

## DESENVOLVIMENTO DOS ESPOROZOÍTOS E TROFOZOÍTOS DE *Gregarina cuneata* (Apicomplexa: Gregarinidae) NO MESÊNTERO DE *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli<sup>1</sup>; Gêssica de Sousa<sup>2</sup>; Helio Conte<sup>3</sup>

**RESUMO:** *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) importante praga de grãos e subprodutos armazenados, pode ser naturalmente infectado por *Gregarina cuneata* Stein (1948). O ciclo deste parasita compreende as fases de esporozoítos, trofozoítos, gamontes, gametocistos e oocistos, e, se completa entre o epitélio e lúmen do mesêntero no hospedeiro. Sabendo que os estágios iniciais do desenvolvimento deste parasita são pouco conhecidos, este trabalho descreve as transformações morfológicas que acompanham o desenvolvimento dos esporozoítos em trofozoítos. Para tanto, o mesêntero de insetos infectados foram isolados para análise das gregarinas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os esporozoítos penetram nas células e iniciam a transformação morfológica em trofozoítos. Durante desenvolvimento intracelular, apresentam o complexo apical que diferencia-se gradativamente no epimérito e os microporos envolvidos na alimentação. Após liberação dos trofozoítos jovens para o lúmen do mesêntero, as dobras epicíticas são formadas, o corpo torna-se segmentado e eles mantem-se aderidos às células digestivas podendo causar danos a morfologia celular e comprometimento da fisiologia da digestão do inseto hospedeiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esporozoítos; gregarinas; morfologia; trofozoítos; ultraestrutura.

### 1 INTRODUÇÃO

A infecção de *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) por *Gregarina cuneata* Stein 1948 (Apicomplexa: Eugregarinidae) é direta. Os oocistos são liberados com as fezes ou restos de insetos mortos para o meio e ingeridos com o alimento. Como o canibalismo é comum nesta espécie, o consumo de partes do corpo de insetos vivos e parasitados também pode infectar os insetos sadios da população

Em *G. cuneata*, a transformação dos esporozoítos em trofozoítos ocorre no interior das células epiteliais do mesêntero. Em seguida os parasitas são liberados para o lúmen onde se alimentam e reproduzem (Clopton e Janovy 1993). O ciclo das gregarinas é relativamente curto, porém, várias transformações morfológicas acompanham todo processo de desenvolvimento (Toso e Omoto 2007). Essas podem ser influenciadas por fatores externos como a temperatura e umidade (Clopton e Janovy 1993), bem como, pelas condições imunológicas e fisiológicas do hospedeiro (Thomas e Rudolf 2010).

Sabendo que as alterações que acompanham o desenvolvimento de *G. cuneata* no mesêntero de *T. castaneum* são pouco conhecidas, este trabalho teve como objetivo descrever as alterações morfológicas e ultraestruturais que acompanham os estágios iniciais do seu desenvolvimento neste inseto praga.

<sup>1</sup> Doutoranda do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Biologia celular e Molecular – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista do CNPq. adrianasinopolis@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestre em Ciências Biológicas: Biologia celular e Molecular – UEM, Maringá – Paraná. ghessica.sousa@gmail.com

<sup>3</sup> Docente da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. hconte@uem.br

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) foram coletadas em produtos processados, colocados em sacos de papel contendo farinha de trigo como dieta alimentar e vedados com fita do tipo adesiva. Os insetos foram mantidos no laboratório de Morfologia e Citogenética de Insetos da Universidade Estadual de Maringá, sob temperatura de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas.

Insetos adultos fêmeas e machos infectados naturalmente por *Gregarina cuneata*, foram anestesiados a frio, dissecados em solução salina e o mesêntero isolado.

Para MEV, esta região foi fixada em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 48hs, pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% em água destilada, seguindo de desidratação em séries crescentes de álcool etílico. As amostras foram submetidas ao ponto crítico Leica CPD 030, recobertas por pó de ouro no metalizador Baltec SCD 050 e, posteriormente, analisadas e fotografadas no MEV Quanta 200 da Fei Company.

Para análises ultraestruturais em MET, essa região do intestino foi fixada em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7.3 por 24 hs, pós-fixado por 2 hs em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, lavado em água destilada e contrastado com acetato de uranila 0,5% por 2 hs. Em seguida, a amostra foi desidratada em séries crescentes de acetona e embebida em resina Araldite®. Os cortes ultrafinos foram contrastados em solução alcoólica saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados no microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1400.

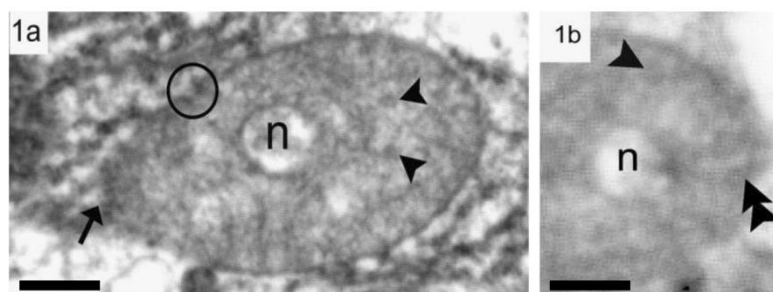
As análises microscópicas foram realizadas no Centro de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá/Paraná/Brasil.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após ativação e excitação no lúmen do mesêntero de *T. castaneum*, os esporozoítos de *G. cuneata* se ligam as células digestivas do mesêntero e as invadem.

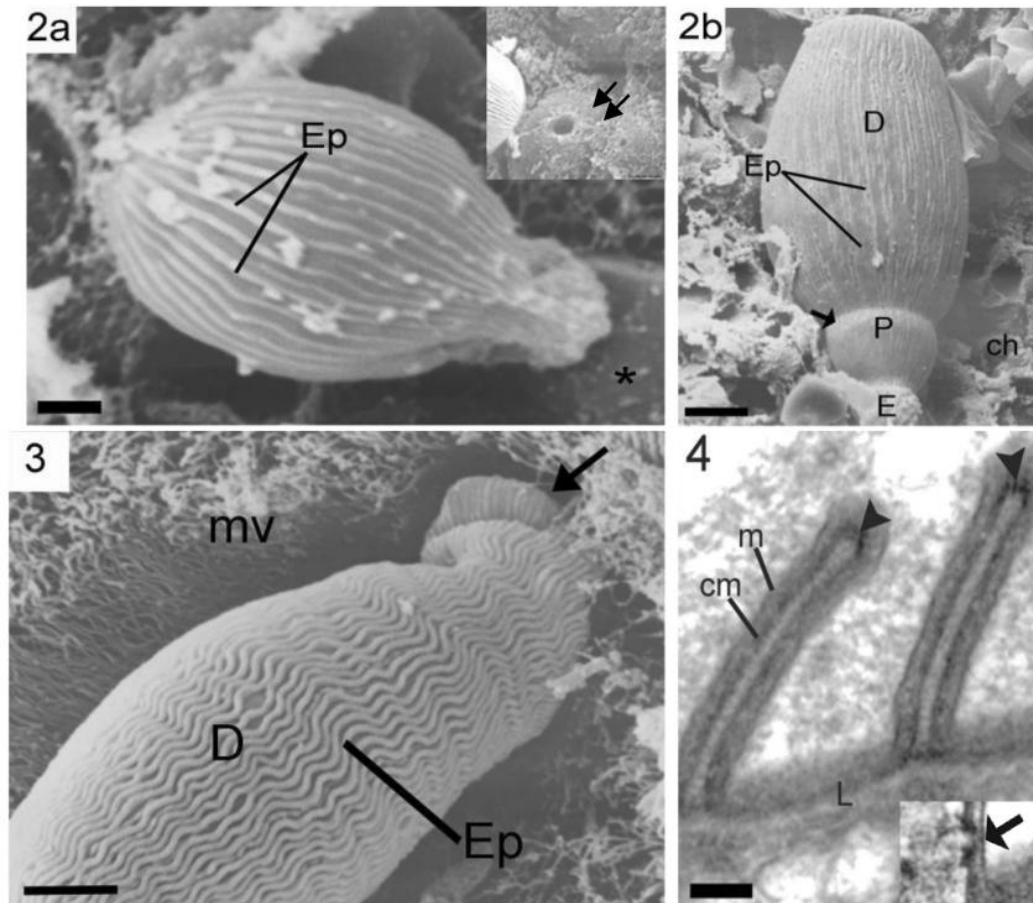
Durante esse estágio intracelular, os parasitas variam de cilíndricos a ovoides, não apresentam segmentações e são revestidos por membrana dupla contendo um microporo na superfície lateral (Fig. 1a). Esta estrutura é responsável pela absorção dos nutrientes diretamente da célula hospedeira, permitindo a transformação dos esporozoítos em trofozoítos. Além disso, possuem um núcleo esférico posicionado na região central do citoplasma, poucos grânulos elétron-densos e o complexo apical cônico constituído por anéis polares, roptrias e micronemas (Figs. 1a e b).

Quando os trofozoítos são liberados do interior das células, esta região anterior diferencia-se gradativamente no epimérito esférico (Figs. 2a e b) que é responsável pela fixação (Valigurová et al. 2009) e pode estar relacionado a nutrição, como observado em *Leidyana canadensis* (Lucarotti 2000).



**Fig 1. A)** Esporozoítos de *G. cuneata* em *T. castaneum*. **B)** Região posterior do esporozoítos mostrando os anéis polares (ponta de seta dupla). Microporos (círculo), núcleo (n), complexo apical (seta), grânulos elétron-densos (ponta de seta). Barra = 0,5  $\mu\text{m}$ .

A superfície é diferenciada em dobras epicíticas que revestem longitudinalmente o corpo. Elas são retas ou levemente onduladas e aumentam em densidade com o desenvolvimento (Figs. 2a, 2b e 3). Constringem-se na região anterior resultando na formação de um septo que diferencia o corpo em dois segmentos como descrito em *Leidyana canadensis* (Lucarotti 2000) e *Leidyana ephestiae* (Valigurová e Koudela 2005). O protomérito é localizado anteriormente e permanece embebido entre as microvilosidades do hospedeiro e o deutomérito é posterior, livre e voltado para o lúmen do mesêntero (Figs. 2b e 3).



**Figs 2 a 4.** Desenvolvimento inicial dos trofozoítos de *G. cuneata*. **2A)** Trofozoíto jovem não segmentado aderido à célula epitelial hospedeira (asterisco). Perfuração na superfície celular (seta dupla). Barra = 1  $\mu$ m. **B)** Trofozoíto jovem segmentado. Tecido hospedeiro (ch), dobras epicíticas (Ep), epimérito (E), protomérito (P), deutomérito (D), septo (seta). Barra= 2,5  $\mu$ m. **3.** Trofozoíto em desenvolvimento. Protomérito (seta), microvilosidades (mv), deutomérito livre (D). Barra = 2,5  $\mu$ m. **4.** MET das dobras epicíticas (Ep). citomembranas (cm), membrana plasmática (m), filamentos (ponta de seta), lâmina interna (L), microporo (seta) Escala = 0,2  $\mu$ m.

As dobras epicíticas são formadas por duas membranas corticais e paralelas constituindo uma lâmina interna densa, na qual, observamos microporos (Fig. 4). Estas estruturas possivelmente estão associadas a secreção de muco lubrificante para movimentação do parasita (Talluri e Dallai 1983). Elas projetam-se para a extremidade celular como túbulos dilatados contendo no ápice uma região elétron-densa na forma de arco, preenchida por filamentos (Fig. 4) que atuam na locomoção e podem estar associados a morfogênese dos parasitas (Toso e Omoto 2007).

Durante a fase de alimentação, os trofozoítos permanecem fortemente aderidos a às células digestivas (Fig. 3), que são fundamentais para a secreção de enzimas e absorção de nutrientes (Sousa e Conte 2013). Contudo, a presença de perfurações esféricas na superfície celular e resquílios do epitélio sobre o epimérito, sugerem que

essa estrutura de fixação deve penetrar na membrana plasmática, danificando às microvilosidades das células infectadas, e, comprometendo a fisiologia da digestão do hospedeiro.

#### 4 CONCLUSÃO

O desenvolvimento inicial de *G. cuneata* no mesêntero de *T. castaneum* pode resultar em danos morfológicos nas células digestivas, os quais comprometem a fisiologia do sistema digestório e, conseqüentemente, o desenvolvimento do inseto hospedeiro.

#### REFERÊNCIAS

Clopton, R. E.; Janovy J.JR. 1993: Developmental niche structure in the gregarine assemblage parasitizing *Tenebrio molitor*. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 701-709, 1993.

Lucarotti, C. J. Cytology of *Leidyana canadensis* (Apicomplexa : Eugregarinida) in *Lambdina fiscellaria* larvae (Lepidoptera : Geometridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 117–125, 2000.

Talluri, M. V.; Dallai R. Freeze-fracture study of the gregarine trophozoite: II. Evidence of “rosette” organization on cytomembranes in relation with micropore structure. **Bulletin of Zoology**, v. 50, p. 247–256, 1983.

Toso, M. A.; Omoto, C. K. Ultrastructure of the *Gregarina niphandrodes* nucleus through stages from unassociated trophozoites to gamonts in syzygy and the syzygy junction. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 479–484, 2007.

Valigurová, A.; Koudela, B. Fine structure of trophozoites of the gregarine *Leidyana ephestiae* (Apicomplexa : Eugregarinida) parasitic in *Ephestia kuehniella* larvae (Lepidoptera). *European Journal of Protistology*, v. 41, p. 209–218, 2005.

Valigurová, A.; Michalkova, V.; Koudela, B.: Eugregarine trophozoite detachment from the host epithelium via epimerite retraction: Fiction or fact?. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p. 1235–1242, 2009.

Sousa, G. de; Conte, H. Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae). **Micron**. DOI: 10.1016/j.micron.2013.06.001, 2013.