

HERPETOMONAS EM FITÓFAGO DO GÊNERO *DYSDERCUS* — (HEMIPTERA, PYRROCHORIDAE)*.

MARIA DO CARMO MOREIRA DE SOUZA**

RESUMO

Relatamos o encontro de flagelados no intestino de um hemíptero da família Pyrrhocoridae e gênero *Dysdercus*. Crescem nos meios de cultura de Ducrey, Roitman, Roitman modificado, "LIT" e Meio de Composição química Definida, nas temperaturas de 25, 28 e 37°C. Quando corado pelo Giemsa modificado apresenta as formas de promastigotas, formas com cinetoplasto situado lateralmente (lateromastigotas), promastigotas arredondadas (esferomastigotas) e formas opistomastigotas. Formas amastigotas foram encontradas somente nos primeiros repiques. A amostra foi clonada dez vezes. Pela presença constante de formas promastigotas e opistomastigotas, acreditamos ter isolado um flagelado do gênero *Herpetomonas*.

INTRODUÇÃO

A importância médica e veterinária das tripanosomíases nos países tropicais e sub-tropicais, levou os pesquisadores a estudar, extensivamente, os tripanosomas de mamíferos tanto no campo co-

mo no laboratório. Embora os estudos sejam mais intensos na área de controle das doenças causadas pelos tripanosomas, os protozoologistas tem estudado os problemas de interesse biológico mais geral. Os estudos da evolução dos tripanosomas, por **Hoore & Wallace**, (1967) vieram elucidar muitos problemas relacionados com a sua filogenia que não só dão expressão às suas afinidades, mas também unem espécies relacionadas que mostram similaridades em sua constituição antigênica e fisiológica e relações com o hospedeiro do parasita. Estas características têm uma relação direta sobre as respostas dos tripanosomas à quimioterapia, sobre as relações imunológicas do hospedeiro e ainda sobre as manifestações clínicas da doença causada por eles.

É grande o número de flagelados de insetos da ordem Hemiptera, assim **Wallace & cols.** (1960) isolaram a *Crithidia flexonema* do *Gerris remigis* e *Leptomonas colossoma* do *Gerris dissortis* quan-

* Trabalho realizado no Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás, com a colaboração financeira da COPERCOPE.

** Professor Adjunto — Departamento de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical da UFGO.

do tentava isolar *Blastocrithidia gerridis* (Patton). Em 1970 Galvão & cols., isolaram de um hemíptero da família Reduviidae, um flagelado a quem eles propuseram o nome de *Leptomonas pessoai*. Em 1973 Carvalho isolou *Herpetomonas muscarum*, *Crithidia lucilae*, *Crithidia deanei* n. sp., *Leptomonas samueli* n. sp. e *Blastocrithidia galvãoi*, todas do hemíptero reduviídeo *Zelus leucogrammus* (Perty).

É muito comum o aparecimento, por ocasião das chuvas de verão, na cidade de Goiânia, de um hemíptero fitófago da família Pyrrhocoridae e gênero *Dysdercus* que, com frequência, aparece nos laranjais e algodoeiros prejudicando as suas safras; deste inseto, (que aparecia também no laboratório, nos veículos e nas residências) isolamos um flagelado que, por suas características morfológicas parece pertencer ao gênero *Herpetomonas*

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de Cultura usados:

a. Meio de "LIT" ("liver infusion triptose"), idealizado por Yaegger e descrito por Camargo (1964) e Fernandes & Castellani (1966).

b. Meio Complexo (meio de Roitman) — Segundo Roitman & cols. (1972). Autoclavou-se a 120°C por 20 minutos. Distribuiu-se em tubos 18 x 180, colocando-se, 5,0 ml em cada e estocou-se em refrigerador.

c. Meio Complexo modificado — Preparou-se este meio adicionando-se a 100,0 ml do meio de Roitman + agar 2,5%, auto-

clavado e deixado esfriar a mais ou menos 45°C, acrescentou-se 3,0 ml de sangue desfibrinado de coelho, agitou-se vagarosamente para homogenizar. Distribuiu-se em placa de Petri, colocando-se 10,0 ml em cada; deixou-se solidificar, fez-se controle de esterilidade e estocou-se em geladeira.

d. Meio de Ducrey — Meio bifásico com a seguinte composição: Extrato de batata 600,0 ml; Peptona (Oxoid) 5,0g; Agar (Oxoid) 25,0 g; Água destilada 400,0 ml. O extrato de batata foi obtido fervendo-se um quilo de batatas inglesas descascadas e cortadas em fatias misturadas com 40,0 ml de glicerina em dois litros de água destilada; após cozimento, passou-se em pano e completou-se o volume para 2.000,0 ml com água destilada; acertou-se o pH a 7,4, autoclavou-se a 120°C por 20 minutos; deixou-se esfriar a mais ou menos 45°C, adicionou-se 30% de sangue desfibrinado de coelho e distribuiu-se em tubos 18 x 180, colocando-se 7,0 ml em cada deixando-se solidificar em posição inclinada; após a solidificação o meio foi guardado em geladeira; no momento do uso adicionou-se de 2,0 a 5,0 ml de solução fisiológica estéril.

e. Meio definido — Idealizado e descrito por Roitman & cols. (1972). Dissolveu-se em 1.000,0 ml de água destilada, ajustou-se o pH a 6,5 com HCl ou NaOH e autoclavou-se a 120°C por 20 minutos.

Isolamento:

a. Observação de flagelados

nas fezes do inseto — Segurou-se o vetor pelo tórax, com uma pinça, fez-se pressão sobre o abdômem forçando a eliminação das fezes sobre uma lâmina, cobriu-se com uma lamínula e observou-se ao microscópio com 100 aumentos.

b. Inoculação em meios de cultura — Uma vez dissecado o exemplar, retirou-se todo o seu tubo digestivo colocando-se 10,0 ml de solução de Hanks estéril contendo 50,0 U.I. de penicilina por ml e depois adicionou-se aos meios de "LIT" e de Roitman, 5,0 ml em cada tubo de meio.

c. Clonagem — Tomamos uma cultura de 24 horas, em meio de Roitman, diluiu-se em salina de maneira a conter apenas dois a três flagelados por campo com vezes aumentado e adicionou-se uma gota em cada placa contendo meio de Roitman modificado, espalhou-se bem cada gota com uma vara de vidro em L e colocou-se em estufa a 25°C observando-se diariamente. Depois de 5 dias foram pescadas 15 colônias com uma alça de platina, inoculamos em "LIT" passando-se posteriormente para meio de Roitman. Examinava-se a morfologia de cada cultura, por microscopia óptica do material corado pelo Giemsa modificado, e a partir de uma delas fazia-se nova clonagem. Procedeu-se assim por dez vezes.

d. Coloração — O método de coloração usado foi o método de Giemsa com algumas modificações: Fixou-se o esfregaço com metanol por três minutos; deixou-se secar; submeteu-se as preparações à hidrólise ácida (colo-

cou-se as lâminas em uma cuba cobriu-se com solução de HCl 5N por 10 minutos); lavou-se imediatamente com água corrente e deixou-se secar bem; cobriu-se com solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 7,0; esperou-se 20 minutos e lavou-se com água corrente

RESULTADOS

a. Tipo de hospedeiro: Fitófago da família Pyrrhocoridae e gênero *Dysdercus* (Fig. 1).

b. Local de isolamento: Goiânia — Goiás — Brasil. Instituto de Patologia Tropical.

c. Morfologia: No exame direto a fresco, observou-se formas redondas com flagelo longo e com movimento lento, formas ponteadas na extremidade posterior, ligeiramente truncadas, apresentando movimento flagelar muito rápido e girando em hélice; formas longas apresentando rápidas vibrações com o eixo do corpo aproximadamente reto, os flagelados apresentando grande tendência a se colocarem em detritos do meio, nas paredes do tubo de cultura e mesmo na lâmina do microscópio. Apresentavam grande tendência a formar grupos, acalando-se corpo a corpo, principalmente em meios contendo soro; alguns organismos foram encontrados aderidos, pela extremidade posterior com flagelos em posições opostas dando a impressão de um organismo de duplo flagelo; organismos em forma de campânula com flagelo curto e movimento lento, ao se dividirem, sempre transveralmente, deram a impressão de se tratar de uma forma contendo dois flagelos, um

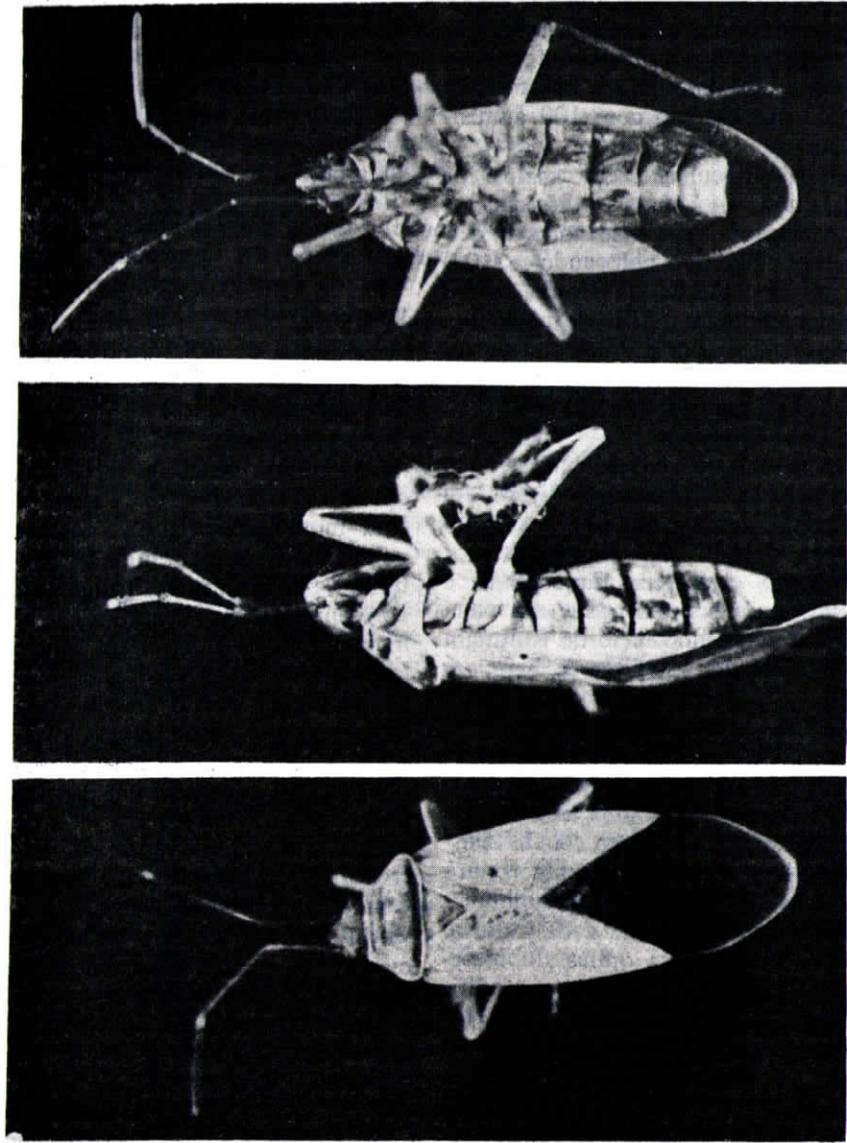
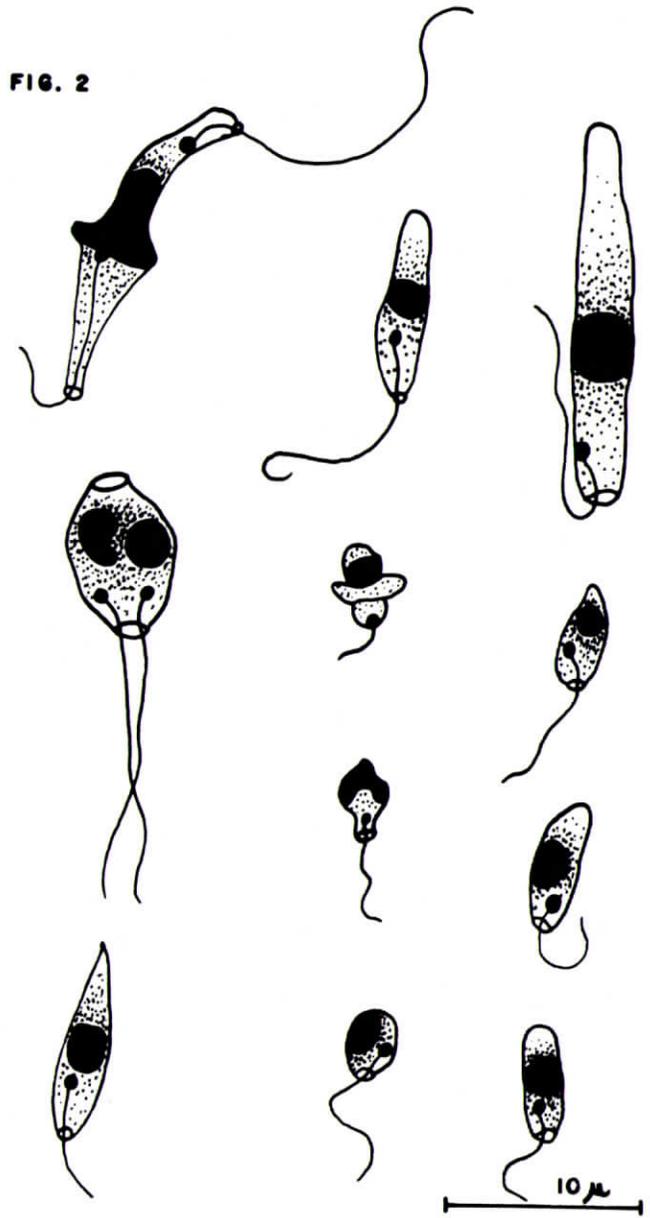


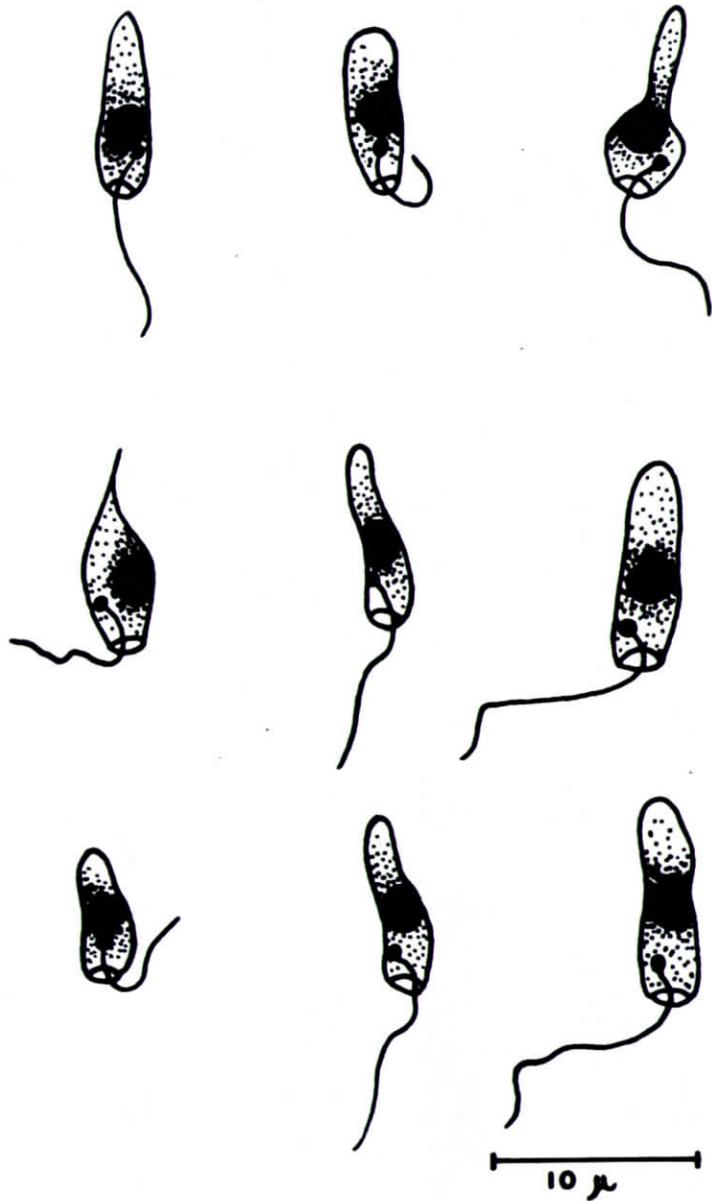
Figura 1. — Esteofotos de inseto da família Pyrrhocoridae *Dysdercus*.

FIG. 2



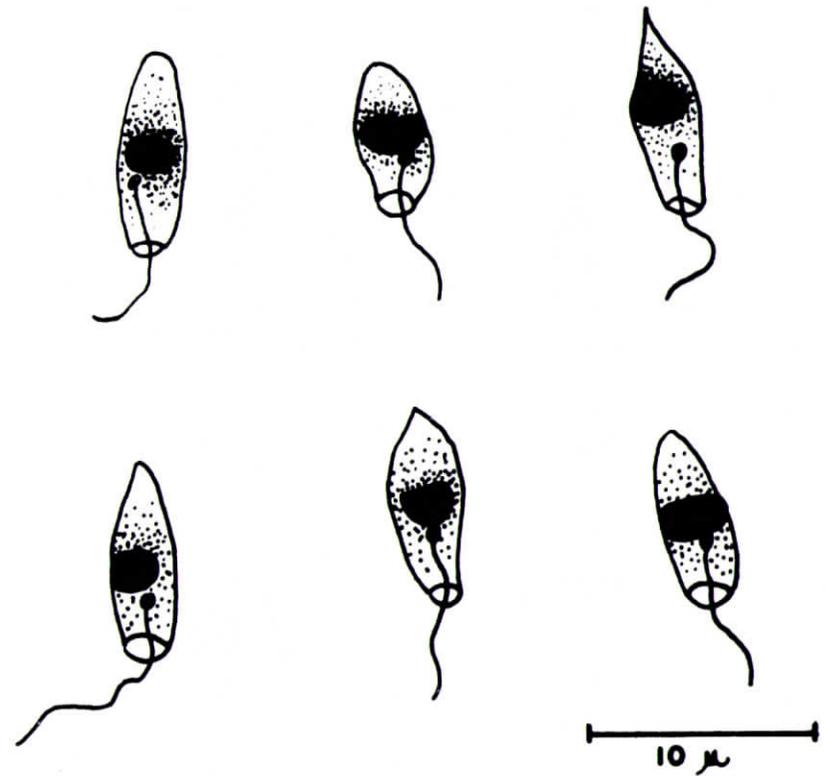
FORMAS DE TRIPANOSOMATIDEOS ENCONTRADOS NAS CULTURAS ORIGINAIS EM DUCREY 48 HORAS A 25°C.

FIG. 3



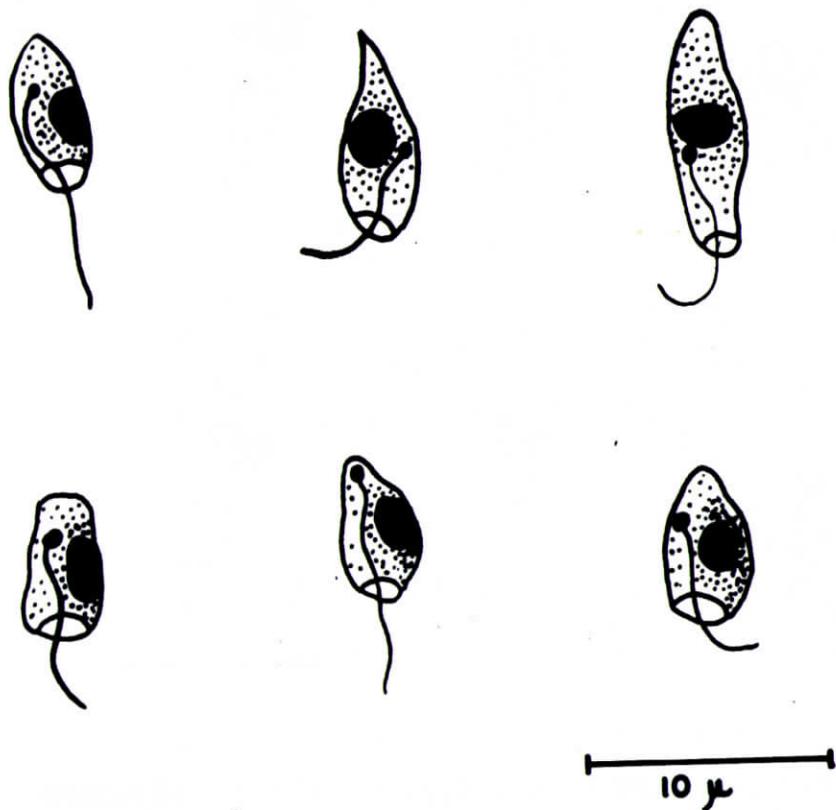
FORMAS PROMASTIGOTAS DE CULTURA, DE 24 HORAS EM MEIO DE DUCREY, A 25° C., DE HERPETOMONAS, SP; APÓS 10 CLONAGENS.

FIG. 4



FORMAS PROMASTIGOTAS, DE CULTURA DE 48 HORAS EM MEIO DE DUCREY, DE HERPETOMONAS, SP; APÓS 10 CLONAGENS. CRESCIMENTO A 25° C.

FIG. 5



FORMAS PRO, LATERO E OPISTOMASTIGOTAS,
DE CULTURA DE 15 DIAS, EM MEIO DE DUCREY,
DE HERPETOMONAS, SP; APÓS 10 CLONAGENS.
CRESCIMENTO A 25°C.

em cada extremidade; formas arredondadas ou oval, sem flagelo, foram também observadas.

A mesma cultura observada à fresco (Cultura de 48 horas "LIT") foi submetida à coloração pelo Giemsa modificado tendo-se observado: — formas promastigotas predominantes dividindo-se 99% das vezes longitudinalmente e 1% transversalmente; promastigotas arredondadas com grande flagelo; formas com aparência de sino e formas amastigotas. Observe-se na Fig. 2 o desenho correspondente em câmara clara.

Como se tratasse de uma grande variedade de formas, procurou-se clonar a amostra. Na primeira clonagem, as quinze colônias pescadas apresentavam formas morfológicamente idênticas; assim tomamos um dos quinze tubos e partimos para outra clonagem; as quinze colônias pescadas tornaram a apresentar as mesmas formas e partimos para a terceira clonagem tendo como ponto de partida um dos quinze tubos da segunda clonagem e assim repetimos por dez vezes. No final da clonagem tínhamos 20 colônias que apresentavam a mesma morfologia: Formas promastigotas em cultura de 24 horas a 28°C em meio de Ducrey (Fig. 3 desenho em câmara clara) que se repetiram com 48 horas (Fig. 4) e com 72 horas e somente com 15 dias observou-se a presença de formas opistomastigotas (Fig. 5).

d. Caracteres fisiológicos

Crescem bem nos meios de Ducrey, "LIT", Roitman, Roitman

modificado e meio definido, nas temperaturas de 25, 28 e 37°C.

DISCUSSÃO

A existente confusão com respeito a taxonomia dos membros da família Trypanosomatidae, levou Wallace & cols. a estudos mais profundos, tentando corrigi-la de algum modo. Fazem parte dessa família, vários gêneros, alguns dos quais parasitam o tubo digestivo de invertebrados, enquanto outros são parasitas digenéticos, sendo o seu ciclo de vida alternado entre dois hospedeiros: um, invertebrado, representando o hospedeiro intermediário ou vetor, no qual o flagelado se desenvolve primeiramente no intestino; o outro, um vertebrado ou planta, no qual eles habitam o sangue ou tecido. Os parasitas monogenéticos primeiramente divididos em três gêneros: *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Crithidia* foram redefinidos e classificados, graças a estudos taxonômicos e de microscopia eletrônica (Wallace, 1943, 1961, 1966; Clark, 1959; Laird, 1959), recebendo ainda nomenclatura que exprime o seu estágio de evolução (Hoare & Wallace, 1966). Assim a família Trypanosomatidae ficou dividida, principalmente, em cinco gêneros:

1. Gênero *Leptomonas* - Compreende - (a) estágio Promastigota representado por um flagelado de corpo alongado com um cinetoplasto antenuclear situado na extremidade anterior do corpo, de onde o flagelo emerge de um curto reservatório; membrana ondulante ausente; (b) estágio Amastigota (leishmânia) sem flagelo.

2. Gênero **Herpetomonas**: (a) estágio Promastigota típico (como em 1); (b) estágio Opisthmastigota, representado por estágio semelhante ao promastigota, mas com cinetoplasto posterior ao núcleo situado a distâncias variáveis; flagelo emergindo da extremidade anterior do corpo, saindo de dentro de um reservatório que se estende desde o cinetoplasto; membrana ondulante ausente; (c) estágio Amastigota (como em 1).

3. Gênero **Crithidia** (= strigomonas) - Compreende um estágio Coanomastigota, representado por um flagelado curto e largo (em forma de grão de milho), com extremidade anterior truncada; cinetoplasto antenuclear; flagelo emergindo de um curto reservatório em forma de funil; membrana ondulante ausente: (b) estágio Amastigota (leishmânia) (como em 1 e 2).

4. Gênero **Blastocrithidia**: (sin. crithidia) Compreende (a) estágio promastigota (como em 1 e 2); (b) estágio Epimastigota representado por flagelados alongados com cinetoplasto junto e anterior ao núcleo, flagelo emergindo do corpo lateralmente de um curto reservatório e correndo ao longo de uma membrana ondulante; (c) estágio Amastigota (como em 1 e 2).

5. Gênero **Trypanosoma** - O gênero **Trypanosoma** é caracterizado pelo aparecimento de um novo estágio, representado pela forma tripomastigota. Lembra o estágio Epimastigota do gênero **Blastocrithidia** comumente conhecido por **Crithidia**, mas dêle diferindo pela posição pos-nuclear do cinetoplasto e do ponto de partida do flagelo que emerge de um

curto reservatório lateral e corre ao longo da membrana ondulante.

O flagelado em estudo, isolado de um Fitófago, apresentou as formas de Promastigota e Opisthmastigota levando-nos a situá-lo no gênero **Herpetomonas** tendo em vista as observações de vários autores entre eles **Wallace** (1966) e **Lumsden** (1974) em que a posição do cinetoplasto e saída do flagelo, quando esse existe, são condições chaves na classificação, sendo a forma do corpo um aspecto secundário.

Estudos posteriores serão feitos no sentido de se elucidar a espécie a que pertence o protozoário ora descrito, pelo estudo comparativo com outras espécies de **Herpetomonas** já descritas.

SUMMARY

HERPETOMONAS IN PHYTOFA-
GOUS OF THE GENUS **DYSDER-
CUS** (Hemiptera, Pyrochoridae)

The finding in hemiptera gut (family Pyrochoridae, genus **Dysdercus**) of a flagellate, is described. It grows in Ducrey, Roitman, Modified Roitman, "LIT" and Chemically Defined Media, at temperatures of 25, 28 and 37°C.

Promastigote, lateromastigote (kinetoplast lateral to nucleous), esferomastigote (round promastigote) and opisthmastigote forms were found. Amastigotes were present only in the first examinations.

By the constant presence of promastigote and opisthmastigote forms, we believe to have isolated a flagellate which belongs to the genus **Herpetomonas**.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Zoologista e Pesquisador do Instituto de Ende-

mias Rurais do Rio de Janeiro, Archibaldo Bello Galvão e Dra. Édia de Sena Lustosa pela gentileza de classificarem o inseto hospedeiro; ao Dr. William Barbosa pelas fotografias e colaboração na classificação do protozoário; ao Dr. Isaac Roitman por ter cedido as drogas para o Meio Definido e colaborado na sistemática de classificação do flagelado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMAGO, E.P. - Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 6: 93-100, 1964.
2. CARVALHO, A.L.M. - Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogramus* (Perley, 1834) (Hemiptera Reduviidae). Tese Instituto de Ciências Biológicas Belo Horizonte. Minas Gerais, pp. 82, 1973.
3. CLARK, T.B. - Comparative Morphology of Four Genera of Trypanosomatidae. J. Protozool. 6, 227-232, 1919.
4. FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. - Growth characteristic and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol., 18 (2): 196-202, 1966.
5. GALVÃO, A.B.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, A.L.M. & VEIGA, G.P. - *Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Protozoa). Rev. Goiana de Med. 16: 229-236, 1970.
6. HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. - Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: A New Terminology. Nature. 212 (5068): 1385-1386, 1967.
7. LAID, M. - Blastocrithidia n.g. (Mastigophora: Protomonadina) for Crithidia (in part), with a subarctic record for *B. gerridis* (Patton). Can. J. Zool. 37: 749-52, 1959.
8. LUMSDEN, W.H.R. - Leishmaniasis and Trypanosomiasis: the causative organisms compared and contrasted - in - A Ciba Foundation Symposium - Trypanosomiasis and Leishmaniasis pp. 353, 1974.
9. ROITMAN, C.; ROITMAN, I. & AZEVEDO, H.P. - Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in a defined medium. J. Protozool. 19: 346-349, 1972.
10. WALLACE, F.G. - Flagellate parasites of mosquitoes with special reference to *Crithidia fasciculata* Léger, 1902. J. Parasitol. 29: 196-205 1943.
11. WALLACE, F.G.; CLARCK, T.B.; DYER, M.I. & COLLINS, T. - Two New Species of Flagellates Cultivated from Insects of the Genus *Gerris*. J. Protozool. 7 (4): 390-392, 1960.
12. WALLACE, F.G. - Criteria for the differentiation of genera the trypanosomatid parasites of insects. Proc. Int. Congr. Protozool., Prague 1: 70-74, 1961.
13. WALLACE, F.G. - The Trypanosomatid Parasites of Insects and Arachnids. Exp. Parasitol. 18, 124-133., 1966.