baixo de similaridade, 97%, pode dever-se à qualidade da sequenciação (% Q > 20), que foi também a mais baixa das três regiões.

**Tabela 16** – Similaridade entre as *C. tagi* do Tejo e do Sado e da sequência de consenso com a *C. mosaicus*, nas regiões estudadas.

Comparação	18S	28S	ITS1
	% SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES / BASES TESTADAS)	% SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES / BASES TESTADAS)	% SIMILARIDADE (BASES COINCIDENTES / BASES TESTADAS)
<i>C. tagi</i> Tejo e Sado	97 (200/207)	99 (992/1004)	99 (374/378)
<i>C. tagi</i> e <i>C. mosaicus</i>	90 (902/1005)	90 (902/1005)	91 (41/45; <i>C. tagi</i> 88-132 e <i>C. mosaicus</i> 61-104)
			81 (44/54; <i>C. tagi</i> 194-247 e <i>C. mosaicus</i> 209-259)

A similaridade da *C. tagi* com a *C. mosaicus* foi bastante inferior, o que também era esperado pois são espécies diferentes (Tabela 16). Contudo, ao observar-se a tabela 17, que mostra o resumo das distâncias filogenéticas entre as medusas em estudo, verifica-se que, na comparação global das distâncias, a *C. mosaicus* é a que tem a menor distância da *C. tagi*, seguida da *A. aurita* e por último da *C. capillata*. Estes resultados são concordantes com o esperado, uma vez que a *C. mosaicus* é uma Rhizostomeae, tal como a *C. tagi*, enquanto as outras medusas pertencem à ordem Semaestomeae, o que também se verifica através das árvores construídas (Figuras. 48, 50 e 53).

**Tabela 17** - Distâncias entre as *C. tagi* do Tejo & Sado e outras medusas.

Espécie 1	Espécie 2	18S	28S	ITS1
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. tagi Tejo</i>	-	0,019	0,015
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. mosaicus</i>	0,025	0,691	0,451
<i>C. tagi Sado</i>	<i>A. aurita</i>	0,038	0,690	0,378
<i>C. tagi Sado</i>	<i>C. capillata</i>	0,040	0,691	0,561

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste tópico pretendeu-se compilar os principais resultados das três áreas estudadas e reflectir sobre as perguntas que se puseram e que podem contribuir para indicar os caminhos a seguir na continuação da investigação sobre a *C. tagi*.

Tendo em conta a distribuição dos nematocistos, verificou-se que estes ocorrem sobretudo nas zonas periféricas dos braços e que há uma predominância de euryteles em relação aos isorhizas, no estágio de vida adulta da medusa. Estes resultados são muito diferentes dos da *C. mosaicus*, cuja literatura indica prevalência dos isorhizas. Uma possibilidade de continuação dos estudos morfológicos seria investigar a variação do tipo de nematocistos ao longo do ciclo de vida da *C. tagi*.

No que toca à constituição química dos nematocistos intactos, o estudo realizado, através de colorações histoquímicas, proporcionou informações importantes sobre os componentes estruturais, nomeadamente a cápsula que contém a toxina e dos túbulos de ejeção da toxina. Todavia, a estrutura da(s) toxina(s) da medusa *C. tagi* permanece por esclarecer, assim como a da maioria das Scyphozoa, apesar do grande esforço de investigação nos últimos anos (Weston *et al*, 2013).

Em relação às comparações genéticas, obtiveram-se resultados satisfatórios e úteis. Com eles foi possível confirmar a similaridade dos exemplares do Tejo e Sado (Tabela 16), comprovando os resultados anteriores de morfologia e histoquímica, pelo que, considera-se que são a mesma espécie. Também com as sequências de 18S, 28S e ITS1 foi possível constatar que, entre as três Scyphozoa estudadas, a *C. mosaicus* é a medusa mais próxima da *C. tagi*, tal como se previa.

Por outro lado, as tentativas de sequenciação parcial do DNA mitocondrial da *C. tagi* não resultaram. Na continuação dos estudos genéticos, novos iniciadores deverão ser ensaiados para o COI mtDNA, por exemplo os referidos no recente trabalho de Machida *et al.* (2012). Além disso, com a experiência agora adquirida, seria interessante alargar o estudo morfológico e genético a outras medusas do género *Catostylus* que ocorrem no Atlântico e que são pouco conhecidas (Tabela 1).

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Balasubramanian, P. G., Beckmann, A., Warnken, U., Schnölzer, M., Schüler, A., Bornberg-Bauer, E., Holstein, T., & Özbek, S. (2012). "Proteome of Hydra nematocyst". *Journal of Biological Chemistry*, **287**: 9672-9681.
- Bayha, K. M., Dawson, M. N., Collins, A. G., Barbeitos, M. S., & Haddock, S. H. (2010). Evolutionary relationships among scyphozoan jellyfish families based on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18S and 28S ribosomal DNA. *Integrative and comparative biology*, *50*(3), 436-455.
- Beckmann, A. e Özbek, S. (2012). "The Nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle". *Int. J. Dev. Biol.* **56**: 577-582.
- Birsa, L. M., Verity, P. G., & Lee, R. F. (2010) "Evaluation of the effects of various chemicals on discharge of and pain caused by jellyfish nematocysts", *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, **151**(4), pp. 426–30.
- Bosshard, P. P., Abels, S., Zbinden, R., Böttger, E. C., & Altwegg, M. (2003). Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *Journal of clinical microbiology*, *41*(9), 4134-4140.
- Brinkman, D. L., Aziz, A., Loukas, A., Potriquet, J., Seymour, J., & Mulvenna, J. (2012) "Venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*", *PloS one*, **7**(12), e47866.
- Caceci, T. (2008) "Regional College of Veterinary Medicine" University of Maryland, USA. *Veterinary Histology*. Consultado em 1 de Abril, 2013,  
Disponível em <http://www.vetmed.vt.edu/education/Curriculum/VM8054/VM8054HP.HTM>  
[www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/labs/lab2/examples](http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/labs/lab2/examples)
- Calejo, M. T., Morais, Z. B., & Fernandes, a I. (2009) "Isolation and biochemical characterisation of a novel collagen from *Catostylus tagi*", *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, **20**(14), pp. 2073–87.
- Calejo, M. T. R. (2009). "Colagénio da *Catostylus tagi* como matriz polimérica destinada à veiculação de fármacos proteicos", Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.  
Disponível em <http://hdl.handle.net/10451/2619>
- Carr, E. F., & Pitt, K. a. (2008) "Behavioural responses of zooplankton to the presence of predatory jellyfish", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **354**(1), pp. 101–110.
- Carrette, T., Alderslade, P., & Seymour, J. (2002) "Nematocyst ratio and prey in two Australian cubomedusans, *Chironex fleckeri* and *Chiropsalmus sp.*", *Toxicon*, **40**(11), pp. 1547–1551.
- Cuiping, L., Pengcheng, L., Jinhua, F., Rongfeng, L., & Huahua, Y. (2012) "Cytotoxicity of the venom from the nematocysts of jellyfish *Cyanea nozakii Kishinouye*" *Toxicology and industrial health*, **28**(2), pp. 186–92.

- Dawson, M N, Raskoff, K. a, & Jacobs, D. K. (1998) “Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses” *Molecular marine biology and biotechnology*, **7**(2), pp. 145–52. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11541322>
- Dawson, M. N. (2005a). Five new subspecies of Mastigias (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) from marine lakes, Palau, Micronesia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **85**(03), 679-694.
- Dawson, Michael N. (2005b) “Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia”, *Journal of Biogeography*, **32**(3), pp. 515–533.
- Dedavid, B. A., Gomes, C. I., Machado, G. (2007) “Microscopia electronica de varredura aplicações e preparação de amostras”, P. Alegre, (Ed.), pp. 8–58.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment". *Genome Res.* **8** (3): 175–185.
- Fautin, D. G. (2009) “Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae”, *toxicon : official journal of the International Society on toxinology*, **54**(8), pp. 1054–64.
- Ferreira, C. G. (2010) “Histopatologia Aplicada a Ensaios Ecotoxicológicos com Anémonas-do-mar”. Tese de Mestrado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Consultado em 31 de Março, 2013.  
Disponível em <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/3985/1/4601.pdf>
- Fonseca, V. G., Nichols, B., Lallias, D., Quince, C., Carvalho, G. R., Power, D. M., & Creer, S. (2012) “Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses”, *Nucleic acids research*, **40**(9), pp. e66.
- Hall, B. (2013). “Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA”. *Mol Biol Evol* **30** (5): 1229-1235.
- Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2009) “The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery” *Current opinion in pharmacology*, **9**(2), pp. 173–6.
- Howard, D. W. & Smith, C. S. (1983). “Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks”, National Marine Fisheries Service, US Department of Commerce, pp. 97.
- Jukes TH & Cantor CR. (1969) “Evolution of protein molecules”, In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York., pp. 21–132.
- Junqueira, L. C. & CRNAeiro, J. (2004) “Histologia Básica”, G. Koogan, (Ed.).
- Kariotoglou, D. M., & Mastronicolis, S. K. (2001) “Sphingophosphonolipids, phospholipids, and fatty acids from aegean jellyfish *Aurelia aurita*”, *AOCS Press*, **36**(11), pp. 1255–1264.
- Kessler, I. (2013). “Histology Lecture Review”. Página pessoal. Consultada em 26/08/2013. Disponível em <http://home.cse.edu/~ikessler/pics/basicfucfsin.gif>

- Ki, Jang-Seu, Kim, I.-C., & Lee, J.-S. (2008) “Comparative analysis of nuclear ribosomal DNA from the moon jelly *Aurelia sp.1* (Cnidaria: Scyphozoa) with characterizations of the 18S, 28S genes, and the intergenic spacer (IGS)”, *Hydrobiologia*, **616**(1), pp. 229–239.
- Kibbe, W. A. (2010) “oligo calculator version 3.26”. Consultado em 27 de Abril de 2013. Disponível em <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.htm>
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. A., & Powell, E. N. (2006). *Histological techniques for marine bivalve molluscs: update*. Center for Coastal Monitoring and Assessment (CCMA), NOAA/NOS/NCCOS.
- Kimura, S., Miura, S., & Park, Y.-H. (1983) “Collagen as the major edible component of jellyfish (*Stomolophus nomurai*)”, *Journal of Food Science*, **48**(6), pp. 1758–1760.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013) “Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR iniciadores for classical and next-generation sequencing-based diversity studies”, *Nucleic acids research*, **41**(1), pp. e1-e1..
- Kramp, P. L. (1961) “Synopsis of the Medusae of the World”, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, pp. 40–469. Consultado em 27 de Fevereiro 2013. Disponível em [http://www.mba.ac.uk/nmb/publications/jmba\\_40/jmba\\_40.htm](http://www.mba.ac.uk/nmb/publications/jmba_40/jmba_40.htm)
- Li, R., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Qing, Y., Li, K., ... & Li, P. (2012).”Isolation, identification and characterization of a novel antioxidant protein from the nematocyst of the jellyfish *Stomolophus meleagris*”. *International Journal of Biological Macromolecules*, **51**: 274-278.
- López de Haro, M. S., Salgado, L. M., David, C. N., & Bosch, T. C. (1994) “Hydra tropomyosin TROP1 is expressed in head-specific epithelial cells and is a major component of the cytoskeletal structure that anchors nematocytes”, *Journal of cell science*, **107** ( Pt 6), pp. 1403–11. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962184>
- Machida, R. J., & Knowlton, N. (2012) “PCR iniciadores for metazoan nuclear 18S and 28S ribosomal DNA sequences”, *PloS one*, **7**(9), pp. e46180.
- MarBEF. (2004) “European node of the ocean biogeographic information system”, Consultado em 27 de Fevereiro, 2013. Disponível em <http://www.marbef.org/data/aphia.php?p=taxdetails&id=135296>
- Mariottini, G. L., & Pane, L. (2010) “Mediterranean jellyfish venoms: a review on scyphomedusae” *Marine drugs*, **8**(4), pp. 1122–52.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., & Grassé, P. P. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale* (Vol. 345). Paris: Masson.
- Meloan S. N., Puchtler, H. (1985). “Chemical mechanisms of staining methods: von Kossa’s technique”. *J Histotechnol* **8**:11–13.
- Mitra, S., Stärk, M., & Huson, D. H. (2011) “Analysis of 16S rRNA environmental sequences using MEGAN”. *BMC genomics*, **12** Suppl 3, pp. S17.

- Morais Z. B. (2006). "Procedimento para a conservação de medusas utilizáveis para fins alimentares". Patente Portuguesa, PT103156, 7 páginas.
- Morais, Z. B., Pintão, A. M., Costa, I. M., Calejo, M. T., Bandarra, N. M., & Abreu, P. (2009). Composition and In Vitro Antioxidant Effects of Jellyfish *Catostylus tagi* from Sado Estuary (SW Portugal). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 90–107.
- Morais, Z. & Raposo, A. (2012) “Procedimento de congelação, descongelação e cozedura da medusa *Catostylus tagi* para subsequente utilização como produto alimentar”. Pedido de Patente Portuguesa nº106389, Portugal, 9 páginas.
- Morais, Z. & Soeiro, R. (2012) “Processo para obtenção de compostos com actividade anti-hipertensora a partir da medusa *Catostylus tagi*”. Pedido de Patente Portuguesa nº106423, Portugal, 12 páginas.
- Moran, Y., Praher, D., Schlesinger, A., Ayalon, A., Tal, Y., & Technau, U. (2013). “Analysis of Soluble Protein Contents from the Nematocysts of a Model Sea Anemone Sheds Light on Venom Evolution”. *Marine Biotechnology*, 1-11.
- Ostman, C ; Hydman, J. (1997) “Nematocyst analysis of *Cyanea capillata* and *Cyanea lamarckii* (Scyphozoa, Cnidaria)”, *Scientia Marina*, **61**(3), pp. 313–344.
- Ostman, C. (2000) “A guideline to nematocyst nomenclature and classification , and some notes on the systematic value of nematocysts”, *Scientia Marina*, **64**(1), pp. 31–46.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., & Holstein, T. W. (2009) “Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, **54**(8), pp. 1038–45.
- Pearson, R., Tellam, R., Xu, B., Zhao, Z., Willcox, M., & Kongsuwan, K. (2011).”Isolation, biochemical characterization and anti-adhesion property of mucin from the blue blubber jellyfish (*Catostylus mosaicus*)”. *Bioscience*, 2(4).
- Pitt, K. A. (2000) “Life history and settlement preferences of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* ( Scyphozoa : Rhizostomeae )”, *Marine Biology*, **136**(2), pp. 269–279.
- Pitt, K. a, & Kingsford, M. J. (2003) “Temporal variation in the virgin biomass of the edible jellyfish, *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae)”, *Fisheries Research*, **63**(3), pp. 303–313.
- Peach, M. B., & Pitt, K. A. (2005) “Morphology of the nematocysts of the medusae of two scyphozoans, *Catostylus mosaicus* and *Phyllorhiza punctata* (Rhizostomeae): implications for capture of prey”, *Invertebrate Biology* **124**(2), pp. 98–108.
- Pitt, K. A., Clement, A.-L., Connolly, R. M., & Thibault-Botha, D. (2008) “Predation by jellyfish on large and emergent zooplankton: Implications for benthic–pelagic coupling” *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **76**(4), pp. 827–833.
- Quesada, M. A., & Mathies, R. A. (1992) “DNA Sequencing Using Capillary Array Electrophoresis”, *Analytical Chimestry*, **64**(18), pp. 2149–2154.

- Richardson, A. J., Bakun, A., Hays, G. C., & Gibbons, M. J. (2009) “The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future” *Trends in ecology & evolution*, **24**(6), pp. 312–22.
- Russell Myers, P. D., & Leica Biosystems, Wetzlar, G. (2009) “Special stain techniques for the evaluation of mucins” *Leica Biosystems*. Consultado em 5 de Abril, 2013. Disponível em <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>
- Saldanha, L. (1997). “Fauna submarina Atlântica: Portugal continental, Açores e Madeira, E. Europa - América, (Ed.) pp. 364.
- Satori, C. P., Kostal, V., & Arriaga, E. A. (2012) “Review on recent advances in the analysis of isolated organelles” *Analytica chimica acta*, **753**, pp. 8–18.
- Shao, Z., Graf, S., Chaga, O. Y., & Lavrov, D. V. (2006) “Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase” *Gene*, **381**, pp 92–101.
- Shikata, T., Uzawa, T., Yoshiwara, N., Akatsuka, T., and Yamazaki, S. (1974). Staining methods of Australia antigen in paraffin section. Detection of cytoplasmic inclusion bodies. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, **44**,25-36.
- Szczepanek, S., Cikala, M., & David, C. N. (2002). “Poly- $\gamma$ -glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in *Hydra*”. *Journal of cell science*, **115**(4), 745-751.
- Stephenson, T. A. (2009) “On the Nematocysts of Sea Anemones” *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **16**(1), pp. 173.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011) “MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods” *Molecular biology and evolution*, **28**(10), pp. 2731–9.
- Tibballs, J., Li, R., Tibballs, H. A., Gershwin, L. A., & Winkel, K. D. (2012). “Australian carybdeid jellyfish causing “Irukandji syndrome””. *Toxicon*, **59**(6), 617-625.
- Thorington, G. U., & Hessinger, D. a. (1988) “Control of Cnida Discharge: I. Evidence for Two Classes of Chemoreceptor”, *Biological Bulletin*, **174**(2), pp. 163.
- Wako-chem (2013). Catálogo de reagentes para histoquímica. Consultado em 30/08/2013. Disponível em <http://www.wako-chem.co.jp/english/labchem/journals/pathology2013/index.html#G-1>
- West, E. J., Welsh, D. T., & Pitt, K. A. (2009). “Influence of decomposing jellyfish on the sediment oxygen demand and nutrient dynamics”. *Hydrobiologia*, **616**: 151-160.
- Weston, A. J., Chung, R., Dunlap, W. C., Morandini, A. C., Marques, A. C., Moura-da-Silva, A. M., ... & Long, P. F. (2013). “Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*”. *Toxicon* **71**: 11-17.
- Wiebring, A., Helmholz, H., Lassen, S., Prange, A., & Jarms, G. (2010 a) “A new

- method for the separation of different types of nematocysts from scyphozoa and investigation of proteinaceous toxins utilizing laser catapulting and subsequent mass spectrometry” *Marine biotechnology* (New York, N.Y.), **12**(3), pp. 308–17.
- Wiebring, A., Helmholz, H., Lassen, S., Prange, A., & Jarms, G. (2010 b) “Separation and analysis of different types of nematocysts from *Cyanea capillata* (L.) medusa”, *Hydrobiologia*, **645**(1), pp 203–212.
- Wiltshire, C. J., Sutherland, S. K., Fenner, P. J., & Young, A. R. (2000) “Optimization and preliminary characterization of venom isolated from 3 medically important jellyfish: the box (*Chironex fleckeri*), Irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish”, *Wilderness & environmental medicine*, **11**(4), pp. 241–50.  
Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199528>
- Woese, C. R. (1987). “Bacterial evolution”. *Microbiological reviews*, **51**(2), 221.
- Zymo research. (n.d.). DNA purification kit. Consultado em 2 de Abril, 2013.  
Disponível em <http://www.zymoresearch.com/DNA-purification/genomic-DNA/cell-soft-tissue-DNA/quick-gDNA-miniprep>

## **ANEXO A PROCEDIMENTOS DE HISTOQUÍMICA**

**Nota:** em todas as colorações usou-se água de grau analítico ( $< 1,0 \mu\text{S/cm}$  a  $20^\circ\text{C}$ ). Após a preparação, as lâminas foram montadas com Entellan®, produto Merck ref 1079610100.

### **1-COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA –EOSINA (adaptado de Martoja *et al*, 1967)**

Pequenas amostras de tecido da extremidade dos braços da medusa foram dissecadas e processadas segundo o procedimento desenvolvido pelo IPIMAR, descrito a seguir.

#### **Fixação em bloco de parafina (Processador Leica TP1020)**

1. Formaldeído 1 h
  2. Etanol 70% v/v° 1 h
  3. Etanol 95% v/v 1 h
  4. Etanol 95% v/v 1 h
  5. Etanol 100% 2 h
  6. Etanol 100% 2 h
  7. Etanol 100% 2 h
  8. Xileno 2 h
  9. Xileno 2 h
  10. Xileno 2 h
- Total 16 h

Para a inclusão das peças na parafina fundida ( $58 - 60^\circ\text{C}$ ), utilizaram-se moldes de Leuckart.

Os cortes foram efectuados com  $5 \mu\text{m}$  de espessura, num micrótomo Leica 5M 2000 R.

A aplicação dos cortes na lâmina foi precedida de banho-maria ( $20^\circ\text{C}$ ) em uma solução de albumina e glicerol. Após a aplicação secou-se a lâmina a  $58^\circ\text{C}$  durante pelo menos 30 minutos.

#### **Protocolo de coloração H&E**

1. Desparafinação, 15 min
2. Hidratação, 5 min
3. Imersão em solução de hematoxilina de Gill 2 (ref Sigma GHS-2), 30 s
4. Lavagem com água, 20 s
5. Lavagem com HCl 1% v/v em etanol 70% v/v, 2 s
6. Lavagem com água morna, 1 min
7. Lavagem com etanol 70% v/v, 2 s
8. Imersão em solução de eosina Y alcoólica com floxina (ref Sigma HT110-3), 2 min
9. Desidratação (etanol 95% v/v - etanol 100%), 5 min
10. Clarificação com xileno e montagem em Entellan®

**Resultado:** A hematoxilina liga-se a compostos basófilos corando-os de violeta. A eosina liga-se principalmente a estruturas acidófilas corando-as de rosa. Em amostras celulares, os núcleos surgem em violeta-azul e o citoplasma em rosa ou lilás.

## **2-COLORAÇÃO ALCIAN BLUE** (adaptado de Howard & Smith, 1983).

Foi feito um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

A solução de alcian blue\* foi adicionada sobre toda a amostra, cobrindo-a, e assim permaneceu durante 1 hora. Após esse tempo precedeu-se à lavagem da lâmina com água. Contrastou-se com vermelho neutro\*\* por 5 segundos e voltou-se a lavar a lâmina com água. A seguir procedeu-se à desidratação da amostra passando-a por etanol a 96% e por etanol absoluto, durante 2 minutos cada, clarificou-se com xileno durante 15 minutos e procedeu-se à montagem da lâmina com Entellan®.

\* Preparação do reagente alcian blue: dissolveu-se 0,5g de alcian blue (ref Sigma A-3157) em água, adicionou-se 3 mL de ácido acético glacial, completou-se o volume a 100 mL e ajustou-se o pH a 2,5 com ácido acético. Filtrou-se a solução e adicionou-se um cristal de timol (ref Sigma T-0501), como preservativo. A solução foi armazenada ao abrigo da luz por não mais de 1 semana.

\*\* Dissolveu-se 1,0 g de vermelho neutro (ref Sigma 861251) em 100 mL de água. A solução foi armazenada ao abrigo da luz por não mais de 1 semana.

**Resultado:** Macromoléculas com grupos carboxilo e/ou sulfato, como os mucopolissacáridos ácidos, coram-se em azul.

## **3-COLORAÇÃO ALCIAN BLUE-PAS** (adaptado de Howard & Smith, 1983).

Preparou-se um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

Colocou-se a lâmina na solução de alcian blue durante 30 minutos. Após esse tempo, lavou-se a lâmina com água e passou-se a lâmina em ácido periódico (ref

Sigma 375910) a 1% p/v, durante 5 minutos. Seguidamente lavou-se suavemente a lâmina com água durante 1 minuto, a fim de remover todo o ácido. Após a lavagem, colocou-se o reagente de Schiff\* por cima da amostra e deixou-se o conjunto em repouso durante 15 minutos.

A seguir lavou-se suavemente a lâmina com água, durante 1 minuto, e procedeu-se à desidratação da amostra passando-a por etanol a 96% e por etanol absoluto, durante 2 minutos cada. Clarificou-se com xileno, durante 15 minutos, e procedeu-se à montagem da lâmina com Entellan®.

\* Preparação do reagente de Schiff: dissolveu-se 0,25 g de fucsina básica (ref Sigma 857343) em 100 mL de água, com agitação e aquecimento mas sem ferver. A seguir adicionou-se 2,25 g de metabissulfito de potássio (ref Sigma P2522) e 2,5 mL de ácido clorídrico 0,25 M e 0,5 g de carvão activado. Agitou-se por 5 minutos e filtrou-se.

**Resultado:** Mucopolissacáridos neutros, glicoproteínas e glicogênio coram-se em vermelho magenta. As mucinas ácidas tornam-se azul-escuro ou púrpura.

#### **4-COLORAÇÃO VON KOSSA** (adaptado de Howard & Smith, 1983).

Preparou-se um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

Após a execução do esfregaço, cobriu-se a lâmina uma solução de nitrato de prata a 5% p/v e expô-se o conjunto à luz solar intensa durante 35 minutos. A seguir lavou-se a lâmina com água e recobriu-se-a com uma solução de tiosulfito de sódio a 5% p/v por 5 minutos. Seguidamente lavou-se a lâmina com água e aplicou-se-lhe o contraste cobrindo-a com uma solução de vermelho neutro\* durante 5 segundos.

A seguir lavou-se a lâmina com água, durante 1 minuto, e procedeu-se à desidratação da amostra passando-a por etanol a 95% e por etanol absoluto, durante 2 minutos cada. Clarificou-se com xileno, durante 10 minutos, e procedeu-se à montagem da lâmina com Entellan®.

\* Solução de vermelho neutro: pesou-se 0,1 g de vermelho neutro (ref Sigma 861251), 5 g de sulfato de alumínio (ref Sigma A7523) e dissolveu-se em 100 mL de água. A solução foi armazenada ao abrigo da luz por não mais de 1 semana.

**Resultado:** Regiões ricas em cálcio coram-se em preto.

#### **5-COLORAÇÃO TRICRÓMIO DE MASSON** (adaptado de Kim *et al*, 2006)

Preparou-se um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

Cobriu-se a lâmina com a hematoxilina de Weigert\* durante 5 minutos; após a coloração lavou-se com água por 1 minuto. Corou-se a lâmina com a solução Ponceau xylidine - fucsina ácida\*\* durante 5 minutos. Após a coloração lavou-se a lâmina com água. Fez-se a diferenciação com ácido fosfomolibdico\*\*\* durante 1 minuto. Lavou-se com água e fez-se o contraste com a solução de verde luz\*\*\*\* por 1 minuto.

Lavou-se a lâmina com água, passou-se por etanol a 70%, a 95% e absoluto, clarificou-se com xileno e montou-se com Entellan®.

\* Solução de hematoxilina de Weigert (ref Merck 115973): misturaram-se partes iguais das soluções A e B e usou-se logo a seguir.

\*\*Solução de xylidine Ponceau e fucsina ácida: dissolveu-se 0,1 g de xylidine Ponceau (ref Merck 115927) e 0,05 g de fucsina ácida (ref Merck 105231) em 100 mL de água e 0,3 mL de ácido acético glacial, e filtrou-se. Usou-se logo a seguir.

\*\*\*Dissolveram-se 5 g de ácido fosfomolibdico (ref Merck 100532) em 100 mL de água e filtrou-se.

\*\*\*\*Dissolveu-se 0,2 g de verde luz (ref Merck 115941) em 100 mL água e 0,2 mL de ácido acético glacial e filtrou-se. Usou-se logo a seguir.

**Resultado:**

Colagénio e tecido conjuntivo: verde

Núcleo: azul escuro, preto

Citoplasma: avermelhado

**6-COLORAÇÃO VAN GIESON**

Preparou-se um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

Após este procedimento, cobriu-se a lâmina com hematoxilina de Wiergert\* durante 10 minutos. De seguida removeu-se o corante com água e lavou-se a lâmina com HCl a 1% em etanol 70%. A seguir cobriu-se a lâmina com a solução de Van Gieson\*\* durante 3 minutos.

Lavou-se a lâmina com água, fez-se a passagem da lâmina por etanol a 70%, a 95% e absoluto, clarificou-se com xileno e montou-se com Entellan®.

\* Solução de hematoxilina de Weigert (ref Merck 115973): misturaram-se partes iguais das soluções A e B e usou-se logo a seguir.

\*\* solução de Van Gieson (ref Sigma HT254): solução de fucsina ácida a 0,05% p/v em ácido pícrico saturado.

**Resultado:**

Colagénio e materiais proteicos básicos: vermelho/rosa

Outros tecidos: amarelo/castanho

## 7-COLORAÇÃO ORCEINA-SHIKATA

Preparou-se um esfregaço com uma pequena amostra da extremidade dos braços da *C.tagi*. Deixou-se secar a amostra na lâmina durante cerca de 20 minutos, a 4°C, para que esta aderisse à lâmina.

Cobriu-se a lâmina com permanganato de potássio acidificado\* durante 15 minutos. Após esse tempo, lavou-se com água por 1 minuto, descorou-se com ácido acético a 2% v/v durante 2 minutos e passou-se novamente a lâmina por água.

Cobriu-se a lâmina com a solução de orceína\*\* e colocou-se o conjunto na estufa onde permaneceu durante 1 hora a 55°C. Após o arrefecimento, lavou-se com água durante 1 minuto e fez-se a diferenciação com HCl a 1% v/v em etanol 70%.

Lavou-se a lâmina com água, fez-se a sua passagem consecutiva por etanol a 70%, a 95% e absoluto, clarificou-se com xileno e montou-se com Entellan®.

\* Solução de permanganato de potássio acidificado: dissolveram-se 0,25 g de **permanganato de potássio (ref Sigma P2097)** em 100 mL de solução de ácido sulfúrico a 0,25 % v/v.

\*\* Solução de orceína: triturou-se 1,0 g de orceína (ref Sigma O7505) em almofariz, transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL, adicionaram-se 100 mL de etanol 70% e 2 mL de ácido clorídrico 37% (**ref Sigma 320331**) e agitou-se o conjunto em placa de agitação até a solubilização. Filtrou-se. Armazenou-se, ao abrigo da luz, por não mais de 1 semana.

**Resultado:** A presença de cobre detecta-se por grânulos acobreados, castanhos.

**ANEXO B - REGIÕES 18S; 28S E ITS1 DO rDNA DA *C. TAGI* DO TEJO E DO SADO:  
SEQUENCIAÇÕES PARCIAIS, ALINHAMENTOS E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS  
CONTIG**

Após a amplificação e purificação dos produtos de PCR, procedeu-se à sequenciação automática das mesmas, através do equipamento 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®). Este procedimento foi executado de igual forma para todas as regiões estudadas, nomeadamente as referentes a 18S rDNA, 28S rDNA e ITS1 rDNA.

A seguir apresentam-se, para cada uma das regiões: (i) as sequências individuais, no formato do programa Bioedit versão 7.2.0; (ii) O alinhamento correspondente, feito no programa BLAST do NCBI, tendo-se selecionado o algoritmo “megablast”; (iii) A formação de uma sequência de consenso, obtida através do programa Codoncode Aligner versão 4.2.3; (iv) O alinhamento da sequência de consenso com a sequência da *C. mosaicus*, feito no programa BLAST do NCBI, tendo-se selecionado o algoritmo “blastn”.

**REGIÃO 18S**

**(I) *C. TAGI* TEJO (SENTIDO 5´-3´)**

```
1   TNNNCATNNC NACGAGCAGA NGGANNATGT CTGNTATAAG
41  CACTTGTA CT GTGAAACTGC AATGGCTCAT TAAATCAGTT
81  ATCGTTTATT TGATTGTACC TTA CTACATG GATAACCGTG
121 GTAATTCTAG AGCTAATACA TGC GAAAAGT CCCGACTTCT
161 GGAAGGGATG TATTTATTAG ACTAAAAGCC AATACCTGGG
201 CTGCATCAGT ACTGCACGTT CGTGTGGTGA CCATGATAAA
241 AAACCCCAT TCTTTGCCGT GGACACCTGG ATGTTTTGCT
281 CA
```

**C. TAGI SADO (SENTIDO 5'-3')**

1      TNNTNNCNAT TAGGNGACNG CAGANNGCNN ANCNNGTGAT  
41      TATATAAGCA CTTGTACTGT GAAACTGCGA ATGGCTCATT  
81      AAATCAGTTA TCGTTTATTT GATTGTACCT TACTACATGG  
121     ATAACCGTGG TAATTCTAGA GCTAATACAT GCGAAAAGTC  
161     CCGACTTCTG GAAGGGATGT ATTTATTAGA CTAAAAGCCA  
201     ATACGTGGGC TGCTTCGGTA GTGCACGTTT GTGTGGTGAT  
241     TCATGATAAC TTCTCGAATC GCATGGCCAA TGAGCCGGCG  
281     ATGTTTCATT CAAATTTCTG CCCTATCAAC TGTCGATGGT  
321     AAGGTAGTGG CTTACCATGG TTACAACGGG TGACGGAGAA  
361     TTAGGGTTCG ATTCCGGAGA GGGAGCCTGA GAAACGGCTA  
401     CCACATCCAA GGAAGGCAGC AGGCGCGCAA ATTACCCAAT  
441     CCCGACACGG GGAGGTAGTG ACAAGAAATA ACAATCCGTG  
481     TCTATATTCT AGACGCGAAA TTGGAATGAG TACAATTTAA  
521     ATCCTTTAAC GAGGATCTAT TGGAGGGCAA GTCTGGTGCC  
561     AGCAGCCGCG GTAATTCCAG CTCCAATAGC GTATATTAAA  
601     GTTGTTGCAG TTA AAAAGCT CGTAGTTGGA TTTCGGGATG  
641     GGCCAGTCGG TCTGCCGCAA GGTATGTTAC TGGCTGGTCT  
681     GTTCTTCTTC GCAAAGACTG CGTGTGCTCT TAGTTGAGTG  
721     TGCGTAGAAT TTGCGACGTT TACTTTGAAA AAATTAGAGT  
761     GTTCAAAGCA GGCGATTAGC TTGAATACAT GAGCATGGAA  
801     ATAATGGAAT AGGACTTTGG TTCTATTTTG TTGGTTTCTG  
841     GAACTGAAGT AATGATTAAG AGGGACAGTT GGGGGGCATT  
881     CGTATTTCTG TGTCAGAGGT GAAATTCTTG GATTTACGAA  
921     AGACGAACAA CTGCGAAAGC ATTTGCCAAG AATGTTTTCA  
961     TTAATCAAGA ACGAAAGTTA GAGGCTCGAA GACGATCAGA  
1001    TACCGTCCTA GTTCTAACCA TAAACGATGC NACTAGGGAT  
1041    CAGCGGGCGT TATTTTATGA CCCC GTTGGC ANCNTATGGA  
1081    AACNAGGTTT TGGNTCGGGG

**(II) ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS 18S DA *C. TAGI* DO TEJO E DO SADO (SENTIDO 5'-3')**

Contagem	Identidade	Intervalos
342 bits (185)	200/207 (97%)	2/207 (0%)

Sado 43	TATAAGCACTTGTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGA	102
Tejo 35	TATAAGCACTTGTACTGTGAAACTGC-AATGGCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGA	93
Sado 103	TTGTACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAGTCCC	162
Tejo 94	TTGTACCTTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAGTCCC	153
Sado 163	GACTTCTGGAAGGGATGTATTTATTAGACTAAAAGCCAATACGTGGGCTGCTTCGGTAGT	222
Tejo 154	GACTTCTGGAAGGGATGTATTTATTAGACTAAAAGCCAATACCTGGGCTGCATCAGTACT	213
Sado 223	GCACGTTCGTGTGGTGATTCATGATAA	249
Tejo 214	GCACGTTCGTGTGGTGAC-CATGATAA	239

**(III) SEQUÊNCIA CONSENSO 18S DA *C. TAGI* DO TEJO E DO SADO (SENTIDO 5'-3')**

1 TNNTCATNNC NACGAGSAGA CGGCAGATGT CGGTTATATA

41 AGCACTTGTA CTGTGAAACT GCGAATGGCT CATTAAATCA

81 GTTATCGTTT ATTTGATTGT ACCTTACTAC ATGGATAACC

121 GTGGTAATTC TAGAGCTAAT ACATGCGAAA AGTCCCGACT

161 TCTGGAAGGG ATGTATTTAT TAGACTAAA GCCAATACGT

201 GGGCTGCTTC GGTAGTGAC GTTTCGTGTGG TGATTCATGA

241 TAACTTCTCG AATCGCATGG CCAATGAGCC GGCGATGTTT

281 CATTCAAATT TCTGCCCTAT CAACTGTCTGA TGGTAAGGTA

321 GTGGCTTACC ATGGTTACAA CGGGTGACGG AGAATTAGGG

361 TTCGATTCCG GAGAGGGAGC CTGAGAAACG GCTACCACAT

401 CCAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCCGAC

441 ACGGGGAGGT AGTGACAAGA AATAACAATC CGTGTCTATA

481 TTCTAGACGC GAAATTGGAA TGAGTACAAT TTAAATCCTT

521 TAACGAGGAT CTATTGGAGG GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC

561 CGCGGTAATT CCAGCTCCAA TAGCGTATAT TAAAGTTGTT

601 GCAGTTAAA AGCTCGTAGT TGGATTTCCG GATGGGCCAG

641 TCGGTCTGCC GCAAGGTATG TTAAGTGGCTG GTCTGTTCTT

681 CTTTCGCAAAG ACTGCGTGTG CTCTTAGTTG AGTGTGCGTA  
721 GAATTTGCGA CGTTTACTTT GAAAAATTA GAGTGTTCAA  
761 AGCAGGCGAT TAGCTTGAAT ACATGAGCAT GGAAATAATG  
801 GAATAGGACT TTGGTTCTAT TTTGTTGGTT TCTGGAACTG  
841 AAGTAATGAT TAAAGGGACA GTTGGGGGGC ATTCGTATTT  
881 CGTTGTCAGA GGTGAAATTC TTGGTTTACA AAGACGAACA  
921 ACTGCGAAAG CATTGCGCAA GAATGTTTTTC ATTAATCAAG  
961 AACGAAAGTT AGAGGCTCAA AGACGATCAG ATACCGTCCT  
1001 AGTTCTAACC ATAAACGATG CNACTAGGGA TCAGCGGGCG  
1041 TTATTTTATG ACCCCGTTGG CANCNTATGG AAACNAGGTT  
1081 TTGGNTCGGG G

**(IV) ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE CONSENSO 18S DA *C. TAGI* DO TEJO COM A SEQUÊNCIA DA *C. MOSAICUS* (SENTIDO 5'-3')**

Contagem	Identidade	Intervalos
1730 bits (1918)	1030/1065 (97%)	13/1065 (1%)

C. tagi 37	TATAAGCACTTGTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGA	96
C. mosaicus 30	TATAAGCACTTGTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGA	89
C. tagi 97	TTGTACCTTAC-TACATGGATAACCGTGGAATTTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAGTCC	155
C. mosaicus 90	TTGTACCTTACCTACATGGATAACCGTGGAATTTCTAGAGCTAATACATGCGAAAAGTCC	149
C. tagi 156	CGACTTCTGGAAGGGATGATTTATTAGACTAAAAGCCAATACGTGGGCTGCTTCGGTAG	215
C. mosaicus 150	CGACTTCTGGAAGGGATGATTTATTAGACTAAAAGCCAATACGTGGCGACCTCGGCTG	209
C. tagi 216	TGCACGTTTCGTGTGGTGATTCATGATAACTTCTCGAATCGCATGGCCAATGAGCCGGCGA	275
C. mosaicus 210	TGTGCGTTCATGTGGTGATTCATGATAACTTCTCGAATCGCATGGCCA-TGGGCCGGCGA	268
C. tagi 276	TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTAAGGTAGTGGCTTACCATGGT	335
C. mosaicus 269	TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTAAGGTAGTGGCTTACCATGGT	328
C. tagi 336	TACAACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTAC	395
C. mosaicus 329	TACAACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTAC	388
C. tagi 396	CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGA	455
C. mosaicus 389	CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGA	448
C. tagi 456	CAAGAAATAACAATCCGTGTCTATATTCTAGACGCGAAATGGAAATGAGTACAATTTAAA	515
C. mosaicus 449	CAAGAAATAACAATCCGTGTCTATATTCTAGACGCGAAATGGAAATGAGTACAATTTAAA	508
C. tagi 516	TCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGC	575
C. mosaicus 509	TCCTTTAACGAGGACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGC	568
C. tagi 576	TCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCGGGATGG	635

C. mosaicus	569	TCCAATAGCGTATATATAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGACGG	628
C. tagi	636	GCCAGTCGGTCTGCCGCAAGGTATGTTACTGGCTGGTCTGTTCTTCTTCGCAAAGACTGC	695
C. mosaicus	629	GCCAGTCGGTCTGCCGCAAGGTATGTTACTGGCTGGTCTGTTCTTCTTCGCAAAGACTGC	688
C. tagi	696	GTGTGCTCTTAGTTGAGTGTGCGTAGAATTTGCGACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTG	755
C. mosaicus	689	GTGTGCTCTTAATGAGTGTGCGTAGAATTTGCGACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTG	748
C. tagi	756	TTCAAAGCAGGCGATTAGCTTGAATACATGAGCATGGAAATAATGGAATAGGACTTTGGT	815
C. mosaicus	749	TTCAAAGCAGGCTATAAGCTTGAATACATGAGCATGG-AATAATGGAATAGGACTTTGGT	807
C. tagi	816	TCTATTTTGTGGTTTCTGGAACGAAGTAATGATTAA-AGGGACAGTTGGGGGCATTTC	874
C. mosaicus	808	TCTATTTTGTGGTTTCTGGAACGAAGTAATGATTAAAGAGGGACAGTT-GGGGGCATTTC	866
C. tagi	875	GTATTTTCGTTGTGAGAGTGAAATCTTGG-TTTAC-AAAGACGAACAACTGCGAAAGCA	932
C. mosaicus	867	GTATTTTCGTTGTGAGAGTGAAATCTTGGATTACGAAAGACGAACAACTGCGAAAGCA	926
C. tagi	933	TTTGCCAAGAATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGCTCAAAGACGATCAGAT	992
C. mosaicus	927	TTTGCCAAGAATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGCTCGAAGACGATCAGAT	986
C. tagi	993	ACCGTCCTAGTTCTAACCATAAACGATG-CNACTAGGGATCAGCGGGCGTTATTTTATGA	1051
C. mosaicus	987	ACCGTCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCAGCGGGCGTTATTTTATGA	1046
C. tagi	1052	CCCCGTTGGCANCNTAT-GGAAAC--NAGGTTTGGNT--CGGGG	1091
C. mosaicus	1047	CCCCGTTGGCACCTTATGGGAAACCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGG	1091

## REGIÓN 28S

### (I) C. TAGI TEJO (SENTIDO 5'-3')

1 NNNTNNTCGA TAGTCTTTCG CCCTATACTC AAGTTTGACG  
41 ATCGATTTGC ACGTCAGAAT CGCTACGAGC TTCCACCAGA  
81 GTTTCCTCTG GCTTCACCCT ACTCAAGCAT AGTTCACCAT  
121 CTTTCGGGTC CCAGCATGTA CGCTCTTACT CAAACCTTTC  
161 TAAGAGTAGA ATAGGTCGGT CGATGATGCG CACCGTCCCG  
201 TGGAACGGTA GATCTCACCT CAGCTGCTAG GCAGCCTTCA  
241 CTTTCATTGC GCCTCTGGGT TTCGGTCACC CCAAGACTTG  
281 CGCACATGTT AGACTCCTTG GTCCGTGTTT CAAGACGGGT  
321 CGGATAAAGC CATATTGCCG CCAACAACCC TGGTGCATAG  
361 TGTGCGTTTA CTGCACGCCT TTTCACCGTC CAAAGCGAAC  
401 TGCAAGCAGT GCACCTCGGT CGACTACGAG AACGGAACAG  
441 GACGCCAGCC CCCCAGAGAG AGCATGCACC GCTCGCCTCT  
481 GCCAGAGTCA GACTGGGACA CTAGTGGCTG TAACAGTGCT  
521 CGGCAAGCCG ACCACCTACC TTCCACAGAC GCCGTGTAGC

561 CTGAATTCTC CAGCAGCTGT TGACGCACTG CTACGAGAAA  
 601 TGC GGCGGAC AATTGACACG GCCGTGCAGC GACAGTCCAT  
 641 TCAGATCCAC CAACTGCACG TCGCGTCAAG CGATCGCCTG  
 681 AATCTCGCAG TAGCATTGCT AACTGCATCC GTTTCCCCTC  
 721 TAACGGTTTC ACGCACTTTT TAACTCTCTT TTCAAAGTTC  
 761 TTTTCATCTT TCCCTCACGG TACTTGTTTCG CTATCGGTCT  
 801 CGTGCCAATA TTTAGCTTTA GATGGAGTTT ACCACCAATT  
 841 TTGGGCTGCA TTCCCAAGCA ACCCGACTCA TAGAAAGCGT  
 881 ATCGTAAACG GTCCGTCCTG CCACGCACGG GATTGTCACC  
 921 CTCTCTGATG TGCTGTTCCA AGCAACTTAC GCAGGAAGGA  
 961 TCCGCCGTGA AAACGCTTCT CGAGACTACA ATTCGCCATT  
 1001 GCAAGCAATG GAGATTCANN TN

**C. TAGI SADO (SENTIDO 5'-3')**

1 NNNNNTNNNT NNNANANNCT TTCGCCCTAT ACTCAGTTTG  
 41 ACGATCGATT TGCACGTCAG AATCGCTACG AGCTTCCACC  
 81 AGAGTTTCCT CTGGCTTCAC CCTACTCAAG CATAGTTCAC  
 121 CATCTTTCGG GTCCCAGCAT GTACGCTCTT ACTCAAACCT  
 161 TTCTAAGAGT AGAATAGGTC GGTCGATGAT GCGCACCGTC  
 201 CCGTGGAACG GTAGATCTCA CCTCAGCTGC TAGGCAGCCT  
 241 TCACTTTCAT TGCGCCTCTG GGTTTCGGTC ACCCCAAGAC  
 281 TTGCGCACAT GTTAGACTCC TTGGTCCGTG TTTCAAGACG  
 321 GGTCCGATAA AGCCATATTG CCGCCAACAA CCCTGGTGCA  
 361 TAGTGTGCGT TTAGTGCACG CCTTTTCACC GTCCAATGCG  
 401 AACTGCAAGC AGTGCACCTC GGTCGACTAC GAGAACGGAA  
 441 CAGGACGCCA GCCCCCCGAA GAGAGCATGC ACCGCTCGCC  
 481 TCTGCCAGAG TCAGACTGGG ACACTAGTGG CTGTAACAGT  
 521 GCTCGGCAAG CCGACCACCT ACCTTCCACA GACGCCGTGT  
 561 AGCCTGAATT CTCCAGCAGC TGTTGACGCA CTGCTACGAG  
 601 AAATGCGGCG GACAATTGAC ACGGCCGTGC AGCGACAGTC  
 641 CATTCAGATC CACCAACTGC ACGTCGCGTC AAGCGATCGC

681 CTGAATCTCG CAGTAGCATT GCTAACTGCA TCCGTTTCCC  
721 CTCTAACGGT TTCACGCACT TTTTAACTCT CTTTTCAAAG  
761 TTCTTTTCAT CTTTCCCTCA CGGTACTTGT TCGCTATCGG  
801 TCTCGTGCCA ATATTTAGCT TTAGATGGAG TTTACCACCA  
841 ATTTTGGGCT GCATTCCCAA GCAACCCGAC TCATAGAAAG  
881 CGTATCGTAA CGGTCCGTCC TGCCACGCAC GGGATTGTCA  
921 CCCTCTCTGA TGTGCTGTTC CAAGCAACTT AGGCAGGAGG  
961 ATCGCCGTGA AACGCTTCTC GAGACTACAT TCGCATTGCA  
1001 GCATGAGATT CAGNTNGTGN GAGANCGCTN NNACAA

**(II) ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS 28S DA *C. TAGI* DO TEJO E DO SADO (SENTIDO 5'-3')**

Contagem	Identidade	Intervalos
1779 bits (963)	992/1004 (99%)	10/1004 (0%)

Sado 19	CTTTCGCCCTATACTC-AGTTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAATCGCTACGAGCTTCC	77
Tejo 15	CTTTCGCCCTATACTCAAGTTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAATCGCTACGAGCTTCC	74
Sado 78	ACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCCTACTCAAGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAG	137
Tejo 75	ACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCCTACTCAAGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAG	134
Sado 138	CATGTACGCTCTTACTCAAACCTTTCTAAGAGTAGAATAGGTCGGTCGATGATGCGCACC	197
Tejo 135	CATGTACGCTCTTACTCAAACCTTTCTAAGAGTAGAATAGGTCGGTCGATGATGCGCACC	194
Sado 198	GTCCCGTGGAACGGTAGATCTCACCTCAGCTGCTAGGCAGCCTTCACTTTTCATTGCGCCT	257
Tejo 195	GTCCCGTGGAACGGTAGATCTCACCTCAGCTGCTAGGCAGCCTTCACTTTTCATTGCGCCT	254
Sado 258	CTGGGTTTCGGTACCCCCAAGACTTGCGCACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG	317
Tejo 255	CTGGGTTTCGGTACCCCCAAGACTTGCGCACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG	314
Sado 318	ACGGGTCGGATAAAGCCATATTGCCGCCAACAACCCTGGTGCATAGTGTGCGTTTACTGC	377
Tejo 315	ACGGGTCGGATAAAGCCATATTGCCGCCAACAACCCTGGTGCATAGTGTGCGTTTACTGC	374
Sado 378	ACGCCTTTTCACCGTCCAATGCGAACTGCAAGCAGTGCACCTCGGTCGACTACGAGAACG	437
Tejo 375	ACGCCTTTTCACCGTCCAAGCGAACTGCAAGCAGTGCACCTCGGTCGACTACGAGAACG	434
Sado 438	GAACAGGACGCCAGCCCCCGAAGAGAGCATGCACCGCTCGCCTCTGCCAGAGTCAGACT	497
Tejo 435	GAACAGGACGCCAGCCCCCGAAGAGAGCATGCACCGCTCGCCTCTGCCAGAGTCAGACT	494
Sado 498	GGGACACTAGTGGCTGTAACAGTGTGCGCAAGCCGACCACCTACCTTCCACAGACGCCG	557
Tejo 495	GGGACACTAGTGGCTGTAACAGTGTGCGCAAGCCGACCACCTACCTTCCACAGACGCCG	554
Sado 558	TGTAGCCTGAATTCTCCAGCAGCTGTTGACGCACTGCTACGAGAAATGCGGCGGACAATT	617
Tejo 555	TGTAGCCTGAATTCTCCAGCAGCTGTTGACGCACTGCTACGAGAAATGCGGCGGACAATT	614

Sado 618	GACACGGCCGTGCAGCGACAGTCCATTCAGATCCACCAACTGCACGTCGCGTCAAGCGAT	677
Tejo 615	GACACGGCCGTGCAGCGACAGTCCATTCAGATCCACCAACTGCACGTCGCGTCAAGCGAT	674
Sado 678	CGCCTGAATCTCGCAGTAGCATTTGCTAACTGCATCCGTTTCCCCTCTAACGGTTTCACGC	737
Tejo 675	CGCCTGAATCTCGCAGTAGCATTTGCTAACTGCATCCGTTTCCCCTCTAACGGTTTCACGC	734
Sado 738	ACTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCTCACGGTACTTGTTCGCTAT	797
Tejo 735	ACTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCTCACGGTACTTGTTCGCTAT	794
Sado 798	CGGTCTCGTGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCAATTTGGGCTGCATTC	857
Tejo 795	CGGTCTCGTGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAGTTTACCACCAATTTGGGCTGCATTC	854
Sado 858	CAAGCAACCCGACTCATAGAAAGCGTATCGTAA-CGGTCCGTCCGTCACGCACGGGATT	916
Tejo 855	CAAGCAACCCGACTCATAGAAAGCGTATCGTAAACGGTCCGTCCGTCACGCACGGGATT	914
Sado 917	GTCACCTCTCTGATGTGCTGTTCCAAGCAACTTAGGCAGGA-GGATC-GCCGTGAAA-C	973
Tejo 915	GTCACCTCTCTGATGTGCTGTTCCAAGCAACTTACGCAGGAAGGATCCGCCGTGAAAAC	974
Sado 974	GCTTCTCGAGACTACA-TTCGC-ATTGCA-GCA-TG-AGATTCA	1012
Tejo 975	GCTTCTCGAGACTACAATTGCCATTGCAAGCAATGGAGATTCA	1018

### (III) SEQUÊNCIA CONSENSO 28S DA *C. TAGI* DO TEJO E DO SADO (SENTIDO 5'-3')

1 NNNNNTNTNT TCGATAGTCT TTCGCCCTAT ACTCAAGTTT  
41 GACGATCGAT TTGCACGTCA GAATCGCTAC GAGCTTCCAC  
81 CAGAGTTTCC TCTGGCTTCA CCCTACTCAA GCATAGTTCA  
121 CCATCTTTTCG GGTCCCAGCA TGTACGCTCT TACTCAAACC  
161 TTTCTAAGAG TAGAATAGGT CGGTCGATGA TGCGCACCGT  
201 CCCGTGGAAC GGTAGATCTC ACCTCAGCTG CTAGGCAGCC  
241 TTCACTTTCA TTGCGCCTCT GGGTTTCGGT CACCCCAAGA  
281 CTTGCGCACA TGTTAGACTC CTTGGTCCGT GTTTCAAGAC  
321 GGGTCGGATA AAGCCATATT GCCGCCAACA ACCCTGGTGC  
361 ATAGTGTGCG TTTACTGCAC GCCTTTTCAC CGTCCAAAGC  
401 GAACTGCAAG CAGTGCACCT CGGTCGACTA CGAGAACGGA  
441 ACAGGACGCC AGCCCCCGA AGAGAGCATG CACCGCTCGC  
481 CTCTGCCAGA GTCAGACTGG GACACTAGTG GCTGTAACAG  
521 TGCTCGGCAA GCCGACCACC TACCTTCCAC AGACGCCGTG  
561 TAGCCTGAAT TCTCCAGCAG CTGTTGACGC ACTGCTACGA  
601 GAAATGCGGC GGACAATTGA CACGGCCGTG CAGCGACAGT  
641 CCATTCAGAT CCACCAACTG CACGTGCGGT CAAGCGATCG



C. tagi	544	CTTCCACAGACGCCGTGTAGCCTGAATTCTCCAGCAGCTGTTGACGCACTGCTACGAGAA	603
C. mosaicus	471	CTTCCGCAGATGCCGTGTAGCCCGGCAGA-CCAGCAGCTGTTGACGCACCCCTTCGAGAA	413
C. tagi	604	ATGCGGCGGACAATTGACACGGCCGTGCAGCGACAGTCCATTTCAGATCCACCAACTGCAC	663
C. mosaicus	412	GTGCGGCGGACACGAGGCCGAGGCCGTGCAACGACAGTCCATTTCAGATCCGCCAGCAGCAC	353
C. tagi	664	GTCGCGTCAAGCGATCGCCTGAATCTCGCAGTAGCATTGCTAACTGCATCCGTTTCCCCT	723
C. mosaicus	352	GTC AAGCCAAGCGATCGCCTGAATCTCGCAGGAGCATTGCTAACTCCATCCGCTTCCCCT	293
C. tagi	724	CTAACGGTTTCACGCACFTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTCTTTTTCATCTTCCCTCACG	783
C. mosaicus	292	CCAACGGTTTCACGCACFTTTTAACTCTCTTTTCAAAGTCTTTTTCATCTTCCCTCACG	233
C. tagi	784	GTA CTGTGTCGCTATCGGTCTCGTGCCAATATTAGCTTTAGATGGAGTTACCACCAAT	843
C. mosaicus	232	GTA CTGTGTCGCTATCGGTCTCGTGCCAATATTAGCTTTAGATGGAGTTACCACCAAT	173
C. tagi	844	TTTGGGCTGCATTCCCAAGCAACCCGACTCATAGAAAGCGTATCGTAAACGGTCCGTCCT	903
C. mosaicus	172	TTTGGGCTGCATTCCCAAGCAACCCGACTCATGGAAAGCGTATCGTGTGCGGTCCGCCCT	113
C. tagi	904	GCCACGCACGGGATTGTCAACCCTCTCTGATGTGCTGTTCCAAGCAACTTAGGCAGG-AAG	962
C. mosaicus	112	GCCACGAACGGGATTGTCAACCCTCTCCGATGTGCTGTTCCAAGCAACTTAGGCAGGTAGG	53
C. tagi	963	AACCGCCGTG-AAACGCTTCTCGAGACTAC-ATTGCCCATTGCAG	1005
C. mosaicus	52	ATCCGCCGGGAAAACGCTTCTCGAGACTACAATTGCCCATTGCAG	8

## REGIÃO ITS1

### (I) *C. TAGI* TEJO (SENTIDO 5'-3')

1 TATTTACGTA CGTGCATTGC GACGTCTCTC GTCCGTCCGT  
41 ATGTGACGAT AGATCAGCAG ATCTTTGTCTG CTGCGACCAC  
81 TGTGAACCTG TAACTATCCG CTTGAGGTGG GCAGAGTGTT  
121 CACCACCAAC CACAGCACTT GTAGTATACG AGTGTCTGCG  
161 TGTCTGTGTG TCTGTGTGCA CGTCTGAGCT TAAATGATGG  
201 GCATCATCTT CCCATCGGCC TCATGTTGGA GCCATGCTGA  
241 TTATTGCTGT ACGCCAGCAA CCAATCAGTA GTCTATGTGT  
281 TTTTGCTAAC AGTTATTTTA AATAATTCCT GAGCAATTGC  
321 GTGTACGTAC TTCGGTATGT ACGAAAAAAA TATTAGACAA  
361 CTTCTAAGGT GGATCACTCG GCCTCGTGCG A

**C. TAGI SADO (SENTIDO 5'-3')**

1 ANNNNCCGNT ACGTGCATTA CGTCGTGCAT TCGGACGTCT  
 41 CTCGTCCGTC CGTATGTGAC GATAGATCAG CAGATCTTTG  
 81 TCGCTGCGAC CACTGTGAAC TTGTAACAT CCGCTTGAGG  
 121 TGGGCAGAGT GTTACCACC AACCACAGCA CTTGTAGTAT  
 161 ACGAGTGTCT GCGTGTCTGT GTGTCTGTGT GCACGTCTGA  
 201 GCTTAAATGA TGGGCATCAT CTTCCCATCG GCCTCATGTT  
 241 GGAGCCATGC TGATTATTGC TGTACGCCAG CAACCAATCA  
 281 GTAGTCTATG TGTTTTTGCT AACAGTTATT TAAATAATT  
 321 CCTGAACAAT TCGGTGTACG TACTTCGGTA TGTACGAAAA  
 361 AAATATTAAA CAACTTCTAA GGGGGATCAC TCGG

**(II) ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS ITS1 DA C. TAGI DO TEJO E DO SADO (SENTIDO 5'-3')**

Contagem	Identidade	Intervalos
675 bits(365)	374/378(99%)	1/378(0%)

Sado 18 TTACGT-CGTGCATTGCGACGTCTCTCGTCCGTCGGTATGTGACGATAGATCAGCAGATC 76  
 ||||| |  
 Tejo 4 TTACGTACGTGCATTGCGACGTCTCTCGTCCGTCGGTATGTGACGATAGATCAGCAGATC 63  
 Sado 77 TTTGTGCTGCGACCACTGTGAACTTGTAACTATCCGCTTGAGGTGGGCAGAGTGTTCAC 136  
 ||||| |  
 Tejo 64 TTTGTGCTGCGACCACTGTGAACTTGTAACTATCCGCTTGAGGTGGGCAGAGTGTTCAC 123  
 sado 137 CACCAACCACAGCACTTGTAGTATACGAGTGTCTGCGTGTCTGTGTGTCTGTGTGCACGT 196  
 ||||| |  
 Tejo 124 CACCAACCACAGCACTTGTAGTATACGAGTGTCTGCGTGTCTGTGTGTCTGTGTGCACGT 183  
 Sado 197 CTGAGCTTAAATGATGGGCATCATCTTCCCATCGGCCTCATGTTGGAGCCATGCTGATTA 256  
 ||||| |  
 Tejo 184 CTGAGCTTAAATGATGGGCATCATCTTCCCATCGGCCTCATGTTGGAGCCATGCTGATTA 243  
 Sado 257 TTGCTGTACGCCAGCAACCAATCAGTAGTCTATGTGTTTTTGCTAACAGTTATTTAAAT 316  
 ||||| |  
 Tejo 244 TTGCTGTACGCCAGCAACCAATCAGTAGTCTATGTGTTTTTGCTAACAGTTATTTAAAT 303  
 Sado 317 AATTCCTGAACAATTGCGTGTACGTACTTCGGTATGTACGaaaaaaaaTATTAACAACCTT 376  
 ||||| |  
 Tejo 304 AATTCCTGAGCAATTGCGTGTACGTACTTCGGTATGTACGAAAAAATATTAGACAACCTT 363  
 Sado 377 CTAAGGGGGATCACTCGG 394  
 ||||| |  
 Tejo 364 CTAAGGTGGATCACTCGG 381



## ANEXO C- COMUNICAÇÕES RELACIONADAS COM ESTE TRABALHO

**1** – Comunicação em painel, “Preliminary studies on *Catostylus tagi* nematocysts”. Apresentado no “Third International Jellyfish Blooms Symposium”, 13 a 16 de Julho de 2010, Mar del Plata, Argentina, disponível em <http://www.jfbs2010.aacima.org.ar/program.pdf>

Autores:

Zilda B.Morais<sup>1</sup>; Carina Crucho<sup>1</sup>; Tiago Parracho<sup>1</sup>; Vítor Farinha<sup>1</sup>; Francisco Ruano<sup>2</sup>; Marisa Rangel<sup>3</sup>.

1 - EGAS MONIZ COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR

2 - INRB/IPIMAR, INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DAS PESCAS E DO MAR; AV. DE BRASÍLIA , CP 1449-006 LISBOA, PORTUGAL.

3 - INSTITUTO BUTANTAN, LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA, AV. VITAL BRASIL CEP 05503 – 900 SÃO PAULO BRASIL

**2** - Comunicação em painel, “Estudos histoquímicos sobre os nematocistos da *Catostylus tagi*”. Apresentado no 1º Encontro de Biologia Molecular em Saúde, 18 e 19 de Março de 2011, Escola Superior de Saúde Egas Moniz , Caparica, Portugal.

Autores:

Tiago Parracho, Rita Soeiro, Zilda Morais.

CiEM – CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EGAS MONIZ, INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ, ISCSEM, QUINTA DA GRANJA, MONTE DE CAPARICA, 2819-511 CAPARICA. [TPAR2000@HOTMAIL.COM](mailto:TPAR2000@HOTMAIL.COM)

**3** - Comunicação em painel, “Estudos preliminares sobre as proteínas dos nematocistos da medusa *Catostylus tagi*”. Apresentado no 52º Congresso Brasileiro de Química, 14 a 18 de Outubro de 2012, Recife/PE, Brasil, disponível em <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/11/1133-14733.html>

Autores:

Morais, Z<sup>1</sup>.; Mascarenhas, P. <sup>1</sup>; Soeiro, R. <sup>1</sup>; Parracho, T<sup>1</sup>.; Nogueira, I. <sup>2</sup>; Guitian, E. <sup>3</sup>.

1 - EGAS MONIZ COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR

2 - INSTITUTO SUPERIOR TECNICO - UTL

3 - UNIVERSIDADE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**4** – Comunicação em painel, “Histochemical and Genetic Characterization of the Portuguese jellyfish *Catostylus tagi*”. Apresentado no 3º Encontro de Biologia Molecular em Saúde, 15 e 16 de Março de 2013, Escola Superior de Saúde Egas Moniz , Caparica, Portugal.

Autores:

Tiago Tomé Parracho & Zilda Braga Morais.

CiEM – CENTRO DE INVESTIGAÇÃO INTERDISCIPLINAR EGAS MONIZ, INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ, ISCSEM, QUINTA DA GRANJA, MONTE DE CAPARICA, 2819-511 CAPARICA. [TPAR2000@HOTMAIL.COM](mailto:TPAR2000@HOTMAIL.COM)