

ESTUDOS CITOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS EM
STENOPHORIDAE CRAWLEY, 1903
(*EUGREGARINIDAE*, PROTOZOA)

I — Microscopia óptica e citoquímica do núcleo*

SYLVIO CELSO GONÇALVES DA COSTA e HELLY A. LAGE

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 2 estampas)

A família *Stenophoridae* Crawley, 1903 compreende inúmeras espécies de gregarinas parasitas de *Diplopoda*, sendo uma espécie incluída no gênero *Fonsecaia* Pinto, 1918 e as demais no gênero *Stenophora* Labbé, 1899; as descrições de grande número de espécies são antigas e os autores modernos se têm dedicado mais à sistemática, existindo inúmeros problemas de citologia que precisam ser esclarecidos, não apenas para o conhecimento deste grupo, mas pela comparação com os resultados obtidos em outras famílias, contribuir para o conhecimento geral do sub-filo *Sporozoa* Leuckart, 1879.

Consideraremos este trabalho o primeiro de uma série, em que trataremos de rever inúmeros problemas citológicos com os recursos da microscopia óptica e eletrônica complementadas pelas técnicas citoquímicas e assim contribuir para o conhecimento da sistemática do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os Diplópodes foram mantidos com casca de banana, sem terra, durante quatro dias, para eliminação das pedras que se encontram no tubo digestivo. Assim eles podem ser utilizados para cortes histológicos. Com este tratamento, em ambiente confinado, a intensidade do parasitismo é aumentada, obtendo-se as chamadas "gregarinoses". Nem todas as famílias de *Diplopoda*, entretanto, resistem a este tratamento, sendo necessário estudar cada caso em particular. Para o es-

* Recebido para publicação a 25 de novembro de 1965.

Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz (Divisão de Zoologia: Seção de Protozoologia).

tudo das formas livres no conteúdo intestinal, é preferível cultivá-los com a terra do local da colheita, mantendo-se as mesmas condições de umidade e colocando-se folhas de alface.

A observação a fresco dos parasitos, para o estudo da estrutura geral, foi realizada de preferência com o próprio líquido do conteúdo intestinal. A utilização de soluções salinas de concentrações variadas poderá acarretar grandes alterações na forma do parasito, tendo em vista a grande adaptação à vida osmotrófica (Costa, 1961). O líquido de Ringer foi empregado com bons resultados, quando realizamos observações mais prolongadas.

A fixação do material para estudo da estrutura nuclear, para observação do conteúdo citoquímico e para os cortes histológicos, foi feita pelos líquidos de Gilson, Carnoy, Schaudinn e Bouin ou formalina a 1%.

Os cortes e os esfregaços foram coroados pela Hematoxilina de Heidenhain, Delafield e Regaud; a melhor coloração para o estudo das formas intracelulares foi o tricrômico de Masson, que permite observar com nitidez o epimerito e as formas iniciais de desenvolvimento intracelular.

Na caracterização das estruturas nucleares empregamos o Feulgen, e a reação do verde metila-pironina (Brachet, 1942 — modificação segundo Kastner & Melo, 1961), após digestão dos polissacarídeos que compõem o muco e as granulações do citoplasma. Como contróle que evidenciasse que a pironinofilia resultava da presença de RNA no nucléolo, tratamos esfregaços e cortes pela ribonuclease a 37°C. A microscopia de fluorescência com tratamento pelo laranja de acridina foi realizada também após digestão dos polissacarídeos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As gregarinas desta família apresentam espécies de grande porte, tendo Cesar Pinto encontrado em *Stenophora viannai* Pinto, 1918 exemplares de 1 mm de comprimento, sendo o corpo do protozoário dividido em duas regiões por um septo, ficando por êste motivo incluídas na sub-ordem *Cephalina* Delage e Hérouard, 1896.

O protomerito em geral é bem menor que o deutomerito, e apresenta um epimerito atrofiado em forma de papila ou uma pequena ventosa que aparece bem desenvolvida na fase intracelular (Fig. 9), perdurando nos trofozoitos jovens e regredindo a seguir até se tornar insignificante nos esporontes (Fig. 2). Tem papel importante em alguns movimentos ativos, que resultam da sua invaginação, seguida de sua distensão que recoloca o protomerito na sua posição normal, e determina assim um salto da gregarina para a frente (Costa & Teixeira, 1961). A cutícula apresenta estrias longitudinais uniformemente distribuídas, (Fig. 5), que se localizam tanto no protomerito quanto no deutomerito e aparece envolvida por um mucopolissacarídeo que cons-

titui uma substância de grande importância para a fisiologia destes protozoários (Stein, 1963; Costa & Lage, 1964). Na observação a fresco, o endoplasma se apresenta intensamente granuloso (Fig. 8) sendo as granulações na sua maioria constituída de paraglicogênio e mais numerosas no deutomerito, dificultam freqüentemente estas granulações a observação dos constituintes celulares, mesmo após fixação e coloração.

No deutomerito encontramos o núcleo, sendo que no gênero *Stenophora* Labbé, 1899 existem espécies com núcleos alongados, cuja forma mais característica é em crescente. Estas variações de forma do núcleo parecem estar ligadas a determinados fatores fisiológicos, que por sua vez estão relacionados à especificidade de hospedador. Assim, por exemplo, nos diplopodos da família *Rhinocricidae*, encontramos sempre gregarinas de núcleo arredondado, enquanto que em *Pseudonannolenidae* só aparecem espécies com núcleo em forma de crescente. Este quadro perdura, mesmo quando os diplópodos são oriundos de um mesmo local e são mantidos juntos num cristalizador durante certo tempo. Os núcleos alongados e os falciformes parecem resultar de um processo evolutivo, pois os trofozoitos jovens possuem núcleo arredondado que se alonga até a forma definitiva que encontramos nos esporontes, como pode ser visto em *S. conjugata* Rodgi & Ball, 1961. A posição do núcleo no deutomerito é variável na mesma espécie sendo que em *Stenophora juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899, localiza-se mais freqüentemente na extremidade posterior, mas às vezes encontramos no meio do corpo ou colado ao protomerito (Figs. 1 e 2).

A membrana nuclear, quando vista pela microscopia óptica, é perfeitamente uniforme e lisa sempre que ocorre uma fixação perfeita; o aspecto irregular que encontramos em alguns cortes atribuímos aos fixadores. Internamente não apresenta nenhuma granulação aderente (Figs. 3 e 4).

Na determinação do DNA a reação de Feulgen deu um resultado fracamente positivo e este fato já fôra assinalado por Reichenow (1928) que obteve uma reação positiva para os esporozoitos e jovens trofozoitos, e negativo para os trofozoitos desenvolvidos e os esporontes. Este autor interpretou aquêle resultado como uma consequência do estado de divisão muito acentuado da cromatina no nucleoplasma. Os resultados com o verde de metila também foram negativos, porém, pela microscopia de fluorescência obtivemos um resultado bastante nítido, aparecendo as granulações de cromatina finamente divididas no nucleoplasma. Este aspecto pode ser observado nas colorações pela hematoxilina de Heidenhain, controlando-se cuidadosamente a diferenciação, quando as granulações de cromatina aparecem dispersas no suco nuclear envolvendo o nucléolo; encontramos, entretanto, um exemplar que apresentava a cromatina condensada em forma de vírgula, com o nucléolo situado na região mais larga da vírgula (Fig. 5), e outro com a cromatina formando um S em cima do nucléolo (Fig. 1).

O conteúdo de RNA foi determinado pelo tratamento com a pironina e controle pela ribonuclease, havendo uma intensa pironinofilia no grande corpúsculo que se encontra no núcleo destes protozoários, o que não se verifica quando os cortes são tratados pela ribonuclease. Quando utilizamos a microscopia de fluorescência em material corado pelo laranja de acridina, não foi possível caracterizar o nucléolo pois a reação deste corpúsculo foi mascarada pela reação das granulações de cromatina dispersas no nucleoplasma. Do mesmo modo, tratando-se pela ribonuclease e corando-se pela hematoxilina de Heidenhain, em certo momento da diferenciação, podemos observar a intensa coloração da periferia do núcleo contrastando com a região central descorada em consequência da digestão do material nucleolar (Fig. 6). Vemos assim que este corpúsculo das gregarinas do gênero *Stenophora* Labbé, 1899 por muitos referido como um cariossoma, é na realidade um nucléolo, que aparece mais desenvolvido nas formas intracelulares que nas de trofozoíto e esporonte (fig. 7), quando se toma como termo de comparação o tamanho do núcleo. Os nucléolos têm em média 7 micra de diâmetro.

No que diz respeito à estrutura, os nucléolos apresentam alguns aspectos que variam conforme os fixadores e o método de coloração empregado. Assim, pelo tricrômico de Masson, encontramos uma estrutura filamentar que foi relacionada ao nucleolonema (Costa, 1964); não observamos com esta coloração nem vacúolos nem película envoltória. Em cortes corados pela hematoxilina de Heidenhain encontramos uma nítida película envoltória cuja natureza precisa ser analisada com os resultados obtidos pela microscopia eletrônica, podendo ser resultante de uma condensação de material nucleolar pelos fixadores; ainda com a hematoxilina, encontramos inúmeras regiões vacuolares semelhantes aos vacúolos observados em nucléolos de células de metazoários como assinalam diversos autores (Sirlin, 1961 e outros), sendo que o conteúdo dos vacúolos não aparece corado.

RESUMO

Neste trabalho os autores apresentam uma revisão da morfologia das gregarinas do gênero *Stenophora* Labbé, 1899, baseada principalmente em *S. juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899.

Caracterizam citoquimicamente os elementos da estrutura nuclear, ficando evidenciado que o corpúsculo nuclear referido por muitos como um cariossoma apresenta reações positivas para o RNA, sendo portanto um nucléolo. O suco nuclear apresenta reações para o DNA pouco intensas, devido as granulações de cromatina se apresentarem muito finas. Fazem referências também à estrutura do nucléolo, que varia com as técnicas empregadas e salientam a necessidade de comparação destes resultados com aqueles obtidos com o auxílio da microscopia eletrônica e que serão tratados no segundo trabalho desta série.

SUMMARY

The present paper consists of a morphological revision of gregarines belonging to the genus *Stenophora* Labbé, 1899, specially referred to *S. juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899. Nuclear compounds were cytochemically characterized and on account of the positive reactions for RNA the corpuscle generally referred as "caryosome" was to be a "nucleole". The finely divided DNA of the nucleoplasm caused a weak reaction.

The structure of the nucleole depends on the technic used. These results must be compared with those obtained with the electronic microscope.

BIBLIOGRAFIA

- COSTA, S. C. G. & TEIXEIRA, F. M., 1961, Considerações sôbre 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 sôbre a membrana nucleolar e o nucléolonema em nucléolos de "*Stenophora*" Labbé, 1899 (Protozoa, Sporozoa). *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 8 (6): 64-66, 4 figs.
- LABBÉ, A., 1899, *Sporozoa. Das Tierreich*, 5: 1-180, 190 figs., Berlin.
- PINTO, C., 1919, *Contribuição ao estudo das gregarinas*, 113 pp., 6 lams., 100 figs., Tese. Rio de Janeiro.
- REICHENOW, E., 1928, Ergebnisse mit der nuclealfärgung bei Protozoen. *Arch. Protistenk*, 61: 144-166, 2 lams., 15 figs.
- RODGI, S. S. & BALL, G. H., 1961, New species of gregarines from Milipedes of Mysore State, India. *J. Protozool*, 8 (2): 162-179, 71 figs., 3 tabs.
- SIRLIN, J. L., 1961, The nucleolus of the cell nucleus. *Endeavour* 20 (79).
- STEIN, G. A., 1963, *Cytochemical study of some stages of life cycle of polycystic gregarines*. Progress in Protozoology, Proceedings of the 1st International Congress of Protozoology, Prague, August 22-31, 1961. J. Ludvik, J. Lom., J. Vávra Edit. Academic Press, New York & London, pg. 294-295.

ESTAMPA I

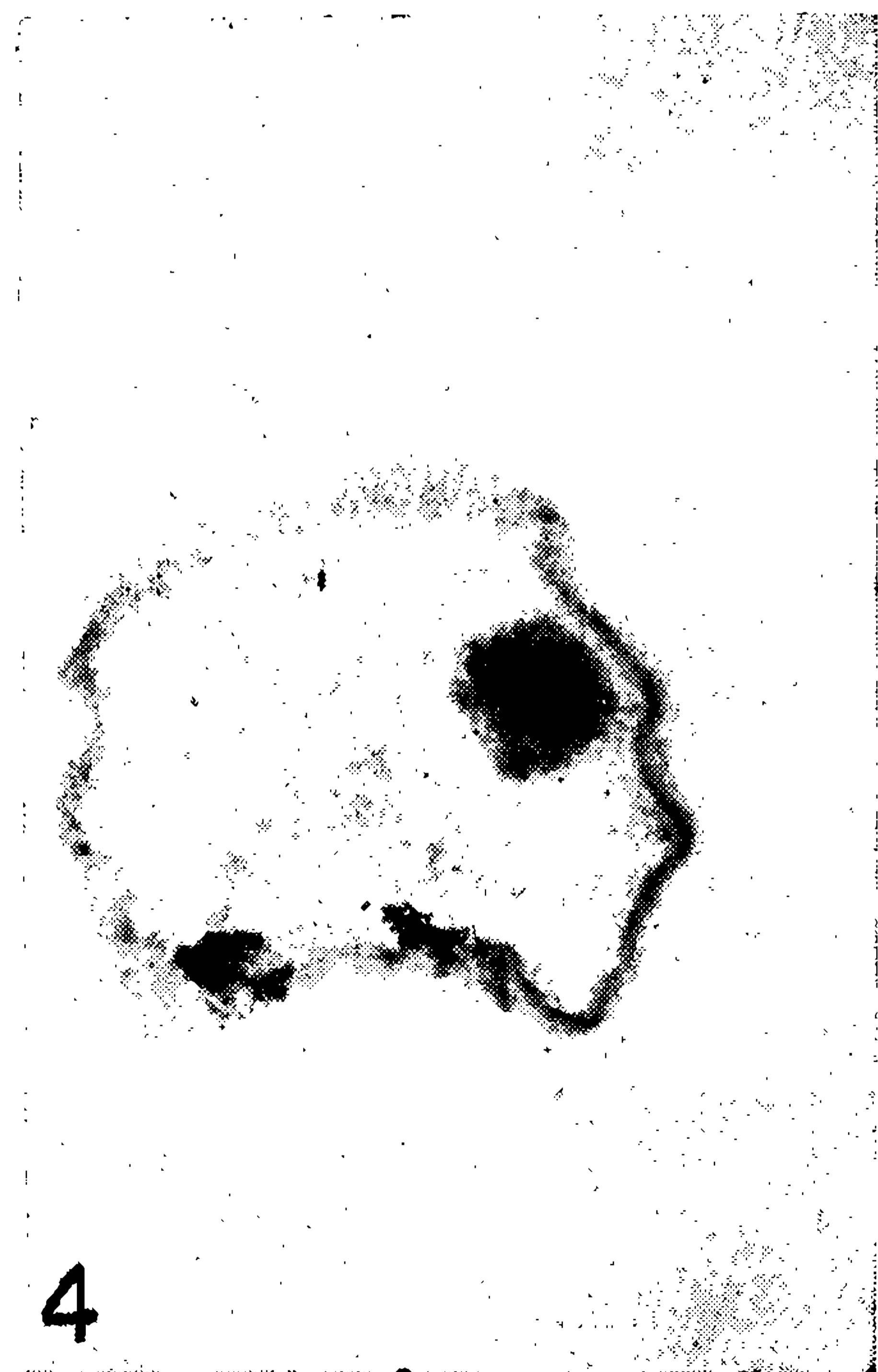
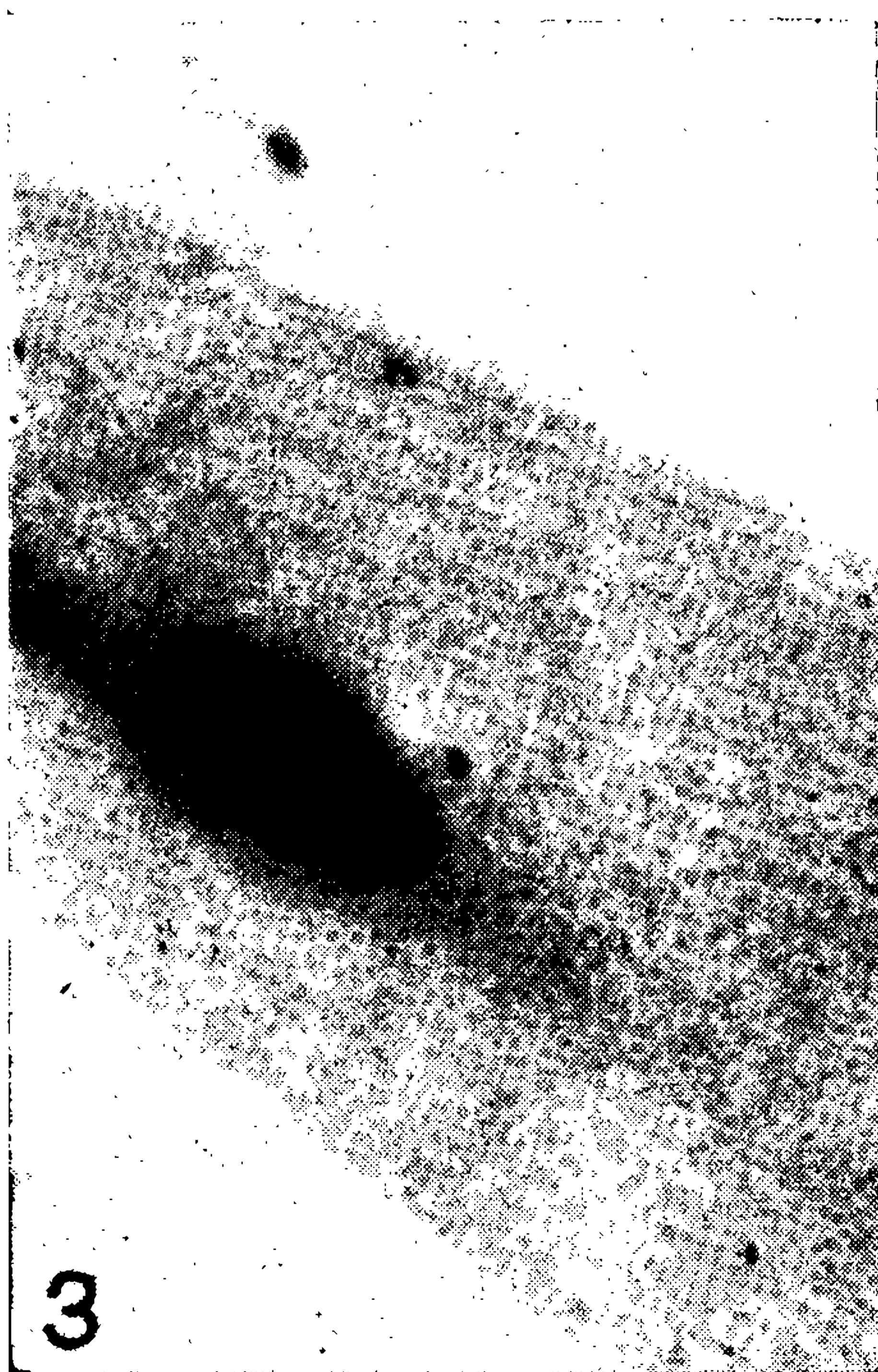
Microfotografias de *S. juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899.

Fig. 1 — Esporonte corado pela hematoxilina de Heidenhain, apresentando o núcleo com a cromatina condensada em forma de S, com o nucléolo na parte inferior do S. 90 x 10 (6 x 9) .

Fig. 2 — Exemplar corado pela hematoxilina, apresentando o núcleo próximo ao protomerito. 20 x 10 (6 x 9) .

Fig. 3 — Extremidade posterior de exemplar submetido à digestão enzimática dos polissacarídeos, permitindo a observação das estrias da cutícula. Imersão.

Fig. 4 — Corte transversal de material incluído em parafina, mostrando a estrutura do núcleo, com uma nítida película envoltória no nucléolo e vacúolos na periferia, numa zona em que parece ter havido extração de material nucleolar. 40 x 10 (6 x 9) .



ESTAMPA II

Microfotografias de *S. juli* (Frantzius, 1848) Labbé, 1899

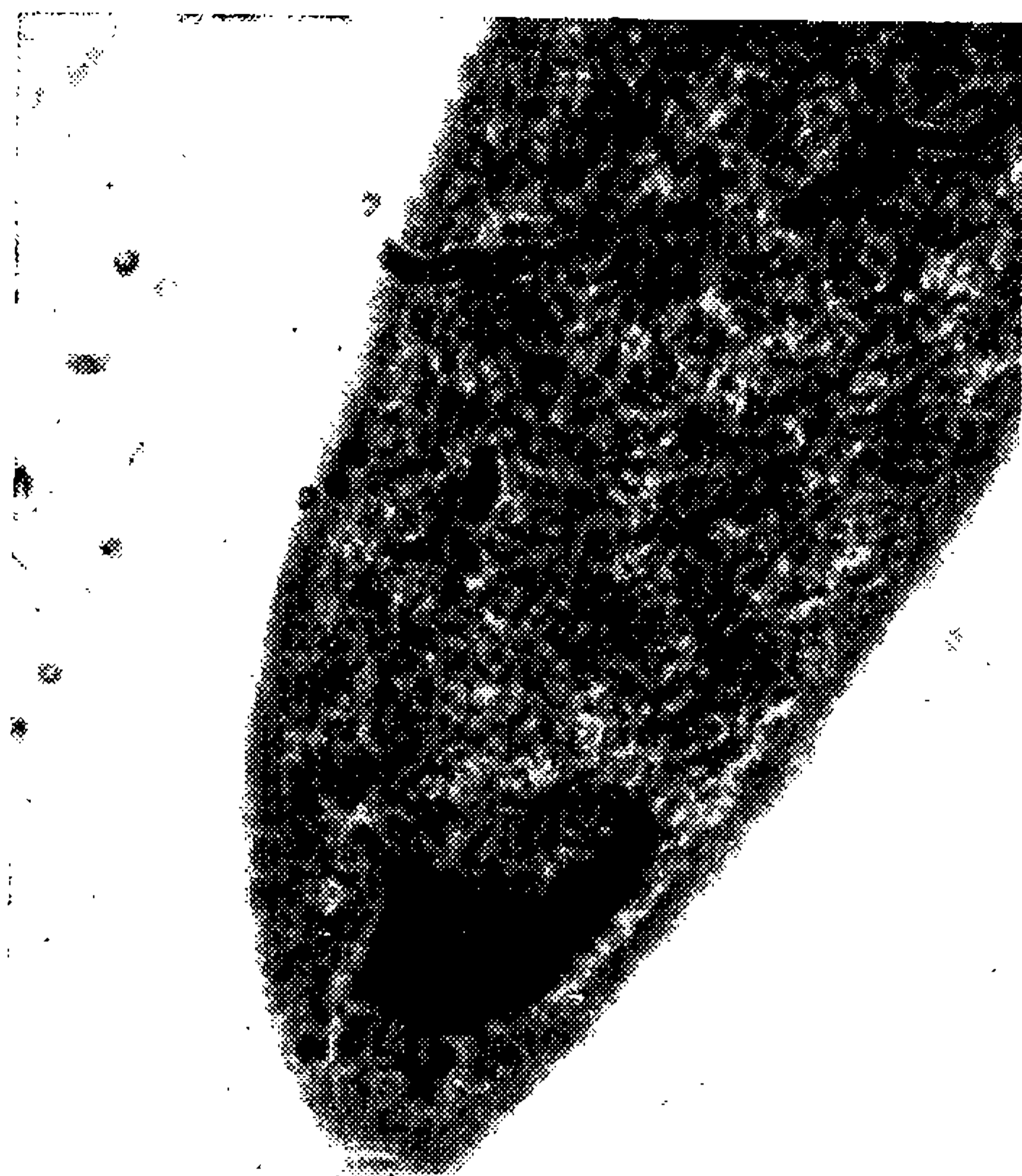
Fig. 5 — Detalhe do núcleo apresentando a cromatina condensada em forma de vírgula, com o nucléolo no meio. 90 x 10 (6 x 9).

Fig. 6 — Digestão do nucléolo pela ribonuclease em material tratado por enzimas contra os polissacarídeos. Coloração pela hematoxilina de Heidenhain. 90 x 10 (6 x 9).

Fig. 7 — Corte do tubo digestivo corado pela hematoxilina Delafield mostrando uma gregarina intracelular e outra na fase inicial de trofozoito livre. 40 x 10 (6 x 9).

Fig. 8 — Observação das granulações citoplasmáticas em material corado pela hematoxilina Heidenhain. 90 x 10 (6 x 9).

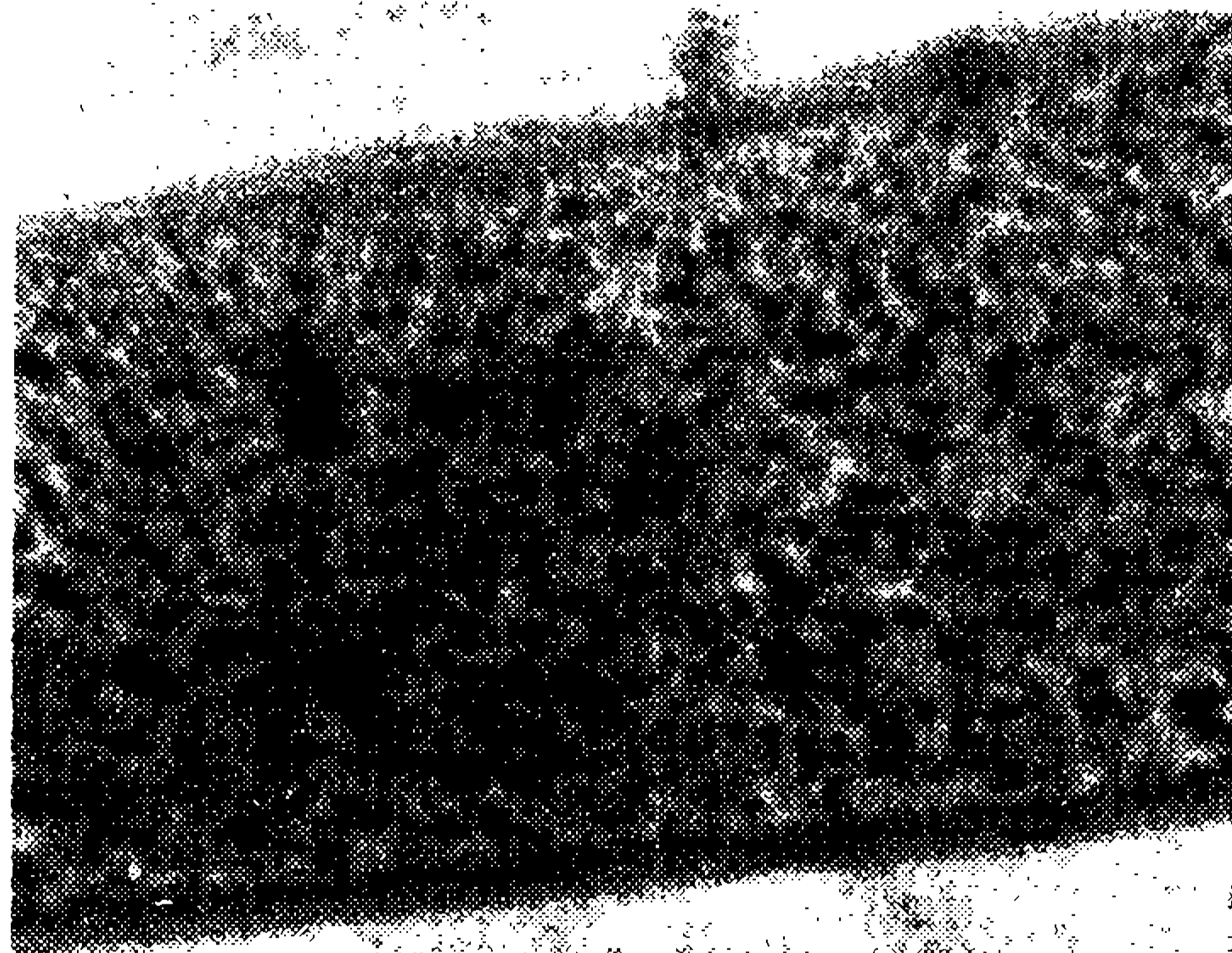
Fig. 9 — Corte transversal do tubo digestivo apresentando uma gregarina intracelular com o epimerito bem diferenciado. Coloração pelo tricrômico de Masson. 40 x 10 (6 x 9).



5



6



8

