

ESTUDOS CITOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS EM *STENOPHORIDAE* CRAWLEY, 1903 (Eugregarinidae, Protozoa) II — ULTRA-ESTRUTURA *

SYLVIO CELSO GONÇALVES DA COSTA e ORTRUD MONIKA BARTH

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 4 estampas)

O estudo dos esporozoários em geral recebeu pouca atenção dos protozoologistas no período que se seguiu à introdução da microscopia eletrônica como recurso corrente neste campo da ciência. Excetuando-se os parasitos causadores da malária e da toxoplasmose, que nos últimos anos têm merecido maiores cuidados dos pesquisadores, os demais grupos apresentam inúmeros problemas que poderão ser resolvidos com os recursos desta técnica. No que diz respeito às gregarinas alguns problemas foram levantados e suas soluções colocadas em discussão.

GRASSÉ (1957), investigou a estrutura fina da membrana nuclear das gregarinas, enquanto que KUEMMEL (1958), após o exame detalhado em grandes aumentos das estruturas externas e internas de *Belloides* e *Gregarina*, preocupa-se com o movimento destas. A eliminação de muco pelas gregarinas é assunto em discussão, que talvez possa ser resolvido com auxílio dos resultados obtidos em microscopia eletrônica, como já foi de maneira análoga a dos ciliados (GRASSÉ & MUGARD, 1961).

STEIN (1963), apresenta uma análise citoquímica de dois gêneros de gregarinas da família *Actinocephalidae*, enquanto COSTA & LAGE (1964), investigaram o conteúdo de polissacarídeos em *Stenophoridae*.

MATERIAL E MÉTODOS

As gregarinas do gênero *Stenophora* Labbé, 1899 são esporozoários parasitos de *Diplopoda*. Os resultados deste trabalho foram obtidos em exemplares de *Stenophora juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899, parasi-

* Recebido para publicação a 25 de março de 1966
Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz (Divisão de Zoologia, Seção de Protozoologia)

tando *Rhinochricus padbergi* Schubart, 1930, que foram coletados nos terrenos do Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Guanabara.

Microscopia óptica e citoquímica

Para a observação das cristas do envoltório celular, fizemos a digestão dos polissacarídeos, obtendo-se assim um realce destas estruturas. O muco, de reação PAS positiva, foi digerido pela aplicação de hialuronidase liofilizada durante 5 horas à temperatura de 37°C. Para êste uso dissolvemos 150 UTR de hialuronidase liofilizada, comercial, em 1 ml de solução salina a 0,85%. As granulações do citoplasma, que fornecem igualmente uma reação PAS positiva, foram digeridas pela amilase salivar a 37°C durante 2 horas após a fixação; quando êste tratamento foi feito em material destinado à microscopia eletrônica, deixamos as gregarinas com a amilase em tubo de hemólise à mesma temperatura, após lavagem do fixador.

Os cortes que serviram para o estudo da estrutura nuclear nas observações em microscopia ótica e eletrônica, foram tratados pela ribonuclease a 37°C durante 1 a 3 horas. As colorações foram realizadas em esfregaços após digestão cu não dos polissacarídeos, pela Hematoxilina de Heidenhain.

Microscopia eletrônica

Mantidos em solução fisiológica, na qual permaneciam nunca mais de uma hora, as gregarinas foram fixadas em OsO₄ a 0,5% tamponado com acetato e veronal de sódio, adicionando-se NaCl para uma concentração final de 0,9%, durante 15 a 30 min. em temperatura ambiente. Outras foram fixadas em KMnO₄ 2% durante 10 min. em temperatura ambiente.

Após desidratação pela acetona, o material foi incluído em metacrilato, na proporção de 1 parte de metil para 1 parte de butil e polimerizado em cápsulas de gelatina na luz ultravioleta, sob atmosfera de nitrogênio. Os cortes ultrafinos foram obtidos num micrótomo Porter-Blum com navalha de diamante Leitz, variando a espessura entre 150 a 60 m μ , correspondendo à coloração dourada e prateada dos cortes, respectivamente, e esticados com vapor de xilol. Depois de recolhidas nas grades cobertas de colódio foram protegidos por fina camada de carvão, evaporada verticalmente sobre êles.

Para obtenção das micrografias eletrônicas tivemos à nossa disposição um Elmiskop I da Siemens, com adaptação para chapas. Os aumentos diretos no microscópio não ultrapassavam 20.000 x, correndo os aumentos posteriores de ampliações fotográficas.

RESULTADOS

Proto e deutomerito (Est. I, fig. 1) estão cobertos por cristas longitudinais bem visíveis em pequenos aumentos após a eliminação dos polissacarídeos. São muito estreitas e formadas por dobramentos da parede externa da célula ou película (Est. I, fig. 2 e est. II, fig. 5).

Em grandes aumentos, por meio de cortes ultrafinos, revela-se a estrutura do envoltório celular em seus detalhes. A membrana externa (Est. I, fig. 4; est. II, fig. 7; est. III, fig. 12 e est. IV, fig. 14), dupla, emite projeções mais dilatadas, encerrando um lúmen cujo diâmetro transversal na porção apical é um pouco maior do que na parte restante. Além das simples expansões verticais, ocorrem outras laterais partindo daquelas, igualmente revestidas por uma membrana dupla, encerrando também porções do citoplasma formando-se desta maneira um conjunto de canais ramificados na parede externa das gregarinas (Est. I fig. 4). Em corte transversal das cristas observa-se geralmente uma ramificação para cada lado de sua porção vertical, ora reta, ora curvada (Est. II, fig. 7), enquanto que, em cortes oblíquos por esta zona encontramos uma aspecto com numerosas ramificações (Est. I, fig. 4 e est. III, fig. 9). Observa-se que estas encontram-se sempre na metade inferior da crista. A exceção desta regra é constituída pela película do protomerito (Est. III, fig. 12) onde as cristas não apresentam ramificações laterais, mas uma região apical bastante dilatada. Nesta mesma região a película é formada somente por uma membrana dupla, enquanto no deutomerito existe ainda uma outra camada logo abaixo, de estrutura homogênea e a ela intimamente ligada, não participando na formação das cristas.

As cristas são facilmente deformadas por fixações deficientes, apresentando artefatos em forma de cristas baixas e largas, sem ápice dilatado, formando altos e baixos de contornos amenizados, desaparecendo até as ramificações laterais. Muitas vezes, então, a parte interna da parede celular não participa na formação das cristas (Est. IV fig. 15). Em material fixado em KMnO_4 , a película com alguns mionemas a ela aderentes destacava-se do corpo celular fragmentava-se e era encontrada nos cortes enrolada em espiral ao lado do conteúdo celular.

No fundo dos sulcos, entre as cristas, foram observados regularmente numerosos poros na parede externa da gregarina, de diâmetros muito pequenos e que internamente estão em contato com pequenas cavidades ramificadas, repletas de material pouco denso aos elétrons, tanto no protomerito (Est. III, fig. 12) quanto no deutomerito (Est. I, fig. 4; est. II, fig. 7; est. III, fig. 9 e 10). Êstes poros nunca foram encontrados nas cristas, sempre nos sulcos, isto é, nas partes mais profundas da parede celular, onde aparecem isolados ou em pequenos grupos.

Para o interior da célula segue-se uma espessa camada de mionemas tanto circulares, os mais numerosos, quanto longitudinais. O substrato que encerra os mionemas é muito transparente aos elétrons e está em comunicação direta, através os poros, com o meio ambiente, provavelmente correspondendo ao chamado "sarcoplasma". Separando proto do deutomerito existe um septo (Est. I, fig. 3 e est. II, fig. 8), formado por espessa camada de mionemas muito justapostos, que se prolongam também para dentro do protomerito, circundando-o, e ficando mais compacto, quanto mais próximo estiver da parte mais anterior da gregarina.

O citoplasma, quando observado pela microscopia ótica, quer a fresco ou após fixação e coloração pelas hematoxilinas, apresenta-se intensamente granuloso, o que se verifica mais acentuadamente na forma de trofozoito que na de esporonte. Estas granulações dão uma reação PAS positiva, indicando a presença de polissacarídeos na sua constituição; o tratamento prévio pela ptialina, provoca a digestão completa destes grânulos, indicando tratar-se de paraglicogênio, substância de reserva característica dos protozoários. Na microscopia eletrônica estas granulações apresentam-se de forma e tamanho variáveis, desde esféricas, as mais freqüentes, até as formas alongadas e irregulares, não apresentando nenhuma membrana envoltória (Est. I, fig. 3). Observa-se uma nítida diferenciação entre o endoplasma e o ectoplasma, apresentando este último, além das formações secretoras de muco, pequenas e poucas granulações de paraglicogênio e os mionemas. O endoplasma apresenta além destas inclusões, formações osmiofílicas esféricas, pouco menores que as de polissacarídeos, que constituem as inclusões de lipídeos, mas é desprovido de mionemas.

As organelas do citoplasma, cuja observação é um pouco prejudicada pelo grande número de inclusões de paraglicogênio, foram estudadas em material fixado por KMnO_4 que evidencia melhor o sistema de membranas internas. O complexo de Golgi (Est. IV, fig. 13) consistindo de membranas e vesículas, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, foram observados no proto e deutomerito sem uma localização preferencial, ocorrendo geralmente em agrupamentos, juntamente com as inclusões lipídicas, entre os grânulos de paraglicogênio e os demais polissacarídeos. Mitocôndrias foram encontradas também entre os mionemas do septo, mas não ocorrem entre os mionemas periféricos. O protomerito apresenta uma estrutura granular que não caracterizamos citoquimicamente, contendo tanto grânulos pequenos quanto grandes de tonalidade na microscopia eletrônica, provavelmente os polissacarídeos; possui também raras granulações pequenas de paraglicogênio próximas ao septo.

A membrana nuclear quando fixada pelo KMnO_4 mostra com bastante nitidez os poros (Est. II, fig. 8), enquanto que o nucleoplasma

aparece homogêneo e denso. Na fixação pelo OsO_4 o nucleoplasma apresenta-se granular (Est. III, fig. 11) e os poros da membrana são ainda visíveis, havendo uma íntima relação com o citoplasma, e às vezes esta membrana apresenta ainda invaginações. O nucléolo apresenta-se como um corpúsculo arredondado e denso de contorno irregular, com invaginações em vários pontos, conforme se observa também em microscopia óptica. Na sua estrutura observamos dois componentes bem caracterizados, um de natureza fibrilar e outro granular (Est. III, fig. 11), que desaparecem quando observamos cortes tratados pela ribonuclease. Após esta digestão, o nucléolo aparece pouco denso aos elétrons, apresentando uma estrutura homogênea que atribuímos à proteínas básicas, enquanto a estrutura fibrilar e granular é atribuída ao ácido ribonucleico. No interior dos nucléolos encontramos um número variável de vacúolos nucleolares, com grandes zonas transparentes aos elétrons e uns filamentos bastante densos que persistem ao tratameto pela ribonuclease. Não observamos nenhuma película envoltória nem cromatina associada ao nucléolo.

DISCUSSÃO

Comparando os dados acima descritos com os de KUEMMEL (1958) referentes à *Gregarina polymorpha* e *Beloides* sp., há diferenças sensíveis entre eles. A película de *Stenophora juli* assemelha-se mais à de *Beloides*, tanto na forma quanto nas dimensões. Entretanto, o intumescimento e conseqüente separação das membranas duplas das cristas, ao longo de sua altura foi observado em *Stenophora* somente na parte apical das cristas, enquanto que em direção à parte inferior destas, aparecem verdadeiras ramificações laterais, repletas de citoplasma, sem que haja separação entre as membranas. Quanto às cristas de *Gregarina polymorpha* é interessante notar a semelhança de forma com as de *Stenophora* obtidas em cortes por material mal fixado (Est. VI, fig. 15), desaparecendo quase totalmente as ramificações laterais das cristas, havendo, entretanto, separação de membranas, sendo que a interna não acompanha mais toda a dobra pelicular, o que não foi verificado em *Gregarina polymorpha*, onde a dobra é totalmente formada por uma membrana dupla.

Procurando a existência de poros, KUEMMEL (1958) não os encontrou em seu material. GRASSÉ (1953) admite como KUEMMEL, que a secreção de muco ocorre nas cristas. A eliminação de muco nos ciliados, como ficou provado por microfotografias eletrônicas (GRASSÉ & MUGARD, 1961), realiza-se por amplas bolsas mucilaginosas, que se abrem para fora através de um poro, e se localizam regularmente entre os cílios. Pudemos provar a existência de poros também para *Stenophora juli*, o que não exclui a possibilidade de poder haver secreção de muco também através das membranas das cristas. A hipótese da existência de poros levantada

por MUEHL (1921) fica assim provada. Entretanto, a existência de uma camada gelatinosa logo abaixo da película propriamente dita (membrana dupla) cujo conteúdo fôsse eliminado pelos poros não foi comprovada. Existe, somente no deutomerito, abaixo da membrana dupla externa da película, uma camada de natureza desconhecida, atravessada também pelos poros, e deixando ainda passagem ao citoplasma para o interior das cristas que não são revestidas por esta camada. Ela é menos densa que os mionemas a ela aderentes, mais densa que o substrato, o chamado sarcoplasma que contém mucopolissacarídeos e mucoproteínas, elimináveis ao exterior através dos poros. Talvez esta camada de natureza desconhecida corresponda à chamada camada incerta, a "unsichere Schicht" em KUEMML (1958, fig. 4), que, como por êste autor foi assinalado, está intimamente ligada à membrana externa da película (dupla), destacando-se juntamente com ela.

Fazendo parte do ectoplasma as fibrilas do mionema apresentam-se orientadas em duas direções principais, sendo que em *Stenophora* não encontramos uma separação nítida entre região de mionemas circulares e região de mionemas longitudinais. Aqui também não existe uma "ponte ectoplasmática" semelhante à película separando proto de deutomerito, como foi encontrada por KUEMMEL em *Beloides*; em *Stenophora* estas duas porções celulares são separadas por um septo largo e nítido, constituído principalmente de mionemas e não de uma dupla membrana. A presença desta camada de mionemas parece ter sua importância no movimento brusco do protomerito descrito por COSTA & TEIXEIRA (1961) e que consiste na invaginação do protomerito para dentro do deutomerito seguida de uma distensão rápida, que determina um deslocamento acentuado para a frente. Os outros mionemas além da função de movimento, podem ter influência sobre a eliminação do muco através os poros.

Cada uma das duas membranas que constituem o envoltório nuclear é interrompida por numerosos poros, sendo que a maioria das vezes não há uma correspondência entre poros internos e externos, de modo que em cortes encontramos duas membranas onduladas irregularmente (Est. III, fig. 11). Concordamos com BEAMS & COLS (1957) no que se refere às duas camadas externas porosas mas não observamos nenhuma camada cortical diferenciada na região interna e associada à membrana dupla conforme assinalaram êstes autores. A êste respeito GRASSÉ & THÉODORIDÈS (1957) apresentaram uma estrutura diferente, com base nas observações realizadas em diversas gregarinas, especialmente em *Stylocephalidae*. Nesta oportunidade admitiram uma membrana nuclear contínua para as gregarinas.

Quanto à possibilidade da existência de uma membrana envoltória para o nucléolo, como foi levantada por COSTA (1964) com base na microscopia óptica, que observou em cortes corados pela hematoxilina uma

camada envoltória bem mais corada que o interior do nucléolo, os resultados obtidos com a microscopia eletrônica mostram a sua improcedência. Podemos concluir, desta forma, que a película envoltória observada na microscopia óptica é consequência de artefatos de fixação. A microscopia eletrônica, por outro lado, confirma a estrutura heterogênea do nucléolo observada por COSTA (1964) na microscopia óptica e que aqui chamamos de estrutura fibrilar e granular, sensíveis à ação da ribonuclease, e um elemento amorfo sobre o qual não atua a ribonuclease e que deve ser constituído por proteínas básicas como no caso de nucléolos de metazoários. Confirmou-se também a existência de vacúolos nucleolares.

O conteúdo de polissacarídeos do citoplasma do tipo glicogênio (paraglicogênio) e de mucopolissacarídeos, são encontrados nos trofozoitos, aumentando gradativamente em quantidade, e tornando-se máximos nos gamontes, resultados estes que coincidem com as observações de STEIN (1963) em dois gêneros de gregarinas da família *Actinocephalidae*. Desta forma observamos uma constância citoquímica em gregarinas de diferentes gêneros e famílias, apesar das diferenças biológicas e ecológicas dos hospedeiros que pertencem a diferentes classes de Artrópoda.

RESUMO

- 1 — Indivíduos de *Stenophora juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899, parasitos de um *Diplopoda*, *Rhinochricus padbergi* Schubart, 1930 foram examinados em microscopia óptica e eletrônica.
- 2 — Os resultados do estudo citoquímico confirmam os dados obtidos por outros autores em outras espécies de gregarinas.
- 3 — Quanto à estrutura fina da morfologia celular foi examinada detalhadamente a película, a qual apresenta cristas longitudinais de forma e estrutura complexas.
- 4 — Nos sulcos da película, entre as cristas, foram encontrados poros na membrana, por onde é realizada a secreção de muco.
- 5 — Aderente à película, propriamente dita foi encontrada, no deutomerito, uma camada homogênea de natureza desconhecida, abaixo da qual encontra-se o mionema.
- 6 — O septo que separa o proto do deutomerito é constituído por espessa camada de mionemas incluindo numerosas mitocôndrias.
- 7 — O endoplasma é extremamente rico em granulações de paraglicogênio, aparecendo em menor quantidade os lipídeos. Observamos também mitocôndrias, retículo endoplasmático e o complexo de Golgi.

- 8 — Observamos poros na membrana nuclear e o nucléolo que se apresenta contendo vários vacúolos e com uma estrutura filamentar e granular.

SUMMARY

Stenophora juli (Frantzius, 1848) Labbé, 1899, *Sporozoa* parasite of the *Diplopoda Rhinocrius padbergi* Schubart, 1930, were examined by light and electron microscopy. As a result of a cytochemical investigation, similar content to those obtained by other authors has been shown.

Ultrastructure of membrane shows complex microscopic longitudinal folds and among this folds there are pores for mucous secretion. An unknown layer was found under the membrane and upon the mioneme. The sept which divide this protozoa in protomerite and deutomerite is formed by a large mioneme, in which a great number of mitochondria has been shown.

Paraglicogene granules appear present in large quantity in the endoplasm, and lipid inclusions appear in smaller quantity. Mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi complex are also observed in the endoplasm.

The nuclear envelope shows a double-layered structure with pores and the nucleolus has a granular aspect, containing several vacuoles.

AGRADECIMENTO

A parte referente à microscopia eletrônica foi realizada na Seção de Microscopia Eletrônica do Jardim Botânico, a cujo chefe, Dr. Raul D. Machado, desejamos expressar aqui os nossos agradecimentos.

BIBLIOGRAFIA

- BEANS, H. W., TAHMISIAN, T. N. DEVINE, R. & ANDERSON, E., 1957. Ultrastructure of the nuclear membrane of a gregarine parasitic in grasshoppers. *Exp. Cell Res.* 13 (1) : 200-203.
- COSTA, S. C. G. & TEIXEIRA, F. M., 1961, Considerações sobre a biologia do gênero *Stenophora* Labbé, 1899. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro* 5 (5) 38-40, 1 fig.
- COSTA, S. C. G., & LAGE, H. A., 1964, Estudo citoquímico dos polissacarídeos de *Stenophora* Labbé, 1899 (Protozoa, Sporozoa) *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro* 8 (4) : 24-25.
- COSTA, S. C. G., 1964, Considerações sobre a membrana nucleolar e o nucléolomena de *Stenophora* Labbé, 1899 (Protozoa, Sporozoa). *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 8 (6) : 64-66, 4 figs.
- GRASSÉ, P. P. & COLS., 1953, *Tratié de Zoologie. Anatomie, Systematique, Biologie. I Protozoaires.* (II), 1166. Masson et Cie Éditeurs, Paris.

- GRASSÉ, P. P. & THÉODORIDÉS, J., 1957, L'ultrastructure de la membrane nucléaire des gregarines. *C. R. Acad. Sc.* 245 : 1985-1986.
- GRASSÉ, P. P., POISSON, R. A. & TUZET, O., 1961, *Zoologie I — Invertébrés*. VIII (919) Masson & Cie Editeurs, Paris.
- GRASSÉ, P. P. & MUGARD, H., 1963, *Les organites mucifères et la formation du kyste chez Ophryoglena mucifera*. Progress in Protozoology, Proc. 1.^o Inter. Congr. of Protozoology, Prague, August 22-31, 1961. Acad. Press, N. York-London, 417-418.
- KUEMMEL, G., 1958, Die gleitbewegungen der gregarinen. *Arch. f. Protistenkunde*, 102 (3/4) : 501-522.
- MÜHL, D., 1955, Zur Chemie und Zum Submikroskopischen Aufbau der Zellwände scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. *Arch. Mikrobiol* 22 : 45-77.
- STEIN, G. A., 1963, *Cytochemical study of some stage of life cycle of polycystic gregarines*. Progress in Protozoology, Proc. 1.^o Inter. Congr. of Protozoology, Prague, August 22-31, 1961. Acad. Press, N. York-London, 294-295.

ESTAMPA I

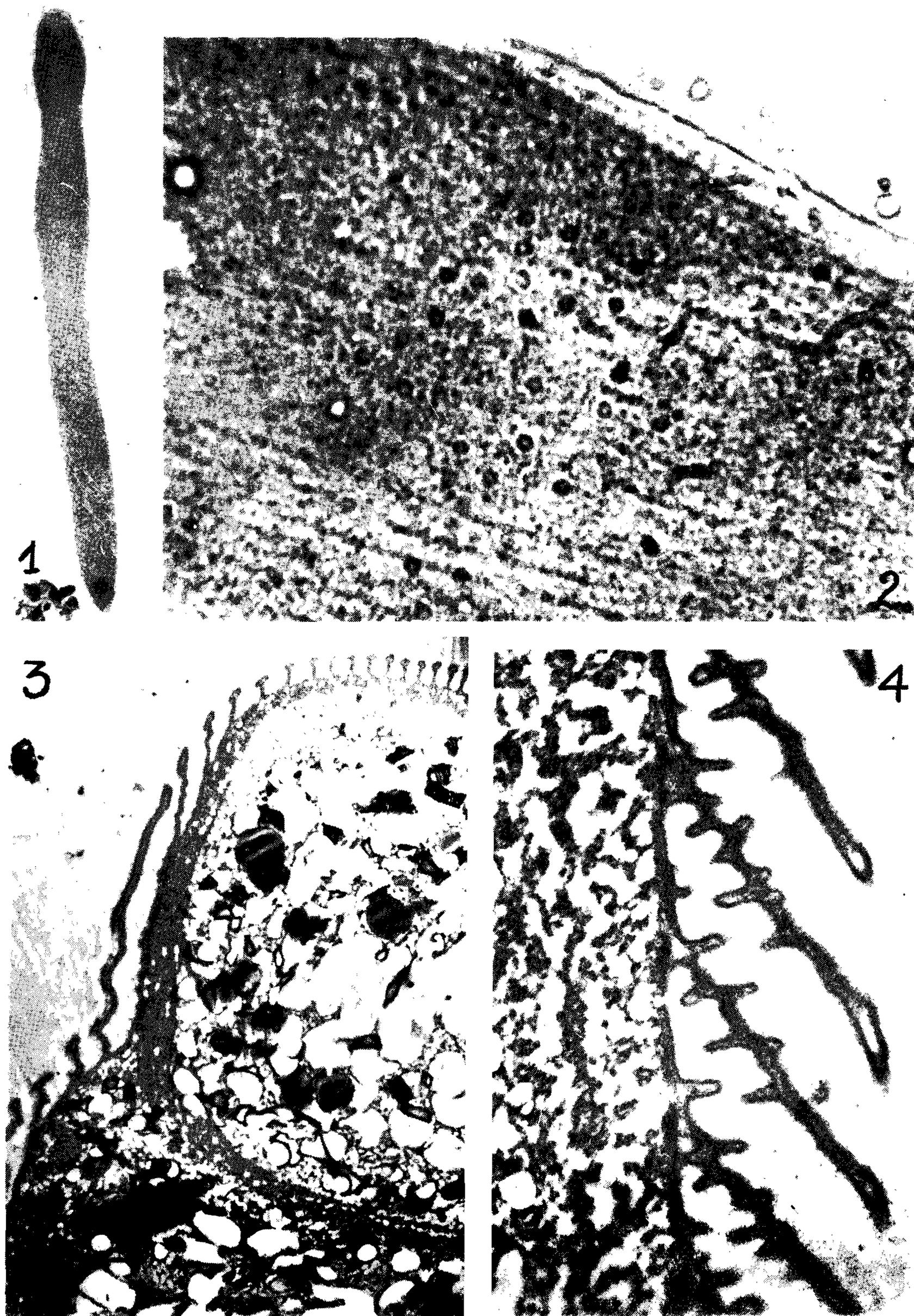
(Salvo indicação contrária, a fixação do material estudado em microscopia electrónica foi feita em OSO.)

Fig. 1 — Em microscopia óptica — animal inteiro.

Fig. 2 — Idem — aspecto das estrias. (Imersão).

Fig. 3 — Micrografia electrónica — corte longitudinal; protomerito, septo e parte do deutomerito. (5.000 x)

Fig. 4 — Idem: corte obliquo pela película do deutomerito, observando-se um poro noc entro da figura; abaixo da película está a região dos mionemas (7.500 x).



COSTA & BARTH: Stenophoridae Crawley. II

ESTAMPA II

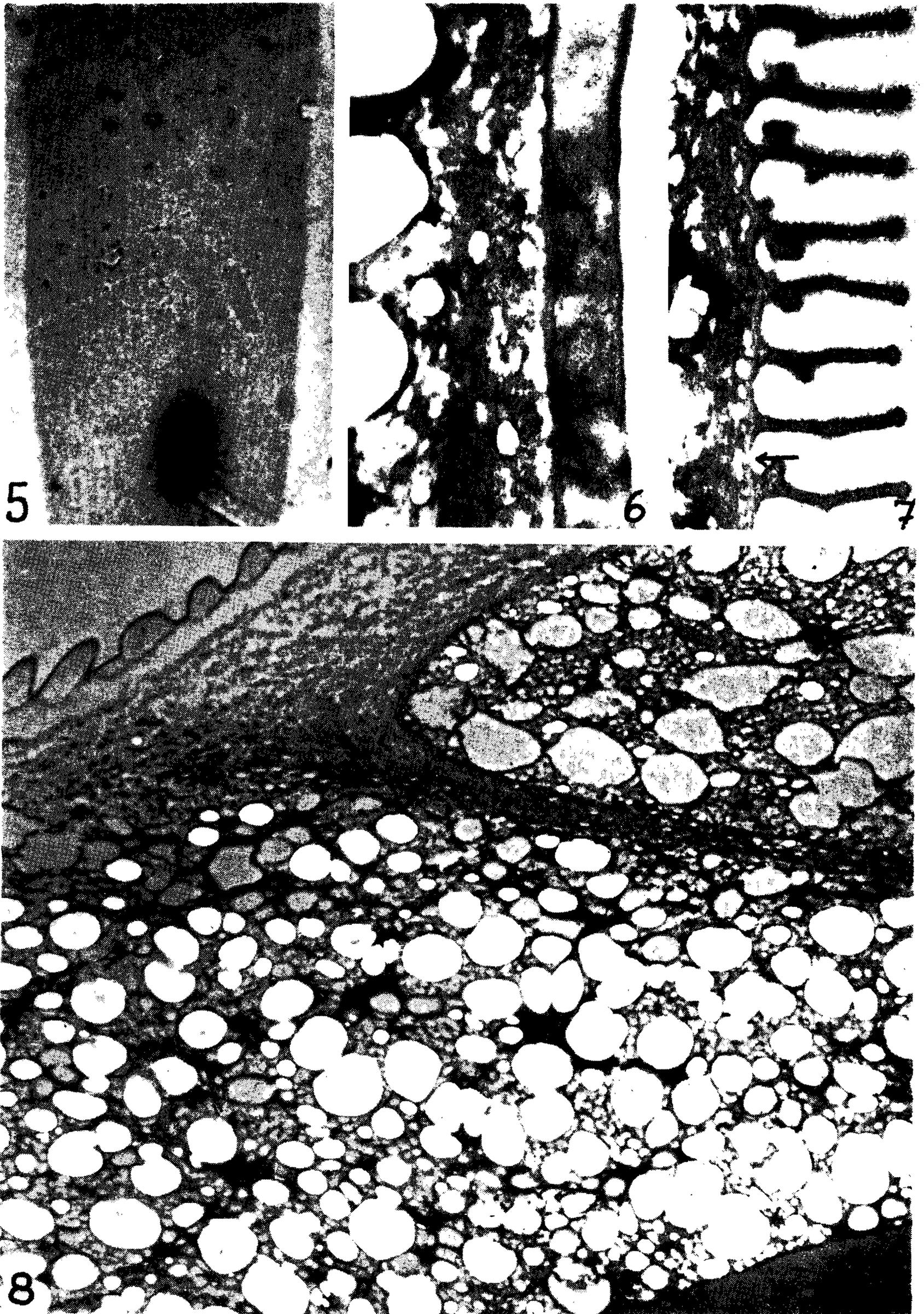
(Salvo indicação contrária, a fixação do material estudado em microscopia electrónica foi feita em OSO_4 .)

Fig. 5 — Em microscopia óptica: estrias e nêcleos na região posterior.

Fig. 6 — Micrografia electrónica: corte longitudinal por uma crista do deutomerito (15.000 x).

Fig. 7 — Idem — corte transversal pelo deutomerito; a seta indica a presença de um poro. Abaixo da pel'cula está a camada de mionemas, a maior parte dêstes orientada em sentido circular. (15.000 x).

Fig. 8 — Idem: corte longitudinal; fixação com KMnO_4 ; protomerito, septo com mitocôndrias e deutomerito com paraglicogênio em grande quantidade. À direita, em baixo, parte do nêcleo. À esquerda, em cima, a pel'cula destacou-se da camada de mionemas. (5.250x).



ESTAMPA III

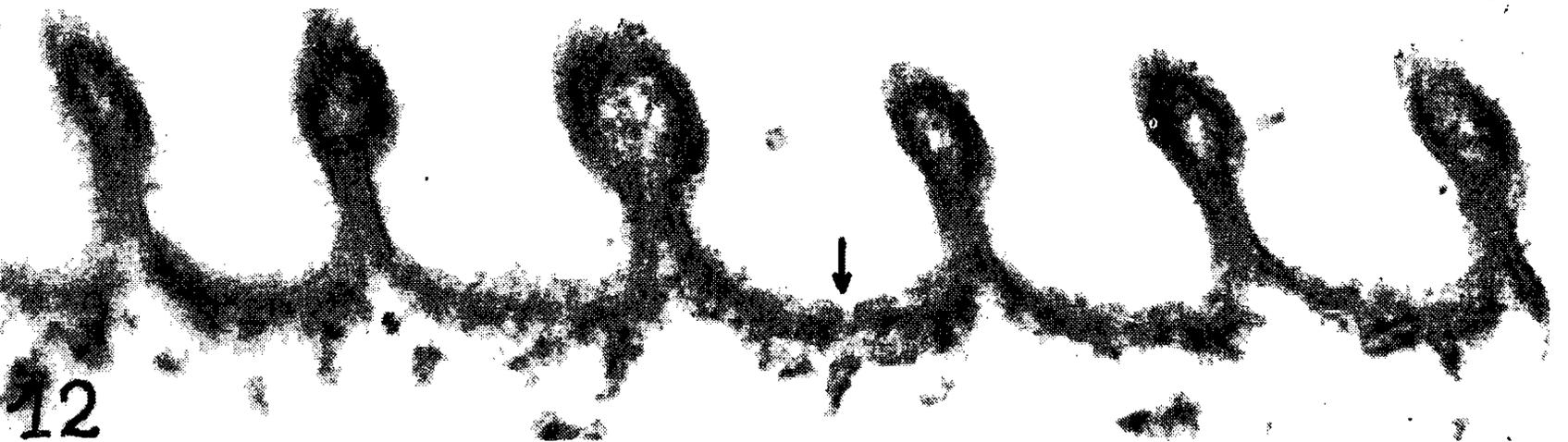
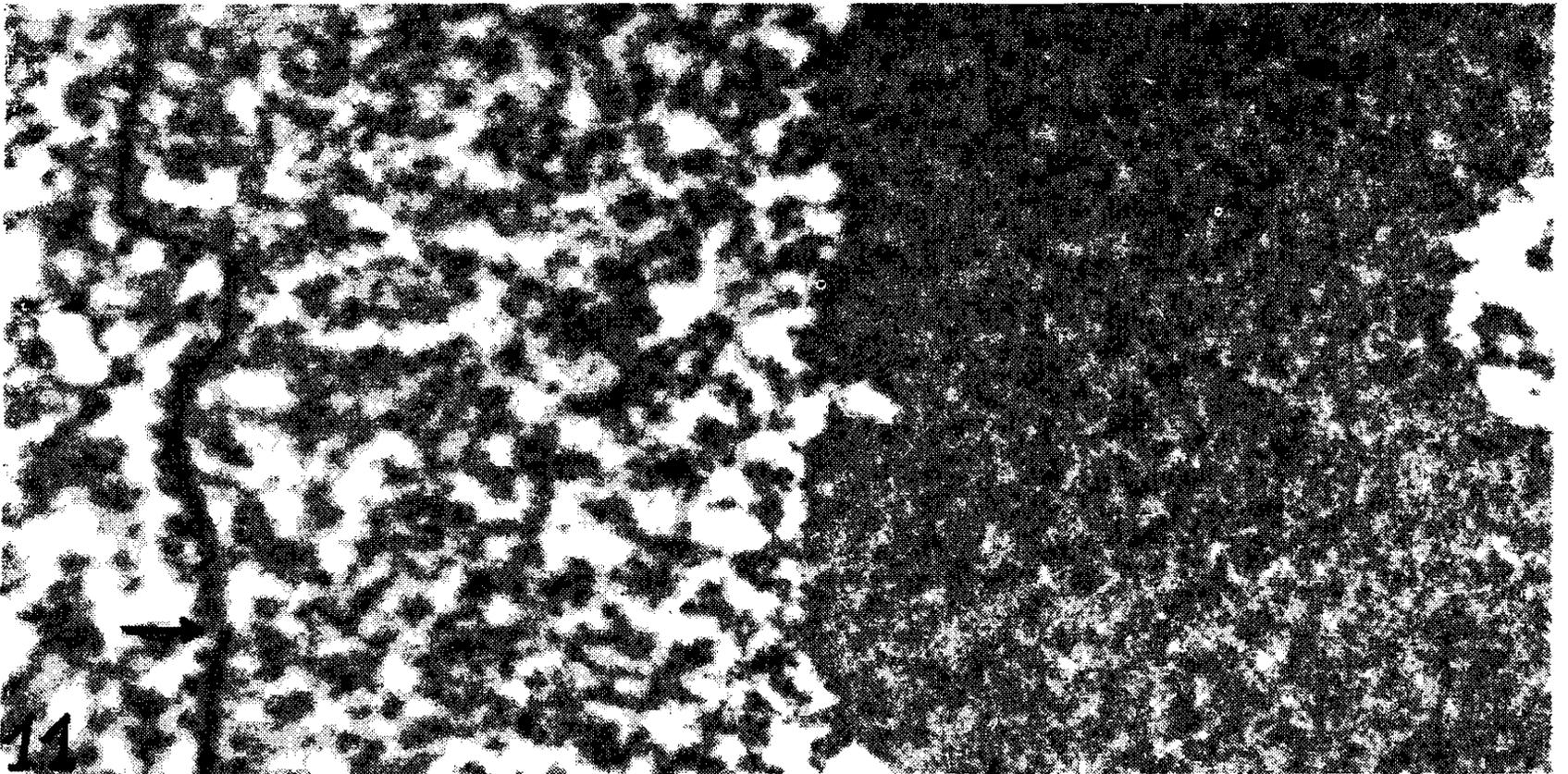
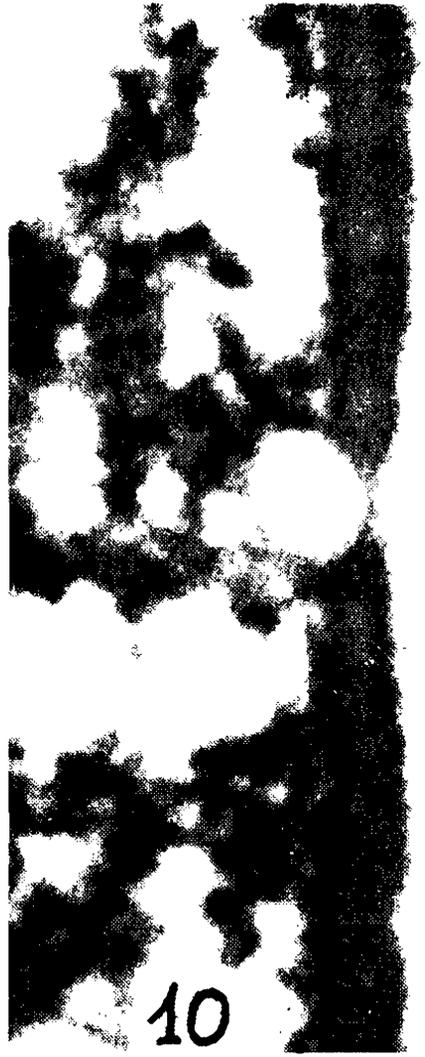
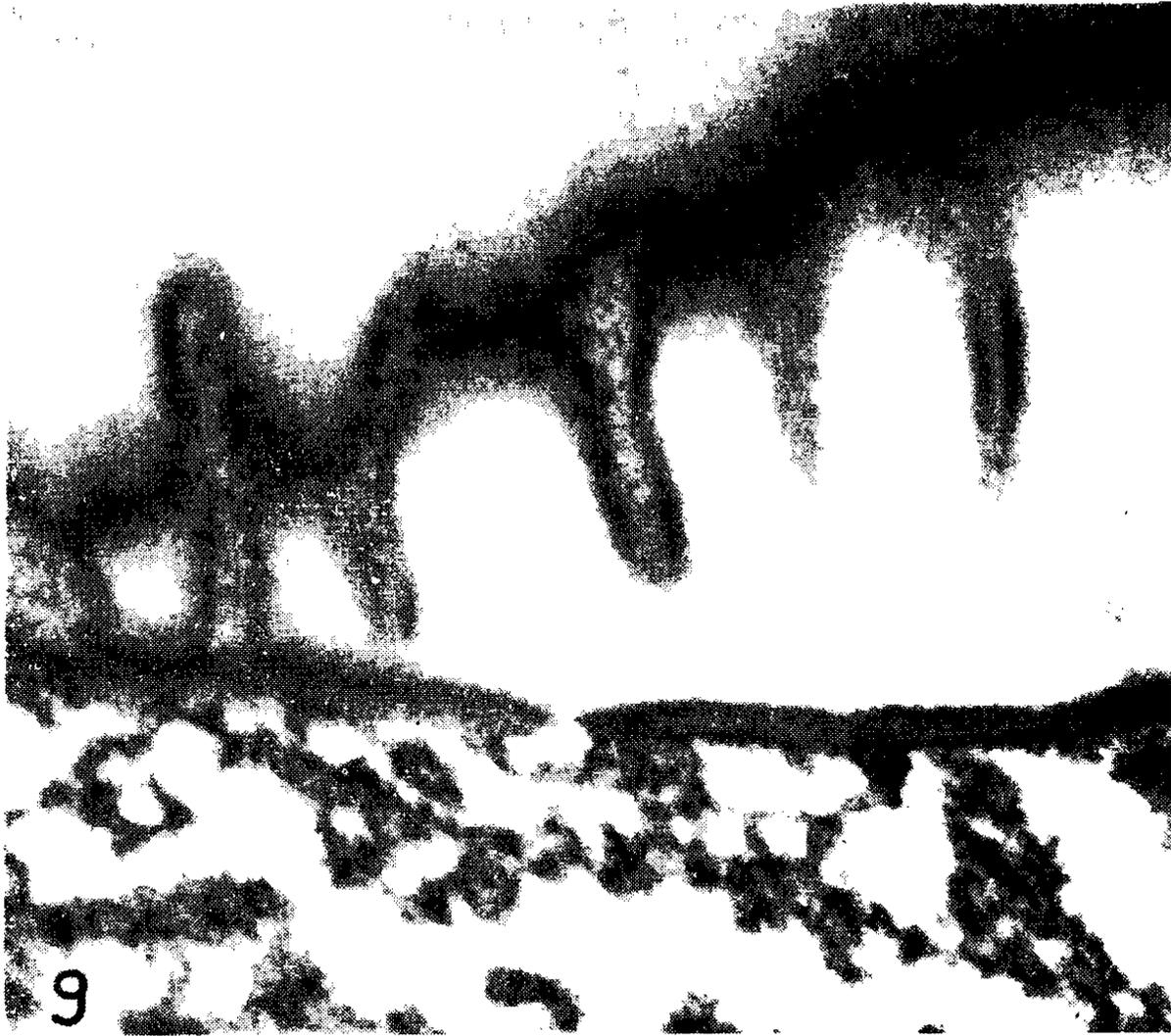
(Salvo indicação contrária, a fixação do material estudado em microscopia eletrônica foi feita em OSO.)

Fig. 9 — Micrografia eletrônica — corte obl'quo pela pel'cula no deutomerito, observando-se um poro de contôrno irregular (40.000 x).

Fig. 10 — Idem: corte transversal por um poro do deutomerito, atingindo na parte externa a margem do poro (80.000 x).

Fig. 11 — Idem: membrana nuclear com poro (seta), núcleo com vacúolo (40.000 x).

Fig. 12 — Idem: corte transversal pela pel'cula do protomerito, atingindo um poro na região central da figura (seta). Observar a membrana dupla formando as cristas (15.000 x).



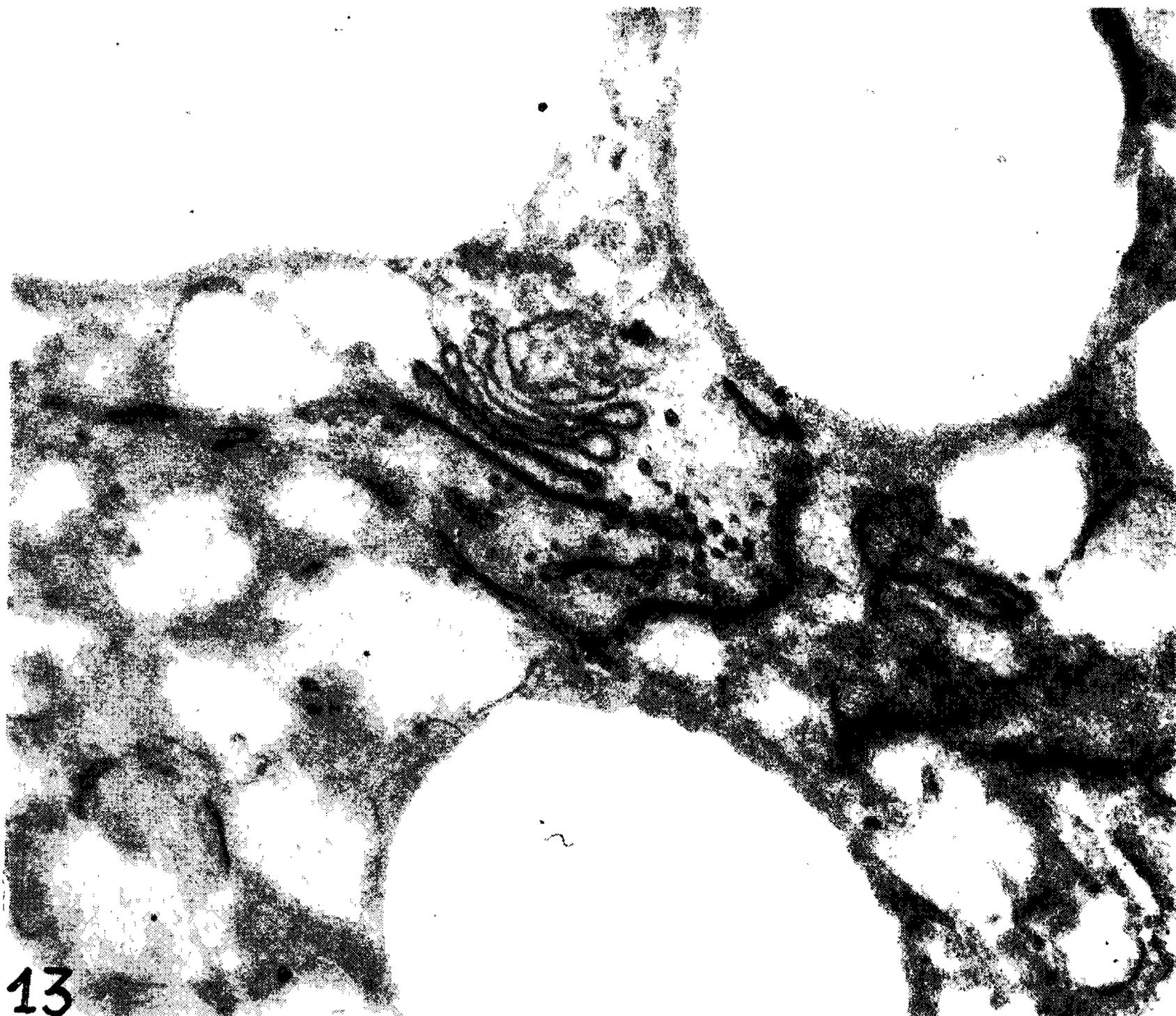
ESTAMPA IV

(Salvo indicação contrária, a fixação do material estudado em microscopia eletrônica foi feita em OSO.)

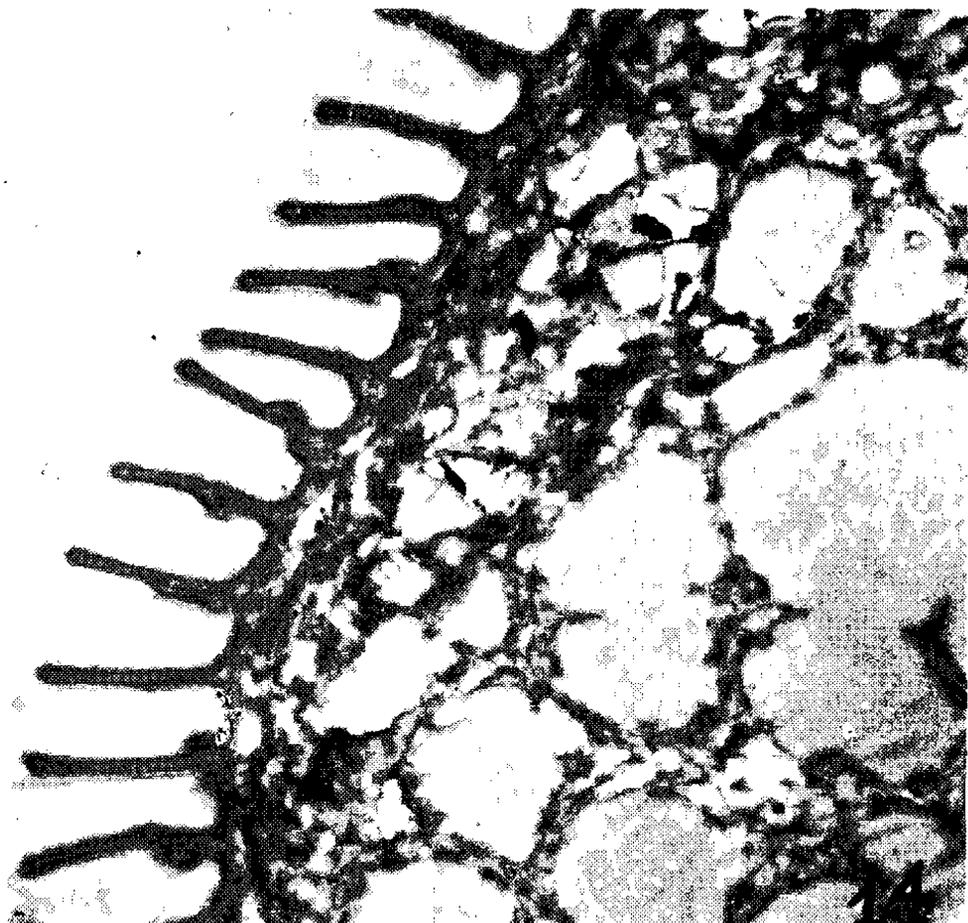
Fig. 13 — Micrografia eletrônica: material fixado por KMnO_4 , inclusões no deutomerito — grãos grandes de paraglicogênio, aparelho de Golgi com vesículas e retículo endoplasmático. (60.000 x).

Fig. 14 — Idem: corte transversal pelo deutomerito após tratamento prévio com ptialina, apresentando as regiões que sofreram digestão enzimática. (10.000 x).

Fig. 15 — Idem: película, artefato de fixação muito demorada. (15.000 x).



13



14



15