

## TRÊS NOVAS ESPÉCIES DE TRIPANOSOMATÍDEOS DE INSETOS ISOLADOS EM ALFENAS, MINAS GERAIS, BRASIL

JOÃO EVANGELISTA FIORINI, PAULO MÁRCIO DE FARIA E SILVA, MAURÍLIO JOSÉ SOARES\* & REGINALDO PEÇANHA BRAZIL\*\*

Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Caixa Postal 221, 37130 Alfenas, MG, Brasil \*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ e Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro \*\*Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, 21944 Rio de Janeiro, Brasil

**Three new species of trypanosomatidae isolated in Alfenas, Minas Gerais, Brazil** – *Three new species of trypanosomatids were isolated from two species of flies: Herpetomonas anglusteri n. sp., from Liopygia ruficornis (Diptera: Sarcophagidae); Crithidia roitmani n. sp. and Crithidia desouzai n. sp., from Ornidia obesa (Diptera: Syrphidae). All were axenically cultivated in both complex and defined media and cloned. Giemsa stained preparations showed typical choanomastigotes for Crithidia and promastigotes, paramastigotes, and opisthomastigotes for Herpetomonas. H. anglusteri did grow in a complex medium at 28 and 37 °C, but in a defined medium only at 28 °C. C. roitmani does not grow in coconut's water but C. desouzai grow. Both Crithidia do not require hemin, adenine, and any vitamins and amino acids of the defined medium used in the assay, which suggests that these trypanosomatids may bear endosymbionts.*

Key words: isolation – trypanosomatids – endosymbiont – nutritional study – *Herpetomonas anglusteri* n. sp. – *Crithidia roitmani* n. sp. – *Crithidia desouzai* n. sp.

O isolamento de tripanosomatídeos inferiores de insetos tem contribuído consideravelmente para uma melhor compreensão da biologia deste importante grupo de protozoários (McGhee & Cosgrove, 1980). Assim como outros microrganismos, esses protozoários têm sido utilizados em estudos nutricionais, bioquímicos, ultraestruturais, imunológicos e genéticos, além de serem excelentes modelos para o estudo de ação de drogas quimioterapêuticas (Roitman et al., 1972; Mundim et al., 1974; De Souza et al., 1976; Angluster et al., 1977; De Souza et al., 1977; Mundim & Roitman, 1977; Esteves et al., 1979; Alviano et al., 1981; Castellanos et al., 1981; Fiorini et al., 1985; Roitman et al., 1985; Nakamura & Pinto, 1986).

Algumas espécies tais como *Crithidia deanei*, *Crithidia oncopelti* e *Blastocrithidia culicis*, portadoras de endossimbiontes semelhantes a bactérias, têm sido analisadas detalhadamente devido ao fato de que o endossimbionte interfere em seu metabolismo suprindo-as com nutrientes essenciais exigidos por cepas não portadoras de

endossimbionte (Gutteridge & Macadam, 1971; Carvalho, 1973; Chang, 1975; Mundim et al., 1974; Chang, 1976; Camargo & Freymulleir, 1977; Mundim & Roitman, 1977).

Recentemente iniciamos um programa visando o isolamento e caracterização de tripanosomatídeos de insetos coletados em Alfenas, Minas Gerais. Três amostras isoladas mostraram características tais que nos levaram a considerá-las como espécies novas, com base em análise morfológica e estudo das exigências nutricionais.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Isolamento** – Os parasitas do gênero *Crithidia* foram isolados do intestino médio e posterior do inseto *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae), e do gênero *Herpetomonas* foram isolados do intestino posterior de *Liopygia ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), coletados na cidade de Alfenas, Minas Gerais, Brasil (Faria e Silva et al., 1986; Fiorini et al., 1986). Os flagelados não foram encontrados nas glândulas salivares, hemolinfa ou tubos de Malpighi e em ambos os casos, estavam livres na luz do tubo intestinal. As critídiás foram isoladas de dois exemplares coletados em épocas diferentes. O meio de cul-

Trabalho financiado pelo CNPq.

Recebido em 13 de julho de 1988.

Aceito em 3 de janeiro de 1989.

tivo utilizado para o isolamento foi o meio complexo de Roitman (Roitman et al., 1972) adicionado de 0,028 mg/ml de gentamicina ou uma mistura de penicilina (200 UI/ml), estreptomicina (2 mg/ml) e nistatina (100 UI/ml). Os insetos foram lavados com estas soluções de antibióticos, congelados e posteriormente dissecados. Os segmentos intestinais onde foram encontrados os flagelados foram então transferidos para o meio complexo de Roitman e mantidos a 28 °C sendo os repiques realizados a intervalos de 48 horas. O controle de contaminação por fungos e bactérias foi realizado através de observações microscópicas a fresco e após coloração pelos métodos de Giemsa e Gram.

**Clonagem** – Os clones foram obtidos em placas de ágar-sangue de carneiro desfibrinado, utilizando-se como líquido solvente o meio complexo de Roitman. Diluições dos protozoários contendo aproximadamente um organismo por campo microscópico (10X) foram semeadas nas placas e estas incubadas a 28 °C por um período máximo de sete dias.

**Morfometria** – Estudos morfológicos e morfométricos foram realizados após coloração pelo método de Giemsa. Para a medida dos protozoários utilizou-se uma câmara clara acoplada ao microscópio.

**Estudos nutricionais** – Estes estudos foram conduzidos segundo a técnica da omissão dos substratos presentes no meio de cultivo de composição química definida utilizado neste trabalho (Roitman et al., 1972). Para estes estudos foi utilizado apenas um clone de cada amostra isolada. Os outros clones foram transferidos separadamente para o meio de manutenção e criopreservados para posteriores estudos.

**Inóculos** – Os inóculos foram obtidos no meio de composição química definida de Roitman ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) e os resultados dos estudos nutricionais representam a média de pelo menos três determinações realizadas em duplicata. Atualmente, os protozoários encontram-se no 84<sup>o</sup> sub-cultivo.

## DESCRIÇÃO

### *Herpetomonas anglusteri* sp. n.

Hospedeiro: *Liopygia ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae).

Localização no hospedeiro: intestino posterior.

Local: Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

O flagelado apresenta cinetoplasto nas posições anterior, lateral e posterior ao núcleo. Células provenientes do inseto mostram-se isoladas, em sua maioria na forma opistomastigota. Células cultivadas a 28 °C por 48 horas, em meio complexo de Roitman e a 37 °C no mesmo meio, apresentam-se nas formas promastigota e opistomastigota, cilíndricas ou lanceoladas. Formas opistomastigotas podem ser encontradas com maior frequência em culturas de 96 horas a 28 °C tanto em meio complexo como quimicamente definido ou a 37 °C, após 72 horas, em meio complexo. A Tabela I mostra o crescimento do protozoário em meio complexo bem como a taxa de diferenciação do flagelado, nas temperaturas de 28 e 37 °C.

O protozoário cresce bem em diferentes meios a 28 e 37 °C, mas não houve crescimento a 37 °C em meio definido de Roitman (Tabela II).

Na Tabela III encontram-se os dados referentes às exigências nutricionais do flagelado, que cresce em uma concentração osmótica variando de 250 a 1.110 mOsm, (ótimo 490 mOsm), e em pH entre 3,0 a 8,0 (ótimo 6,5).

Os dados morfométricos desse protozoário estão representados na Tabela IV.

Esta espécie designamos como *Herpetomonas anglusteri*, em homenagem ao Dr. Jayme Angluster, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, Brasil, pela sua contribuição no campo da Protozoologia, em especial ao melhor conhecimento das estruturas superficiais dos tripanosomatídeos inferiores.

### *Crithidia roitmani* sp. n.

Hospedeiro: *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae).

Localização no hospedeiro: intestino médio e posterior.

Local: Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

O flagelado apresenta uma forma predominantemente coanomastigota com cinetoplasto anterior e paralelo ao núcleo, além de algumas células com aspecto de promastigota com flagelo de tamanho variável.

TABELA I

Crescimento e diferenciação de *Herpetomonas anglusteri* a 28 e 37 °C em meio complexo\*

Tempo horas	Crescimento					
	28 °C			37 °C		
	Unidades Klett	x 10 <sup>6</sup> Células/ml	Opistomastigota %	Unidades Klett	x 10 <sup>6</sup> Células/ml	Opistomastigota %
0	0	1,5	0	0	1,5	0
12	23	5,8	1	19	4,1	3
24	28	7,6	0	23	5,4	5
36	62	18,4	3	45	13,8	6
48	80	34,6	6	76	31,7	17
60	111	66,7	17	98	44,2	28
72	173	92,1	21	116	70,4	46
84	199	108,1	23	137	78,2	47
96	228	120,6	30	150	84,3	55

\* Meio complexo de Roitman.

TABELA II

Crescimento de *Herpetomonas anglusteri*, *Crithidia roitmani* e *Crithidia desouzai* em diferentes meios a 28 e 37 °C

Meios	Crescimento <sup>+</sup>					
	28 °C			37 °C		
	Ha*	Cr**	Cd***	Ha	Cr	Cd
Complexo Roitman	96	120	130	81	0	0
Definido Roitman	80	65	80	0	0	0
NNN	78	95	110	82	0	0
Água de coco	70	0	65	56	0	0
LIT	82	104	116	80	0	0

<sup>+</sup> Em unidades Klett após 48 horas de incubação.\* *Herpetomonas anglusteri*.\*\* *Crithidia roitmani*.\*\*\* *Crithidia desouzai*.

TABELA III

Exigências nutricionais de *Herpetomonas anglusteri*, *Crithidia roitmani* e *Crithidia desouzai* cultivados em meio definido a 28 °C

Substrato	Comportamento		
	Ha*	Cr**	Cd***
Hemina	exige	não exige	não exige
Adenina	exige	não exige	não exige
Ácidos aminados	não exige treonina	não exige: isoleucina, lisina fenilalanina, triptofânio, valina e treonina	não exige: isoleucina, lisina, fenilalanina, triptofânio, valina e treonina
Vitaminas	não exige biotina	não exige: ácido fólico, piridoxamina	não exige: ácido fólico, piridoxamina

\* *Herpetomonas anglusteri*.\*\* *Crithidia roitmani*.\*\*\* *Crithidia desouzai*.

TABELA IV

Morfometria de *Herpetomonas angulsteri*, *Crithidia roitmani* e *Crithidia desouzai* cultivados a 28 °C em meio definido, após 48 h

	Medidas <sup>+</sup>		
	Ha*	Cr**	Cd***
Comprimento total	16,3	13,1	11,5
Comprimento do corpo	15,0	6,5	4,7
Flagelo livre	10,0	7,0	7,3
Largura do corpo	4,8	3,3	2,9

<sup>+</sup> Valores médios em  $\mu\text{m}$ , obtidos após 100 medições de cada espécie.

\* *Herpetomonas angulsteri*.

\*\* *Crithidia roitmani*.

\*\*\* *Crithidia desouzai*.

O crescimento do flagelado foi observado em diferentes meios a 28 °C, com exceção em água de coco, porém a 37 °C não houve crescimento em qualquer dos meios (Tabela II).

Os dados referentes às exigências nutricionais desse protozoário encontram-se na Tabela III. Nota-se que vários ácidos aminados e algumas vitaminas presentes no meio definido utilizado no cultivo, não são exigidos, bem como hemina e adenina.

A Tabela IV mostra os dados referentes à morfometria do flagelado, que cresceu em uma

faixa de pH entre 2,0 a 11,0 (ótimo 7,0), e em uma concentração osmótica variando de 250 a 1.110 mOsm (ótimo 490 mOsm).

O crescimento do flagelado nos meios complexo e definido de Roitman, a 28 °C, está representado na Tabela V.

Esta espécie designamos como *Crithidia roitmani* em homenagem ao Dr. Isaac Roitman, atual Decano de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Brasília, Brasil, pelos relevantes trabalhos realizados na área de tripanosomatídeos inferiores, particularmente no que tange ao isolamento, nutrição e bioquímica.

*Crithidia desouzai* sp. n.

Hospedeiro: *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae).

Localização no hospedeiro: intestino médio e posterior.

Local: Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

Assim como *C. roitmani*, *C. Desouzai* apresenta forma predominantemente coanomastigota, porém seu tamanho médio é menor (Tabela IV) e seu crescimento exuberante ocorre já com 24 horas de incubação a 28 °C, tanto em meio complexo como em meio definido de Roitman (Tabela V).

TABELA V

Crescimento de *Crithidia roitmani* e *Crithidia desouzai* em meios complexo e definido\* a 28 °C

Tempo horas	Crescimento**							
	Meio complexo				Meio definido			
	Cr <sup>+</sup>		Cd <sup>++</sup>		Cr		Cd	
	U. K.	x 10 <sup>6</sup> ***	U. K.	x 10 <sup>6</sup>	U. K.	x 10 <sup>6</sup>	U. K.	x 10 <sup>6</sup>
0	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0	1,5
12	25	6,0	32	7,1	13	3,4	20	4,7
24	42	28,5	79	37,6	34	7,5	49	25,6
36	54	30,6	120	64,2	41	26,4	65	31,2
48	79	38,8	155	78,2	55	31,7	71	34,5
60	155	80,7	180	97,4	82	40,0	87	43,6
72	205	110,3	210	111,5	94	51,7	95	52,0
84	230	120,8	215	113,1	111	60,3	107	59,8
96	260	128,5	240	124,2	120	65,1	116	62,6

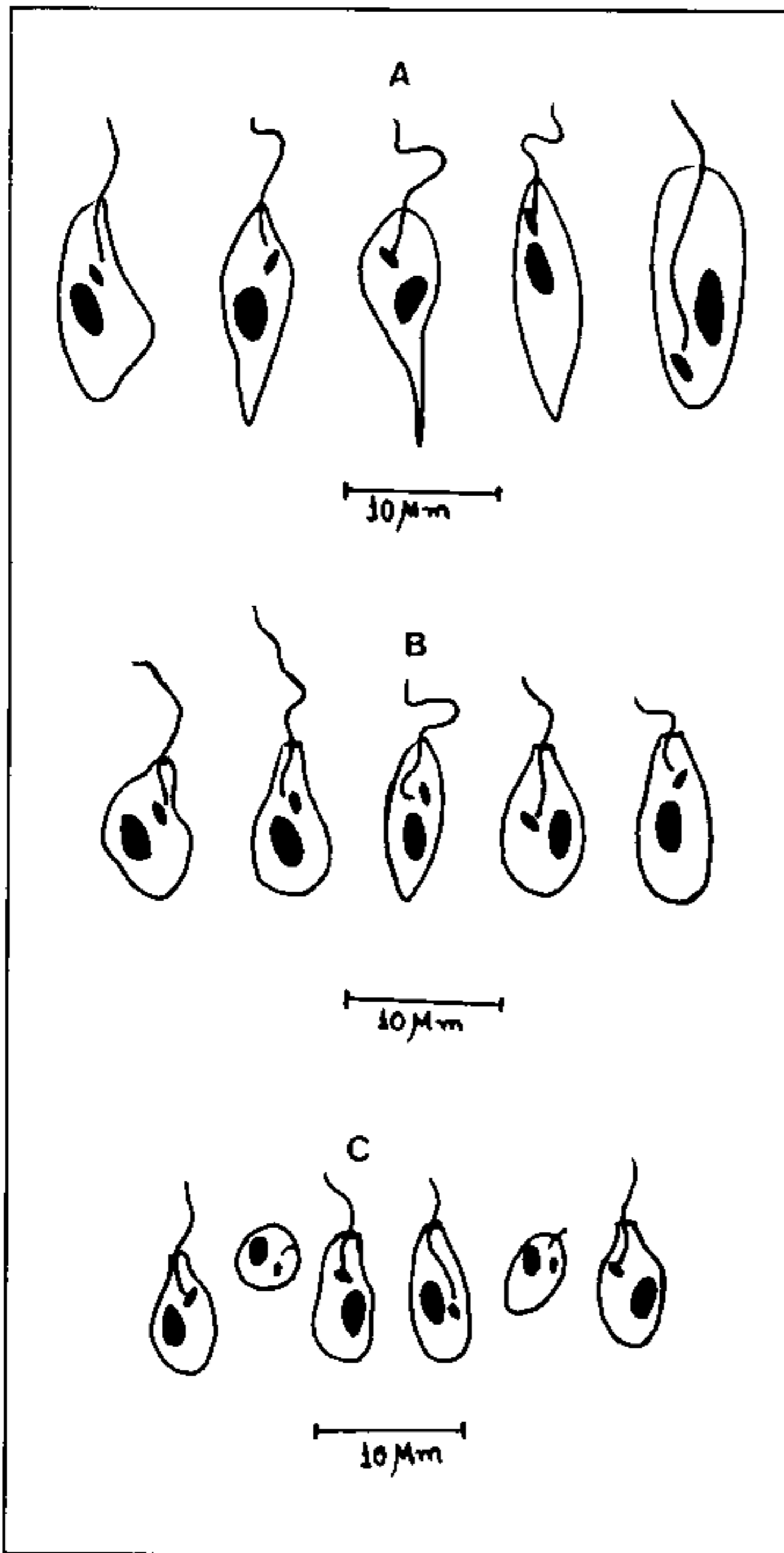
\* Meios complexo e definido de Roitman.

\*\* Em unidades Klett (UK).

\*\*\* x 10<sup>6</sup> células/ml.

<sup>+</sup> *Crithidia roitmani*.

<sup>++</sup> *Crithidia desouzai*.



Desenhos em câmara clara de tripanosomatídeos obtidos de cultura de 24 horas, a 28 °C, em meio definido de Roitman. A: *Herpetomonas anglusteri*. B: *Crithidia roitmani*. C: *Crithidia desouzai*.

Formas coanomastigotas típicas e algumas dos tipos amastigota e esferomastigota foram observadas tanto no inseto como na cultura.

O crescimento nos diferentes meios a 28 °C está representado na Tabela II. O flagelado não cresce a 37 °C em qualquer dos meios testados.

O flagelado também não exige hemina, adenina, alguns ácidos aminados e vitaminas, como mostra a Tabela III. Cresce em uma faixa de osmolaridade variando de 250 a 1.110 mOsm (ótimo 490 mOsm) e em valores de pH situados entre 3,0 a 8,0 (ótimo 7,0).

Esta espécie designamos como *Crithidia desouzai* em homenagem ao Dr. Wanderley de Souza, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Brasil, pela sua contribuição ao estudo da ultraestrutura de protozoários com ênfase especial aos tripanosomatídeos.

#### RESUMO

**Três novas espécies de tripanosomatídeos isoladas em Alfenas, Minas Gerais, Brasil** — Três novas espécies de tripanosomatídeos foram isoladas em Alfenas, MG, Brasil: *Herpetomonas anglusteri* sp. n., do intestino posterior de *Liopygia ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae); *Crithidia roitmani* sp. n. e *Crithidia desouzai* sp. n., do intestino médio e posterior de *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae). O isolamento foi feito em meio complexo de Roitman mas os três isolados cresceram bem no meio definido do mesmo Autor. Os clones foram obtidos em ágar-sangue de carneiro, desfibrinado, em placas de Petri, a 28 °C, por 2-7 dias. Um único clone de cada espécie foi utilizado neste trabalho. Dados morfológicos e morfométricos foram obtidos em câmara clara após coloração dos flagelados. *H. anglusteri* cresceu em meio complexo tanto a 28 como a 37 °C e, em meio definido, apenas a 28 °C. Não exige treonina e biotina para seu crescimento. *C. roitmani* apresenta tamanho médio maior que *C. desouzai*, não cresce em água de coco e seu crescimento é mais lento comparativamente a *C. desouzai*, apesar de terem sido isoladas da mesma espécie de inseto. Nenhuma das critídiás exige hemina e adenina para seu crescimento. Alguns ácidos aminados e vitaminas componentes do meio definido utilizado no ensaio, também não são exigidos, o que sugere serem estes tripanosomatídeos portadores de endossimbiontes.

Palavras-chave: isolamento — tripanosomatídeos — endossimbiontes — estudo nutricional — *Herpetomonas anglusteri* sp. n. — *Crithidia roitmani* sp. n. — *Crithidia desouzai* sp. n.

#### REFERÊNCIAS

- ALVIANO, C. S.; SOUZA, E. T.; ESTEVES, M. J. G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W., 1981. Effect of Concanavalin A on the surface of *Herpetomonas Samuelpessoai*. *J. Submicrosc. Cytol.*, 13: 619-626.  
 ANGLUSTER, J.; BUNN, M. M. & DE SOUZA, W., 1977. Effect of 2-deoxy-D-glucose on differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*. *J. Parasitol.*, 63: 922-924.  
 CAMARGO, E. P. & FREYMULLER, E., 1977. Endossimbionte as a supplier of ornithine carba-

- moil transferase in a trypanosomatid. *Nature*, 270: 52-53.
- CARVALHO, A. L. M., 1973. Estudos sobre a posição sistemática, biologia, e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Pat. Trop.*, 2: 223-274.
- CASTELLANOS, G. B.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W., 1981. Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai* by dimethylsulfoxide. *Acta Trop.*, 38: 29-37.
- CHANG, K. P., 1975. Reduced growth of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* freed of intracellular symbiontes by chloramphenicol. *J. Protozool.*, 22: 271-276.
- CHANG, K. P., 1976. Symbionte-free hemoflagellates *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*, their liver factor requirement and serological identity. *J. Protozool.*, 23: 241-244.
- DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J. & BUNN, M. M., 1977. Cytochemical detection of cytochrome oxidase on the mitochondrion-Kinetoplast of *Herpetomonas samuelpessoai*. Influence of the growth medium. *J. Submicrosc. Cytol.*, 9: 355-361.
- DE SOUZA, W.; ROSSI, M. A.; KITAJIMA, E. W.; SANTOS, R. R. & ROITMAN, I., 1976. An electron microscopic study of *Herpetomonas* sp. and *Leptomonas pessoai*. *Can. J. Microbiol.*, 22: 197-203.
- ESTEVEZ, M. J. G.; SIXEL, J. L.; ANGLUSTER, J.; ELIAS, C. A. & DE SOUZA, W., 1979. Effect of ultraviolet and gamma radiations on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Trop.*, 36: 257-266.
- FARIA E SILVA, P. M.; RODRIGUES, M.; CHINI, H. A. S.; DE SOUZA, W. & FIORINI, J. E., 1986. *Crithidia* isolated from bug *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl.* 81: 58.
- FIORINI, J. E.; ALVIANO, C. S.; ESTEVES, M. J. G.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. & ROITMAN, I., 1985. Effect of lipopolysaccharide (LPS) on the metabolism and cell surface of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae*. *Com. Biochem. Physio.*, 80 B: 537-542.
- FIORINI, J. E.; FARIA E SILVA, P. M.; BRAZIL, R. P.; ROITMAN, I. & ANGLUSTER, J., 1986. Isolation and cloning of a trypanosomatid from *Oxysarcodexia* sp. (Diptera: Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Suppl.*, 81: 57.
- GUTTERIDGE, W. E. & MACADAM, R. F., 1971. An electron microscopic study of the bipolar bodies in *Crithidia oncopelti*. *J. Protozool.*, 18: 637-640.
- MCGHEE, R. B. & COSGROVE, B., 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.*, 44: 140-173.
- MUNDIM, M. H. V. M. & ROITMAN, I., 1977. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *J. Protozool.*, 24: 329-331.
- MUNDIM, M. H. V. M.; ROITMAN, I.; HERMANS, M. A. & KITAJIMA, E. W., 1974. Simple nutrition of *Crithidia deanei*: a reduvid trypanosomatid with an endosymbiont. *J. Protozool.*, 21: 518-521.
- NAKAMURA, C. V. & PINTO, A. S., 1986. Effect of sodium butyrate on growth and cell differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* cultivated in a defined medium at 28 and 37 °C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl.*, 81: 34.
- ROITMAN, I.; ANGLUSTER, J. & FIORINI, J. E., 1985. Nutrition of the trypanosomatids *Crithidia acanthocephali* and *Crithidia hamosa*: ribose and adenosine: substrates for *C. acanthocephali*. *J. Protozool.*, 32: 490-492.
- ROITMAN, C.; ROITMAN, I. & AZEVEDO, H. P., 1972. Growth of an insect trypanosomatid at 37 °C in a defined medium. *J. Protozool.*, 19: 346-349.