

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Análise do crescimento, diferenciação celular e perfil isoenzimático de um isolado de tripanosomatídeo obtido de *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) (DIPTERA, PHORIDAE)

NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

**Rio de Janeiro
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Análise do crescimento, diferenciação celular e perfil isoenzimático de um isolado de tripanosomatídeo obtido de *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) (DIPTERA, PHORIDAE)

NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

Sob a Orientação da Doutora
Jacenir Reis dos Santos Mallet

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**,
Área de Concentração em
Biologia Animal

Seropédica, RJ
Março de 2011

595.77

L732a

T

Lima, Nathanielly Rocha Casado de,
1978-

Análise do crescimento,
diferenciação celular e perfil
isoenzimático de um isolado de
tripanosomatídeo obtido de *Megaselia*
scalaris Loew, 1866 (Díptera,
Phoridae) / Nathanielly Rocha Casado
de Lima. - 2011.

54 f.: il.

Orientador: Jacenir Reis dos
Santos Mallet.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Biologia Animal.

Bibliografia: f. 46-51.

1. Díptero - Teses. 2. Díptero -
Morfologia - Teses. 3. *Megaselia* -
Parasito - Teses. 4.
Tripanosomatídeo - Teses. I.
Mallet, Jacenir Reis dos Santos,
1958- II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Biologia Animal.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

NATHANIELLY ROCHA CASADO DE LIMA

Dissertação, submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

**Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – UFRRJ
(Orientadora)**

**Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes – UFF - RJ
(Membro da banca examinadora)**

**Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves – FIOCRUZ-RJ
(Membro da banca examinadora)**

Dedico,

a minha grande avó Ivete Chaves Rocha (in memoriam), pela sua grande contribuição em todos os segmentos da minha vida. Mesmo distante, sempre participou de todas as etapas da minha vida, me dando apoio e vibrando por cada vitória minha. A minha querida avó, que com certeza deve estar muito orgulhosa por eu ter alcançado mais um sonho, que na verdade era mais um sonho dela do que meu. Sempre te amarei.

À Dr^a Jacenir Mallet,

por tudo que ela fez e ainda é capaz de fazer por mim, com sua calma e determinação me confortou nos momentos em que mais precisei. Graças a sua persistência e atenção, não desisti de realizar mais esse sonho. À minha orientadora que para mim sempre será exemplo de ser humano e profissional. Muito obrigada Jace, pois o fato de você ter confiado em mim me fez chegar até aqui. Você sempre será minha eterna e querida orientadora “passalinha”.

O MELHOR DE VOCÊ

Dê sempre o melhor

E o melhor virá...

Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo...

Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra...

Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...

Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã...

Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante...

Dê o melhor de você assim mesmo.

E veja você que, no final das contas...

É entre VOCÊ e DEUS...

Nunca foi entre você e eles!

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado me ajudando, amparando, protegendo e dando forças para que eu nunca desanimasse e sempre continuasse em frente na busca dos meus objetivos.

À minha família, em especial aos meus pais tão queridos e amados Antônio e Margareth por sempre me darem total apoio em todas as etapas da minha vida, pela paciência nos momentos mais difíceis, pelo amor incondicional e por tudo que ainda serão capazes de fazer por mim.

Aos meus irmãos Toni e Max pelo amor, carinho, incentivo e muita paciência nos momentos mais difíceis e a minha cunhada Anne Caroline por toda sua cumplicidade. Obrigada por tudo.

Ao meu avô Francisco Rocha da Silva e em especial a minha avó Ivete Chaves Rocha (in memoriam), por todo seu apoio, carinho, dedicação e por toda torcida em relação a minha vida acadêmica. Tenho certeza que ela está muito orgulhosa e torcendo muito por mais essa etapa concretizada. Amo vocês para sempre.

Aos meus avós Joel Casado e Cícera do Carmo (in memoriam) por todos os momentos que passamos juntos e sei que onde eles estão e sempre estarão torcendo por mim. Amo vocês para sempre.

As minhas tias, Lilisbete, Elizabeth, Franciete, Darniete e a minha tia-avó Diná por todo apoio, carinho e torcida em cada momento da minha vida. Amo vocês demais.

Aos meus primos, em especial a Bianca Rocha, que mesmo longe sempre me deu apoio e com palavras de conforto fizeram me animar e prosseguir. Te amo prima.

A minha querida orientadora Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, carinhosamente chamada por mim de “passalinha” por tudo que fez por mim, pelos momentos que me ouviu e mesmo eu não sendo muito doce nas palavras sempre me compreendeu e me mostrou que devemos esperar e nunca desistir dos nossos sonhos. Muito obrigada pela confiança em mim depositada, pelo otimismo nos momentos de crise e por toda sua paciência nos momentos em que mais precisei.

A minha grande amiga-irmã Luciana Reboredo por toda amizade, apoio, incentivo, pelos momentos de descontração e por ter sido peça fundamental para a realização desse projeto, sem ela não teria conseguido chegar até o final. Obrigada por fazer parte não só da minha vida acadêmica, mas da minha vida pessoal me dando conselhos, me apoiando nos momentos mais difíceis e compartilhando todas as vitórias e derrotas que a vida nos colocou. Foram muitos momentos que juntas conseguimos superar e dar a volta por cima. Obrigada por tudo minha eterna amiga.

Ao amigo Renato Jr. que também foi fundamental para a realização deste projeto, através de suas idéias que este projeto surgiu e foi concretizado. Obrigada.

A minha grande amiga Simone Castro pela amizade, apoio, incentivo e pelas vezes que sempre me ouviu, me dando conselhos para agir da maneira correta. Obrigada por tudo minha grande e eterna amiga.

A Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves, Dra Simone Patrícia Carneiro de Freitas, Dra. Suzete Araújo Oliveira Gomes e a Prof. Catarina Macedo pelo apoio, incentivo e palavras de carinho.

Ao amigo futuro mestre William Marques pelo carinho, amizade, apoio e pelos diversos momentos de descontração.

A querida amiga Ana Paula Rufino A. Sant'Anna que devido as circunstâncias da vida não pode estar de corpo presente, mas sempre esteve presente em pensamento e no meu coração. Obrigado por tudo Aninha!

A amiga Simone Teves por ser tão dedicada e atenciosa com todos do laboratório, pelas palavras de apoio e carinho.

Ao técnico Adalberto José da S. R. Rodrigues pelo apoio e também por ser tão atencioso com todos.

Ao amigo Maycon Neves pela amizade, carinho, apoio e pelas tardes divertidas no laboratório.

Aos companheiros do setor de entomologia médica e forense Margareth Cardozo de Almeida, Maria Luiza, Daniele Misael, Alice, Simone Kikuchi, Agnes Ribeiro e Kátia Felisbino pela atenção, auxílio, ensinamentos e amizade em todos momentos.

A minha vizinha do coração Alcidinéia Ivo, por todo seu ensinamento, experiência e paciência para me ensinar tudo que sei sobre laboratório, desde limpeza de vidraria até o trabalho de bancada. Alguém que eu recorria nos momentos de angústia e que sempre me defendeu diante de todos. Muito obrigada minha eterna Néia, a quem eu amo como se fosse minha verdadeira avó.

Ao meu amigo Marcão, por todo seu ensinamento e paciência nos trabalhos de bancada e por todo apoio que sempre me deu em momentos que queria desistir de tudo. Obrigada Marcão.

Aos amigos especiais do LTL Professora Adriana Zwetsch e Dr. Alfredo Carlos pelo carinho, amizade e incentivo.

Ao meu grande amigo Marcio Nascimento dos Santos, que na verdade foi um anjo que Deus enviou numa fase difícil da minha vida, e que com toda sua alegria me fez voltar a sorrir. Obrigada por tudo Marcinho.

As minhas queridas amigas Claudinha, Lucianna, Carol e Ana Carolina pela amizade, carinho e apoio.

A secretária Ester Lúcia pela atenção, ajuda e amizade.

Aos meus colegas que do curso de pós-graduação em Biologia Animal, em especial para os amigos que conquistei Jeiel Gabrir e César Carriço, por toda amizade, confiança e apoio. Muito obrigada!

A Agra, secretária da Pós-Graduação em Biologia animal da UFRRJ, pela atenção, carinho e ajuda sempre que requisitada.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ, em especial Prof. Cassino e Prof. Janira por todos os preciosos ensinamentos.

A fonte financiadora Capes.

A Fiocruz pela excelência em pesquisa e por fornecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

A toda a equipe do Setor de Entomologia Médica e Forense pela união, apoio e ensinamentos.

Aos amigos e colegas por sempre acreditarem que o sorriso, a sinceridade e o amor são a salvação da alma.

RESUMO

A família Trypanosomatidae inclui parasitas de uma grande variedade de vertebrados, invertebrados (principalmente insetos), plantas e algumas espécies de protozoários. No presente trabalho, um isolado foi obtido por coprocultivo de trato intestinal de *Megaselia scalaris* Loew, 1866 (Diptera, Phoridae). O isolado original e seus clones (obtidos por citometria de fluxo) foram depositados na "Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz". Estes clones foram caracterizados por diversas abordagens em comparação com espécies de referência de diferentes gêneros. Seu crescimento foi estudado em meio LIT (com 10 ou 20% de soro fetal bovino) modificado, de acordo com o nível de exigência. O número de células por microlitro foi estimado em intervalos de 24 h, entre 48-144 h. Esfregaços corados pelo Giemsa (após hidrólise ácida) foram preparados visando estudos de diferenciação celular e morfometria das formas encontradas. A análise de isoenzimas foi realizada utilizando-se os seguintes sistemas: GPI, PGM, 6PGDH, ME, IDH, MDH, ACON, FUM, MPI e HK. Os dados desta análise foram processados numericamente e submetidos à análise computacional utilizando-se o coeficiente de *Jaccard* e o algoritmo *UPGMA*. O conjunto de resultados deste trabalho sugere que: (1) O isolado de *M. scalaris* apresentou similaridade de 70% com *Herptomonas megaseliae*; (2) Esse isolado revelou a presença exclusiva de promastigotas em toda análise da curva de crescimento, como esperado para o gênero *Leptomonas*, entretanto as formas exibiram grande polimorfismo. Estudos complementares utilizando ferramentas moleculares serão realizados.

Palavras-chaves: Tripanosomatídeos inferiores, morfobiologia e isoenzimas.

SUMMARY

The Trypanosomatidae family includes parasites of a wide variety of vertebrates, invertebrates (mainly insects), plants and some species of protozoa. In this study, an isolate was obtained by feces culturing of the intestinal tract of *Megaselia scalaris* Loew, 1866 (Diptera, Phoridae). The original isolate and its clones (obtained by flow cytometry) were deposited in the “Trypanosomatids Collection of the Instituto Oswaldo Cruz. These clones were characterized by different approaches I in comparison with the reference species of different genera. Its growth has been studied in LIT medium (with 10 or 20% fetal bovine serum) modified according to the requirement. The number of cells per microliter was estimated at 24 h intervals between 48-144 h. Giemsa-stained smears (after acid hydrolysis) were prepared in order to study cell differentiation and morphology of the forms. The isozyme analysis was performed using the following systems: GPI, PGM, 6PGDH, ME, IDH, MDH, ACON, FUM, MPI and HK. Data from this analysis were processed and analyzed numerically using the computational Jaccard coefficient and UPGMA algorithm. The result set of this study suggest that: (1) The strain of *M. scalaris* showed 70% similarity with *Herpetomonas megaseliae*, (2) This isolate showed the exclusive presence of promastigotes in any analysis of the growth curve as expected for the genus *Leptomonas*, however the forms exhibited high polymorphism. Additional studies using molecular tools will be realized.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Posição taxonômica e características gerais dos tripanosomatídeos.....	1
1.2.– Gêneros de tripanosomatídeos monoxênicos.....	4
1.3– Tripanosomatídeos heteroxênicos parasitas de plantas.....	5
1.4 – Artrópodes como vetores e hospedeiros de tripanosomatídeos inferiores.....	6
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3 – OBJETIVO GERAL.....	11
4 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
5 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
5.1 – Captura de insetos.....	12
5.2 – Isolamento de tripanosomatídeos e coprocultura.....	12
5.3 – Descontaminação dos isolados e criopreservação.....	13
5.4 – Cultivo axênico e clonagem das amostras.....	14
5.5 – Análise morfológica e morfométrica dos clones.....	14
5.5.1 – Análise do crescimento	14
5.5.2 – Biometria dos estágios identificados.....	14
5.5.3 – Avaliação comparativa do clone com outros tripanosomatídeos	15
5.6 - Análise isoenzimática e taxonomia numérica	19
5.6.1 – Ampliação e estocagem das amostras.....	19
5.6.2 – Eletroforese de isoenzimas.....	19
5.6.3 – Zimotaxonomia.....	23
6 – RESULTADOS.....	24
6.1 – Isolamento e clonagem das amostras obtidas de insetos.....	24
6.2 – Caracterização morfológica das espécies obtidas.....	24
6.2.1 – Crescimento em meio de cultura.....	24
6.2.2 – Análise morfológica e biométrica dos tripanosomatídeos isolados de <i>M. scalaris</i>	25
6.5 – Análise isoenzimática.....	33
6.5.1 – Caracterização dos isolados obtidos de <i>M. scalaris</i>	33
6.6 – Zimotaxonomia.....	39
7 – DISCUSSÃO.....	40
8 – CONCLUSÕES	44
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10 – ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A ordem Hemiptera (Insecta: Heteroptera) agrupa insetos que se distinguem basicamente (a) pelo aparelho bucal tipo sugador-pungitivo de 3-4 segmentos, surgindo da região póstero-ventral da cabeça; (b) por possuírem o primeiro par de asas com a metade anterior coriácea e a porção posterior membranosa (embora algumas espécies não possuam asas); (c) 3-5 segmentos antenais, tarsos com número de artículos inferior a 4 e abdômen dorso-ventralmente achatado (Carreira 1980). Além das espécies que apresentam hábitos terrestres, que constituem a maioria, há as espécies aquáticas e semi-aquáticas. Estas são predadoras de insetos e de pequenos vertebrados ou sugadoras de algas.

As espécies terrestres podem ser predadoras (Reduviidae, Anthocoridae, Capsidade, Nabidae, Gerridae, Valiidae e Pentatomidae), hematófagas (alguns Reduviidae, Cimicidae, Lygaeidae, Anthocoridae, Polycetenidae), fungífagas (Araridae), sugadoras de cadáveres (Hydrometidae) e fitófagas (Pentatomidae, Coreidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae, Phymatidae, Miridae e Tingididae) (Costa-Lima 1940, Barth 1972, Carrera 1980).

A diversidade de hábitos nutricionais que apresentam as espécies que compõem a ordem Hemíptera suscita o interesse médico, veterinário e agrícola por este grupo, que atua como transmissores de patógenos a vertebrados e plantas em geral.

Assim, dentre os hemípteros fitófagos, encontram-se algumas espécies que causam grandes danos às plantas cultivadas. Tais danos resultam das picadas feitas com mandíbulas e maxilas, que permitem a penetração de microorganismos saprogênicos ou patogênicos; da sucção da seiva ou de cloroleucócitos; da ação irritante ou tóxica da saliva (Storey 1939, Carter 1939).

A diversidade de hábitos nutricionais que apresentam as espécies que compõem a ordem Hemíptera suscita o interesse médico, veterinário e agrícola por este grupo, que atuam como transmissores de patógenos a vertebrados e plantas em geral.

Assim, dentre os hemípteros fitófagos, encontram-se algumas espécies que causam grandes danos às plantas cultivadas. Tais danos resultam das picadas feitas com mandíbulas e maxilas, que permitem a penetração de microorganismos saprogênicos ou patogênicos; da sucção da seiva ou de cloroleucócitos; da ação irritante ou tóxica da saliva (Storey 1939, Carter 1939).

Estudos em hemípteros hematófagos evidenciaram que microorganismos simbiotes encontrados nestes insetos podem causar infecções ocasionais em vertebrados; os hemípteros podem, ainda, atuar como transmissores fortuitos de bactérias e vírus (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, vírus da família Picornaviridae, etc) e de tripanosomatídeos patogênicos ao homem e plantas (Camargo 1999).

A importância médica e econômica de agentes causadores de doenças tem sido um fator preponderante para alavancar pesquisas nestes organismos. Neste aspecto os estudos realizados em tripanosomatídeos isolados de vertebrados e de plantas foram durante muito tempo alvo da preferência dos pesquisadores em detrimento àqueles realizados com tripanosomatídeos obtidos de insetos. Mais recentemente estes estudos têm sido aprofundados levando-se em conta que estes últimos podem ser um ponto chave para estabelecer a filogenia dos tripanosomatídeos (Podlipaev, 2001).

1.1. Posição taxonômica e características gerais dos Tripanosomatídeos:

A Ordem Kinetoplastida Honigberg, 1963 (Protozoa: Zoomastigophora) agrupa protozoários que se caracterizam principalmente por possuírem uma massa de DNA extracelular compactado — o cinetoplasto — inserido em uma mitocôndria única que percorre todo o corpo celular; um ou dois flagelos inseridos em uma invaginação da membrana plasmática (bolsa flagelar) e as enzimas da cadeia glicolítica contidas numa organela (o glicossoma). O cinetoplasto pode estar condensado nas proximidades do cinetossoma do flagelo (eucinetoplasto); distribuído irregularmente pela mitocôndria de forma distendida (policinetoplasto) ou não (pancinetoplasto), podendo ainda não ser detectável em microscopia óptica de campo claro (discinetoplasto). A Ordem Kinetoplastida subdivide-se nas sub-ordens Bodonina Hollande, 1952 que inclui protozoários biflagelados, eu-, poli ou pancinetoplastídeos, onde a maioria das espécies é de vida livre e Trypanosomatina Kent, 1880, com protozoários uniflagelados eucinetoplastídeos, em que todas as espécies são parasitas obrigatórios, possuindo esta última uma única família, Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Vickerman 1990, Vickerman 1994).

O cinetoplasto é constituído por dois tipos de moléculas circulares de DNA concatenadas — os maxicírculos e os minicírculos. Nas espécies de tripanosomatídeos, os maxicírculos são homogêneos em seqüência, onde são encontradas 40-50 unidades de 20-38 kb por célula e são comparáveis ao DNA mitocondrial. Os minicírculos são de seqüência heterogênea, podendo ser encontradas 3.000-27.000 unidades de 0,46-6,5 kb; são utilizados no mecanismo de variabilidade genética, atuando como moldes para orientar deleções e inserções de uridina em moléculas de RNA transcritas pelos maxicírculos. A concatenação dos maxi- e minicírculos facilita o processo de edição do RNA e a segregação do kDNA

(DNA cinetoplastídico) durante o processo de divisão celular (Vickerman 1994, Sousa 2000).

As formas evolutivas dos tripanosomatídeos foram descritas, com base no ponto de exteriorização do reservatório flagelar no corpo celular e sua relação com a posição do núcleo e as extremidades da célula constituindo dois grupos básicos de exteriorização (terminal ou lateral) com possíveis implicações evolutivas (Baker 1963, Sousa 2002). Segundo Hoare & Wallace (1966), Wallace (1977) e Sousa (2000) os principais estágios encontrados na família Trypanosomatidae são: amastigotas, promastigotas, paramastigotas, opisthomastigotas, endomastigotas, coanomastigotas (diferenciando-se em pro-, para- e metacoanomastigotas de acordo com a migração do cinetoplasto), epimastigotas, tripomastigotas, esferomastigotas e escleromastigotas (morfologia externa similar às amastigotas) (Figura 1).

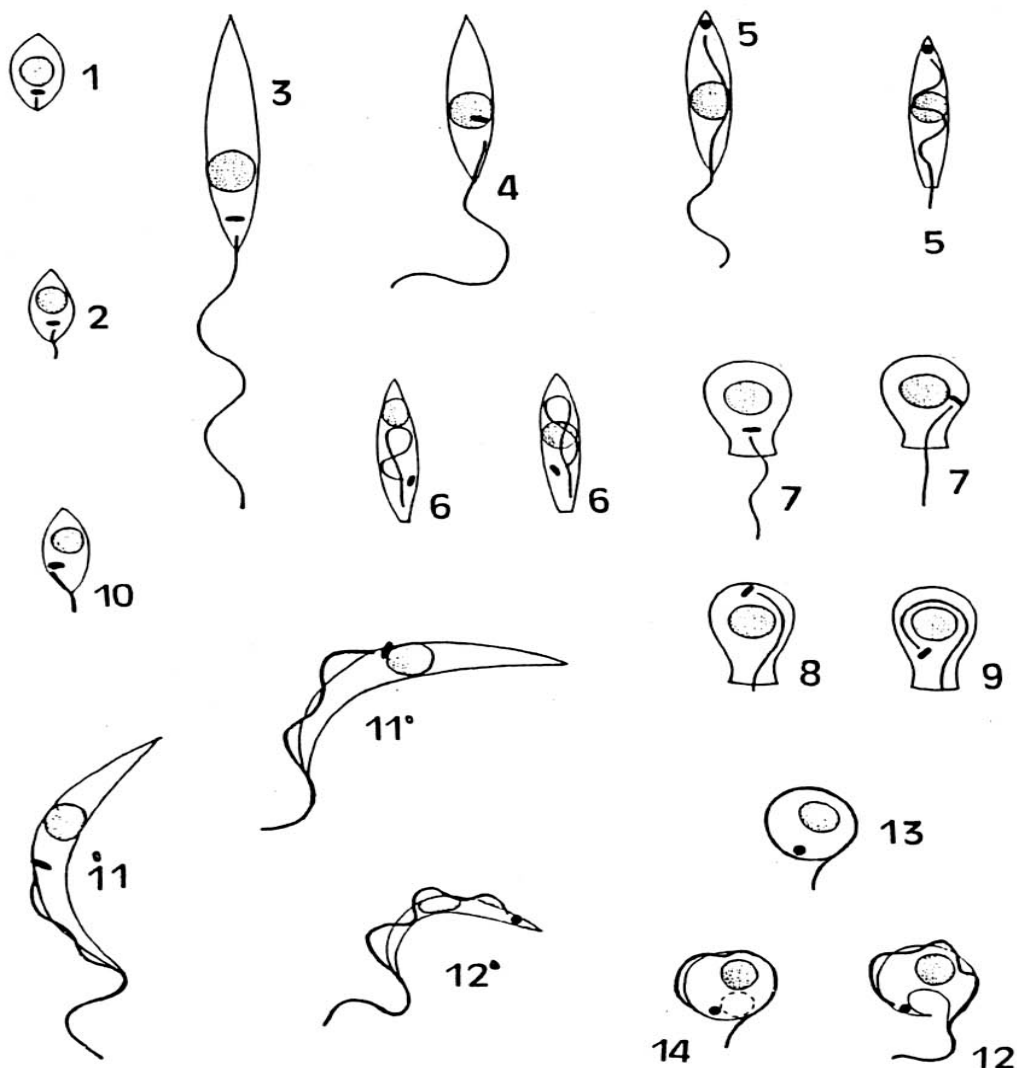


FIGURA 1 – Estágios evolutivos encontrados em tripanosomatídeos. (1) Amastigota. (2) Transição amastigota-promastigota. (3) Promastigota. (4) Paramastigota. (5) Opistomastigota. (6) Endocoanomastigota. (7) Coanomastigota. (8) Metacoanomastigota (ou opistomorfa). (9) Endocoanomastigota. (10) transição amastigota-epimastigota. (11) Epimastigotas. (12) Tripomastigotas. (13) Esferomastigota. (14) Transição esferomastigota-tripomastigota. Originais de MA Sousa, 2002.

Os tripanosomatídeos podem ter um só hospedeiro, sendo denominados monoxênicos ou possuem dois hospedeiros, um deles invertebrado, recebendo a denominação de heteroxênicos. São encontrados em insetos, principalmente nas ordens Hemiptera e Diptera, em vertebrados de todas as classes, em plantas de diversas famílias e também em moluscos, rotíferos, nematódeos e no macronúcleo de protozoários ciliados (Gillies & Hanson 1963, Vickerman 1976, Camargo 1999, Sousa 2002).

1.2. Gêneros de tripanosomatídeos monoxênicos:

A classificação genérica dos tripanosomatídeos, por técnicas parasitológicas clássicas, é baseada no número de hospedeiros necessários ao seu ciclo evolutivo e os estágios observados durante o mesmo. De acordo com as revisões de Wallace (1966, 1979), Vickerman (1976) e Sousa (2000), dos gêneros já propostos, são mais amplamente aceitos os seguintes:

- *Crithidia* Léger, 1902 : parasitas de insetos que possuem o corpo celular com a forma coanomastigota, com estágios predominantes de pro- e/ou paracoanomastigotas; meta- e endomastigotas ausentes ou em taxas muito baixas. Apresentam células aflageladas peculiares com núcleo e cinetoplasto posicionados posteriormente e geralmente unidas entre si pela extremidade anterior do corpo (haptomonas). Espécie-tipo: *Crithidia fasciculata* Léger, 1902.

▪ *Herpetomonas* Kent, 1880: parasitas de trato intestinal de insetos. Segundo Wallace (1966) e Vickerman (1976), estes tripanosomatídeos apresentam formas pro- e paramastigotas; opistomastigotas em pequenos percentuais (*sensu* Wenyon 1926). Entretanto, Sousa (2000), concluiu, com base na literatura original e em seus achados, que diversas espécies nomeadas genericamente como *Herpetomonas* (agrupadas de acordo a tipologia dada pelos autores supra-citados) possivelmente constituem outro *taxon*, e resgatou a seguinte definição para o gênero: parasitas que possuem um volumoso cinetoplasto de formato muito peculiar, não havendo outro membro da família Trypanosomatidae com esta estrutura no mesmo aspecto; possuem estágios biflagelados em elevadas taxas (> 50%), sendo este o caráter diagnóstico do gênero. Espécie-tipo: *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880 (= *H. muscarum ingenoplastis*).

▪ *Leptomonas* Kent, 1880: parasitas de protozoários ciliados, rotíferos, nematódeos, insetos, e moluscos. Espécies que formalmente possuem apenas formas promastigotas e, algumas vezes, cistos flagelares; entretanto, neste gênero têm sido incluídos organismos muito distintos por diversos parâmetros que, dentre outros aspectos, apresentam para- e opistomastigotas em baixos percentuais. Sousa (2000) enfatiza que a espécie-tipo, *Leptomonas bütschlii* Kent, 1880 e a primeira espécie descrita em inseto, *L. jaculum* Léger, 1902, necessitam serem reestudadas para a definição tipológica do gênero. Estudos comprovam que espécies incluídas neste gênero constituem, na realidade, uma mistura de *taxa*. (Kolesnikov *et al* 1990, Camargo *et al* 1992, Sousa 2000).

▪ *Blastocrithidia* Laird, 1959: parasitas de dípteros e hemípteros; apresentam formas epimastigotas e algumas espécies possuem cistos flagelares. Tripomastigotas também foram observadas em três espécies: *B. gerridis* (Ayroza-Galvão & Coutinho 1941), *B. culicis* (Sousa 1994) e *B. triatoma* (Silva-Júnior & Sousa 2004 – comentário pessoal). Espécie-tipo: *Blastocrithidia gerridis* (Patton, 1908) Laird, 1959.

1.3. Tripanosomatídeos heteroxênicos parasitas de plantas (segundo Sousa 2000):

▪ *Phytomonas* Donovan, 1909: parasitas de insetos e em plantas são agentes etiológicos de flageloses em algumas espécies de interesse agrícola. Possuem estágios promastigotas e células aflageladas com cinetoplasto anterior ou nas imediações do núcleo em taxas variáveis, de acordo com a espécie. Não existem estágios com cinetoplasto pós-nuclear neste gênero. Apresentam promastigotas com grande variação no comprimento da porção livre do flagelo, permitindo o fácil diagnóstico deste gênero. Espécie-tipo: *Phytomonas davidi* (Lafont, 1909) Donovan, 1909.

1.4. Artrópodes como vetores e hospedeiros de tripanosomatídeos inferiores:

Com exceção de quatro espécies pertencentes ao gênero *Leptomonas*, as mais de 100 espécies conhecidas de tripanosomatídeos são parasitas de artrópodes; a grande maioria distribui-se pelas ordens Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonaptera, Ixodida e Anoplura (revisões de Wallace 1979 e McGhee & Cosgrove 1980).

A notável diversidade de hospedeiros/vetores pode ser parcialmente explicada pela transmissão a artrópodes por via fecal-oral; entretanto, algumas espécies podem ser transmitidas por via transovariana (e.g. *L. jaculum* e *B. hyalomae* O'Farrel, 1913), embora sejam raras as descrições desta modalidade. Ninfas emergidas dos ovos de adultos infectados podem contaminar-se pela ingestão de substâncias cemetantes ou pelo canibalismo de ovos inférteis; alguns hemípteros, como *Lygaeus kalmii* Linnaeus (Hemiptera: Lygaeidae) cobrem seus ovos com fezes; sifonápteros alimentam suas larvas com fezes freqüentemente contaminadas com *Leptomonas* sp.; ninfas de *Triatoma infestans* (Galvão, Carcavallo, Rocha & Juberg 2003) e de outros triatomíneos infectam-se com *B. triatomae* Cerisola (Del-Prado, Rohwedder & Bozzini 1971) por coprofagia e "canibalismo" (McGhee & Cosgrove 1980, Schaub 1988).

Algumas espécies de tripanosomatídeos podem permanecer em substratos alimentícios de insetos (frutas, carcaças de animais). Este mecanismo é essencial para *Phytomonas* spp., que dependem do inseto vetor para sua manutenção em espécies vegetais, especialmente aquelas que morrem durante as estações frias nas regiões temperadas do hemisfério; neste caso, a dispersão de insetos fitófagos para regiões mais quentes é fundamental para perpetuação destes parasitas. Algumas espécies de tripanosomatídeos monoxênicos foram encontrados em fezes, polpa de frutas, tecidos vivos e carcaças de animais parasitados por dípteros muscóides (McGhee & Cosgrove 1980).

Dentre os dípteros muscóides, há a ocorrência dos forídeos que são moscas pequenas (1-6 mm) encontradas em todo mundo, sendo mais diversificadas nos trópicos. O gênero *Megaselia* inclui cerca de 1400 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais. *Megaselia scalaris* é cosmopolita e sinantrópica. As manchas marrons no seu tórax curvado, os olhos escuros e seus ovos brancos apresentando a parte superior coberta por espinhos são algumas características distintivas importantes (Furukawa & Kaneko, 1981, Brown, 1996). Esta espécie é capaz de explorar uma grande variedade de ambientes e nichos ecológicos. Embora já tenha sido registrada como uma espécie polífaga, agindo como saprófagos e necrófagos, também já foi descrita como uma importante espécie detritívora que consome tanto matéria animal quanto vegetal (Tumrasvin *et al.* 1997, Koller *et al.* 2003, Disney, 2007).

Acredita-se que muitas espécies de tripanosomatídeos possam ser hospedeiro-específicas; entretanto, estudos realizados com *Crithidia* spp., *Blastocrithidia* sp., *Leptomonas* sp. e *Strigomonas oncopelti* evidenciaram a manutenção destas espécies em outros insetos em médio prazo, porém, nestes casos, não foi detectada a transmissão para as gerações posteriores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Segundo Wallace (1966), a primeira observação de um tripanosomatídeo foi realizada por Anton Van Leeuwenhoek (1680) durante avaliações feitas no conteúdo intestinal de tabanídeos. Segundo este mesmo autor, Leidy (1853) e Burnett (1851) confirmaram a existência destes protozoários em tabanídeos, posteriormente Kent em 1880, com base nestes achados e em observações feitas a fresco em moscas e em sangue de ratos, concluiu que estes parasitas apresentavam similaridades com os anteriormente descritos e propôs o gênero *Herpetomonas* para agrupá-los. Neste mesmo período Wallace cria o gênero *Leptomonas* para um tripanosomatídeo de nematódeo.

Burnett (1852) foi possivelmente o primeiro a observar um tripanosomatídeo monoxênico, identificando-o, embora equivocadamente, como *Bodo*. Leidy em 1856 encontrou um parasita similar e o denomina *Bodo muscarum*. Entretanto, Hoare (1924) reviu a classificação desta espécie e concluiu que se tratava do gênero *Herpetomonas* (*apud* Sousa 2000).

Em 1898, Ross descreveu um parasita de mosquitos e relatou que os mesmos permaneciam aderidos ao epitélio intestinal destes insetos e tornavam-se alongados instantes depois de uma leve agitação. Estudos posteriores realizados para Novy e colaboradores em 1907, utilizando tripanosomatídeos do gênero *Crithidia* obtidos por Léger, além de novos isolados de mosquitos em cultura axênica (1902-1904), levaram os autores a concluir que se tratava de espécies de gêneros diferentes. Estes achados foram a base da evolução da pesquisa nos tripanosomatídeos (Wallace 1966).

Os estudos de Patton em 1907 concluíram que os tripanosomatídeos de insetos eram transmitidos verticalmente e não necessariamente de hospedeiros vertebrados. Nesta época, os protozoologistas discutiam a similaridade dos gêneros *Leptomonas* e *Herpetomonas* e se insetos poderiam ser vetores de Leishmanias e Tripanosomas. Estudos relacionados à

bioquímica e fisiologia começaram a surgir na década de 20, onde se destaca a descoberta por Lwoff (1940) da importância da hemina para o crescimento axênico para tripanosomatídeos (Wallace 1966).

Lafont (1909), enquanto investigava as propriedades medicinais de plantas lactíferas, descobriu tripanosomatídeos no látex de Euforbiáceas e nomeou-os como *Leptomonas davidi*. Em 1909, Donovan propõe o gênero *Phytomonas* para os flagelados de plantas; entretanto, este não foi aceito facilmente pela comunidade científica da época, pois o proponente também acreditava que todos os tripanosomatídeos isolados de mamíferos deveriam ser agrupados no gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843, fato este contestado pelos pesquisadores da época. Somente em 1927 o nome genérico é dado a uma espécie, *P. francai* Aragão. Na época, especulou-se que plantas poderiam atuar como reservatórios de tripanosomíases e leishmanioses. Entretanto, os estudos de Holmes (1925) demonstraram a não-patogenicidade de tripanosomatídeos de vegetais. O interesse pelas *Phytomonas* aumenta com a descoberta de que estes protozoários atuam como agentes etiológicos de doenças em plantas de interesse agrícola (*apud* Camargo 1999 e Sousa 2000).

Wenyon (1926), em sua grandiosa obra, *Protozoology*, descreve como caráter diagnóstico do gênero *Herpetomonas*, estágios com cinetoplasto pós-nuclear, distinguindo-as das *Leptomonas*, já que as primeiras eram consideradas parte do ciclo do último gênero. Grandes equívocos foram cometidos em relação à taxonomia de tripanosomatídeos, já que para inúmeros pesquisadores, na época, os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* eram considerados similares. Misturas naturais de tripanosomatídeos de insetos levaram vários autores a conclusões equivocadas quanto ao ciclo evolutivo e diagnose de gêneros e espécies (Wenyon 1926). De acordo com Sousa (2000) a organização taxonômica da família se inicia com os trabalhos de Laird (1959),

Hoare (1964, 1972), Wallace (1966, 1979) e Vickerman (1976) e se consolida com os trabalhos de Podlipaev (1990), Podlipaev *et al* (1996, 2000) e Sousa (2000).

A partir da década de 70, novas técnicas de estudos com tripanosomatídeos foram aprimorados, contribuindo para a taxonomia do grupo. Análises ultraestruturais demonstraram semelhanças e diferenças entre espécies além de revelarem peculiaridades de alguns grupos (Simpson 1972, revisão de Vickerman & Preston 1976, etc). Estudos bioquímicos levaram à descoberta de novos marcadores de distinção (Camargo 1979, Lima *et al* 1979, etc); análises sorológicas (McGhee & Hanson 1963, Lainson & Shaw 1966, etc) e genóticas (Camargo *et al* 1992, Brandão *et al* 2000, etc) permitiram a distinção de tripanosomatídeos erroneamente considerados indistinguíveis morfologicamente (Sousa 2000), bem como a identificação e agrupamento de espécies.

Desta forma, diante da diversidade dos tripanosomatídeos e da conseqüente dificuldade em sua classificação, torna-se evidente a necessidade de estudos multidisciplinares visando o conhecimento e a correta classificação destes organismos.

3. OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento da biodiversidade da família Trypanosomatidae através da identificação de parasitas encontrados no trato intestinal de *Megaselia scalaris*, correlacionando os dados obtidos com os de amostras de referência, visando à identificação deste(s) parasita(s).

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o isolado de tripanosomatídeo obtido de *Megaselia scalaris* por diferentes abordagens: (1) análise do crescimento e diferenciação celular, (2) morfobiometria, (3) zimotaxionomia.

Utilizar os dados da análise bioquímica em estudos complementares de taxonomia numérica computacional, visando a identificação de grupos de amostras.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Captura dos insetos

Exemplares de *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) (figura 2) foram manualmente coletados (durante repasto) na localidade de Engenho Novo, Município do Rio de Janeiro/RJ. Os insetos foram acondicionados em saco plástico de cloreto de polivinila (PVC) em temperatura ambiente, e mantidos nestas condições até o momento da análise do conteúdo intestinal.



Copyright © 2005 Charles Schurch Lewallen

FIGURA 2: Exemplar de fêmea de *Megaselia scalaris* coletada na localidade de Engenho Novo, Município do Rio de Janeiro – RJ.

5.2. Isolamento de tripanosomatídeos e coprocultura:

Os insetos identificados foram sacrificados em câmara contendo clorofórmio e descontaminados (imersão em álcool 80%). Posteriormente foram alfinetados nas imediações do pronoto em uma placa de vidro parafinada. O abdômen (exoesqueleto dorsal) foi removido cortando-se lateralmente os conexivos. Em seguida, o conteúdo intestinal de

cada inseto foi macerado em 3 ml de solução salina suplementada com antibióticos e fungistáticos (SSAF) (NaCl 0,85%; 5-fluorocitosina [100µg/ml]; 0,07 ml penicilina G-potássica [200U/ml], 0,08 sulfato de estreptomicina [1g/ml] e 100 ml H₂O destilada). Para verificação de positividade, uma alíquota do material foi examinada a fresco ao microscópio ótico (M.O.) e a fase líquida desta suspensão foi semeada em tubos de polietileno (15 ml) contendo meio LIT (Camargo 1979) diluído (veja anexos); as porções maceradas do trato intestinal restante foram semeadas em tubos de ensaio 16 x 150 mm contendo meio bifásico N.N.N. (Novy *et al* 1908) + LIT básico suplementado 10% de soro fetal bovino (SFB) ou em Ágar BHI + FYTSM (veja anexo). Para auxiliar a descontaminação das coproculturas em LIT diluído, estas foram centrifugadas a 2000 g, 15 min, 4°C, e em seguida, mantidas em torno de 27,3°C por 7 dias em câmara incubadora.

5.3. Descontaminação dos isolados e criopreservação:

Após incubação, as amostras foram avaliadas em M.O. e, se observada a presença de fungos e/ou bactérias, as coproculturas receberam uma nova dose (0,5 ml) de salina suplementada com antibióticos, sendo posteriormente incubadas por 72 h. Nos casos de persistência de microorganismos contaminantes, cerca de 1 ml de cada coprocultura foi aplicada em tubos de migração capilar (tubos em “W”) (Vickerman 1990, Romeiro 2000) contendo meio LIT básico. As culturas provenientes dos tubos de migração e dos tubos de ensaio foram criopreservadas em botijões contendo N₂ líquido, utilizando-se glicerol a 10% como crioprotetor (Sousa 2002).

5.4. Cultivo axênico e clonagem das amostras:

Culturas provenientes de meio N.N.N. + LIT ou em fase exponencial foram clonadas utilizando-se um equipamento de citometria de fluxo (*Coulter's EPICS 751*). Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (fundo redondo) contendo 200 µl de meio LIT 20 % SFB. Um clone deste isolado foi selecionado ao acaso e cultivado no em meio. Dois outros clones selecionados ao acaso foram criopreservados e não serão incluídos neste estudo.

5.5. Análise morfológica e morfométrica do clone:

5.5.1. Análise do crescimento:

O crescimento do clone selecionado foi acompanhado em LIT básico, LIT sem soro, LIT 20% SFB (veja anexo). O primeiro meio foi preferencialmente utilizado pois de acordo com Sousa (2000) este é utilizado como padrão para caracterização de tripanosomatídeos.

As culturas foram iniciadas com 2×10^6 células em fase exponencial, provenientes de um dos meios monofásicos utilizados. O crescimento dos parasitas foi acompanhado por 48-144 h, em intervalos de 24 h, onde alíquotas foram retiradas de cada cultura para estimativa do número de parasitas/µl, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer. A capacidade de multiplicação *in vitro* foi avaliada utilizando-se a média aritmética obtida na quantificação das amostras em cada intervalo estudado.

5.5.2. Biometria dos estágios evolutivos identificados:

Os estágios evolutivos identificados no intervalo de 72 h foram desenhados (exceto divisões) utilizando-se câmara clara acoplada ao microscópio óptico em aumento de 1000 × (objetiva de imersão). As medidas foram tomadas em centímetros e convertidas em micrômetros com base em escala pré-determinada (Sousa 2000).

Trinta células do estágio identificado foram analisadas sob os seguintes parâmetros, estabelecidos por Hoare C & Wallace FG (1966): comprimento do corpo sem o flagelo livre (C), largura do corpo nas imediações do núcleo (L), comprimento do flagelo livre (F), distância da extremidade posterior do corpo celular ao meio do núcleo (PN), distância do meio do núcleo à extremidade anterior (NA) e o índice nuclear ($IN = PN/NA$).

5.5.3. Avaliação comparativa do clone com outros tripanosomatídeos:

O clone do isolado de *M. scalaris* foi comparado com diversos tripanosomatídeos isolados de plantas e insetos (principalmente hemípteros) caracterizados por Sousa (2000) e depositado na coleção de tripanosomatídeos, objetivando a identificação genérica e, se possível, a determinação da espécie. As espécies e sua procedência estão indicados na TABELA 1, 2 e 3. De acordo com os resultados obtidos na análise morfológica, as espécies com maior afinidade foram selecionadas para a análise biométrica e/ou bioquímica conjuntamente com o clone. Os isolados que não obtiveram multiplicação celular em taxas mínimas para sua manutenção em meio LIT ou LIT 20% SFB foram comparados em meio BHI-FYTSM conjuntamente com as amostras de referência de maior similaridade.

TABELA 1 – Tripanosomatídeos do gênero *Herpetomonas* utilizados como organismos de referência para estudos comparativos com clone da amostra isolada de *M. scalaris*.

Amostras	Hospedeiro
<i>H. muscarum muscarum</i>	<i>Musca domestica</i> (Diptera, Muscidae)
<i>H. muscarum</i> ¹	<i>Phormia Regina</i> (Diptera, Calliphoridae)
<i>H. megaseliae</i>	<i>Megaselia scaralis</i> (Diptera: Phoridae)
<i>H. anglusteri</i>	<i>Liopygia ruficornis</i> (Diptera, Sarcophagidae)
<i>H. mariadeanae</i>	<i>Muscina stabulans</i> (Diptera, Muscidae)
<i>H. pessoai</i> ²	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera, Reduviidae)
<i>H. davidi</i> ³	<i>Euphorbia cyathophora</i> (Plantae, Euphorbiaceae)
<i>Herpetomonas sp.</i>	<i>Euphorbia hyssopifolia</i> (Plantae, Euphorbiaceae)
<i>Herpetomonas sp.</i>	<i>Leptoglossus stigma</i> (Hemiptera, Coreidae)
<i>Herpetomonas sp.</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> (Plantae, Solanaceae)

Fonte: M A Sousa 2000.

¹(=) *H. muscarum ingenoplastis*. ²(=) *H. samuelpessoai*. ³ isolado de McGhee & Postell 1976.

TABELA 2 – Tripanosomatídeos do gênero *Phytomonas* utilizados como organismos de referência para estudos comparativos com clone da amostra isolada de *M. scalaris*.

Amostras	Hospedeiro
<i>Phytomonas francai</i>	<i>Manihot esculenta</i> (Plantae: Euphorbiaceae)
<i>Phytomonas sp.</i>	<i>Allamanda cathartica</i> (Plantae: Apocynaceae)
<i>Phytomonas sp.</i>	<i>Citrus bergamia</i> (Plantae: Rutaceae)
<i>Phytomonas sp.</i> ¹	<i>Euphorbia pínea</i> (Plantae: Euphorbiaceae)
<i>Phytomonas sp.</i>	<i>Janthropa macrantha</i> (Plantae: Euphorbiaceae)
<i>Phytomonas macgheei</i> ²	<i>Zea mays</i> (Plantae: Graminae)
<i>Phytomonas serpens</i> ³	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Plantae: Solanaceae)
<i>Phytomonas sp.</i> ⁴	<i>Euphorbia characias</i> (Plantae: Euphorbiaceae)

Fonte: M A Sousa 2000.

¹isolado EM 1. ²Infeção experimental com parasitas de *Leptoglossus zonatus* naturalmente infectado. ³isolado 9T. ⁴isolado EC 2 .

TABELA 3 – Tripanosomatídeos dos gêneros *Angiomonas*, *Cercoplasma*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Strigomonas* e *Wallaceína* utilizados como organismos de referência para estudos com o clone da amostra isolada de *M. scalaris*.

Amostras	Hospedeiro
<i>Crithidia fasciculata</i> ¹	<i>Anopheles quadrimaculatus</i> (Diptera, Culicidae)
<i>Angiomonas deanei</i> (*)	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera, Reduviidae)
<i>Strigomonas oncopelti</i> (*)	<i>Asclepias syriaca</i> (Plantae, Asclepiadaceae)
<i>Cercoplasma mirabilis</i>	<i>Cynomyopsis cadaverina</i> (Diptera, Calliphoridae)
<i>Leptomonas sp.</i> ²	<i>Lutzomyia ayrozai</i> (Diptera, Psychodidae)
<i>Leptomonas costoris</i>	<i>Gerris comatus</i> (Hemiptera, Gerridae)
<i>Leptomonas samueli</i>	<i>Zelus leucogrammus</i> (Hemiptera, Reduviidae)
<i>Leptomonas lactosovorans</i>	<i>Zelurus martinsi</i> (Hemiptera, Reduviidae)
<i>Leptomonas pulexsimulantis</i>	<i>Pulex simulans</i> (Siphonaptera, Pulicidae)
<i>Leptomonas wallacei</i> ³	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera, Lygaeidae)
<i>Leptomonas sp.</i> ⁴	<i>Oncopeltus varicolor</i> (Hemiptera, Lygaeidae)

Fonte: M A Sousa 2000.

¹ cepa *Anopheles* . ² isolado IM 3943 clone 1. ³ clone B. ⁴ isolado 36/429 TD. (*) amostras com endossimbionte bacteriano no citoplasma.

5.6. Análise isoenzimática e taxonomia numérica:

5.6.1. Ampliação e estocagem das amostras:

Culturas em fase exponencial do clone obtido e de algumas espécies de tripanosomatídeos foram ampliadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo 50 ml de meio NNN + LIT básico ou Ágar BHI + FYTSM. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas 3 vezes a 3000g, 15 min, 4°C e lavadas em salina com EDTA a 1% (NaCl 0,85%, EDTA dissódico 0,1 M 1%, 100 ml H₂O destilada) a cada centrifugação. As massas celulares obtidas foram estocadas em N₂ líquido até o momento da eletroforese.

5.6.2. Eletroforese de isoenzimas:

Às massas parasitárias foram adicionados 100 µl de tampão de lise com protetor de atividade enzimática (10 ml Tris HCl 0,05 M pH 8,0; 10 ml Triton X-100 a 10%; 37 mg EDTA dissódico; 15 mg DTT; 13 mg ácido n-amino-capróico; 80 ml H₂O); posteriormente, 4 µl destas suspensões foram aplicadas em géis de agarose 1% com auxílio de uma fita plástica para demarcação do local (50 ml agarose 1% aquecida sobre o “gel bond[®]” [124 x 258 mm] e, após a polimerização, os géis foram mantidos em geladeira por 24 h). Uma alíquota de solução corante foi usada ao lado das amostras para indicar o momento de interrupção das corridas (azul de bromofenol [3,4 mg/ml] e xilenocianol [2,8 mg/ml]). Posteriormente, os géis foram colocados em cuba de eletroforese horizontal. As enzimas GPI (Glicose-6-fosfatase – E.C.5.3.1.9), PGM (Fosfoglicomutase - E.C.1.4.1.9), ACON (Aconitase – E.C.1.4.1.9), MDH (Malato desidrogenase - E.C.1.1.1.37), IDH (Isocitrato desidrogenase – E.C.1.1.1.42), ME (Enzima málica – E.C.1.1.1.4.0), 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase – E.C.1.1.1.44), FUM (Fumarase hidratase ou Fumarase – E.C. 4.2.1.2), HK (Hexokinase – E.C. 2.7.1.1) e MPI (Mannose-6-Phosphate Isomerase – E.C.5.3.1.8) foram utilizadas para caracterização isoenzimática; os substratos, co-fatores,

corantes e soluções tampão específicas para cada enzima estão listados na TABELA 4 e 5. A reação enzimática foi interrompida com ácido acético glacial 5% e cada gel lavado em água destilada para retirar o excesso do corante. Após secagem, os géis foram analisados qualitativamente.

TABELA 4 – Soluções e substratos utilizados no sistema de revelação enzimática para análise das isoenzimas GPI, PGM, MPI, HK e 6PGDH.

Itens	Enzimas				
	GPI	PGM	MPI	HK	6PGDH
Tampão de corrida	1	1	2	2	1
Amperagem/ Voltagem	108 mA/50 V	108 mA/50 V	108mA/ 50V	108mA/ 50V	108 mA/50 V
Tampão de revelação	A	A	A	A	A
Substrato	Frutose-6-fosfato [20 mg/ml] (1 m)	Glicose-1-fosfato [20 mg/ml] (2 ml)	Mannose -6- Phosphate isomerase (10mg/ml) (2 ml)	Glicose (100 mg/ml)	Ácido 6- fosfoglicônico [20 mg/ml] (1 ml)
Coenzima	NADP [4 mg/ml] (1 ml)	NADP [4 mg/ml] (1 ml)	NADP [4 mg/ml] (1 ml)	NADP [4 mg/ml] (1 ml)	NADP [4 mg/ml] (1 ml)
Ativador enzimático	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	MgCl ₂ [1M] (500 µl)
Visualização	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)
Enzima de ligação	G6PDH [1 U/µl] (2 µl)	-	G6PDH [1 U/µl] (4 µl) PGI [1 U/µl] (2 µl)	-	-

1 – Tampão Tris-Maleico pH 7,4 (Tris 0,1 M; EDTA dissódico 0,001 M); 2 – Tampão Tris-Citrato pH 8,1 (Tris 0,34M, ácido cítrico 0,079M); MgCl₂ 0,001 M; Ácido maléico 0,43 M); A – Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (4 ml). Para a revelação foram utilizados 1 ml de agarose 1% em cada sistema enzimático.

TABELA 5 – Soluções e substratos utilizados no sistema de revelação enzimática para análise das isoenzimas FUM, IDH, MDH, ME e ACON.

Itens	Enzimas				
	FUM	IDH	MDH	ME	ACON
Tampão de corrida	2	3	3	3	3
Amperagem/Voltagem	108mA/ 50V	200 mA/ 118 V	200 mA/ 118 V	200 mA/ 118 V	200 mA/ 118 V
Tampão de revelação	B	C	C	C	C
Substrato	Ácido fumárico pH 7,0 (1 ml)	Isocitrato [20 mg/ml] (2 ml)	Malato de Sódio pH 7,0 [1M] (1 ml)	Malato de Sódio pH 7,0 [1M] (1 ml)	Cis-aconitato pH 8,0 [1M] (2 ml)
Coenzima	NAD [4 mg/ml] 1 ml	NADP [4 mg/ml] 1 ml	NAD [4 mg/ml] 1 ml	NADP [4 mg/ml] 1 ml	NADP [4 mg/ml] 1 ml
Ativador enzimático	-	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	-	MgCl ₂ [1M] (200 µl)	MgCl ₂ [1M] (1 ml)
Visualização	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)	PMS [3mg/ml] (1ml) MTT [3mg/ml] (2 ml)

2 – Tampão Tris-Citrato pH 8,1(Tris 0,34M, ácido cítrico 0,079M); 3 – Tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0 (Na₂HPO₄ 0,5 M; NaHPO₄ 0,5 M); B Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (4 ml); C– Tris-HCl 0,05 pH 8,0. Para a revelação foram utilizados 1 ml de agarose 1% em cada sistema enzimático.

5.6.3. Zimotaxonomia:

A interpretação dos resultados foi efetuada de acordo com a mobilidade relativa das bandas em relação a uma banda de referência ou linha de frente, e construídas matrizes de dados, com atribuição de escores, baseadas na presença (1) e ausência (0) de bandas, usando o software NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers*), v 2.2 (Rohlf, 1992). Para a estimativa da similaridade genética entre os genótipos foi usado o coeficiente de *Jaccard*, através do programa *SIMQUAL* (similaridade para dados qualitativos), e para a análise de agrupamento o programa *UPGMA* (método da média aritmética não ponderada).

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento e clonagem das amostras obtidas de insetos:

Os tripanosomatídeos obtidos de *M. scalaris* foram isolados em meio LIT + SSAF e também cresceram satisfatoriamente em meio N.N.N + LIT.

6.2. Caracterização morfológica das espécies obtidas:

6.2.1. Crescimento em meio de cultura:

O clone obtido do isolado original de *M. scalaris* pode ser cultivado em meio LIT, LIT 10% SFB (soro fetal bovino). apresentando médias de crescimento parecidas, sendo a intensidade menor no clone cultivado no primeiro meio. Em ambas condições de cultivo, a intensidade de crescimento máxima foi em 144h (GRÁFICO 1).

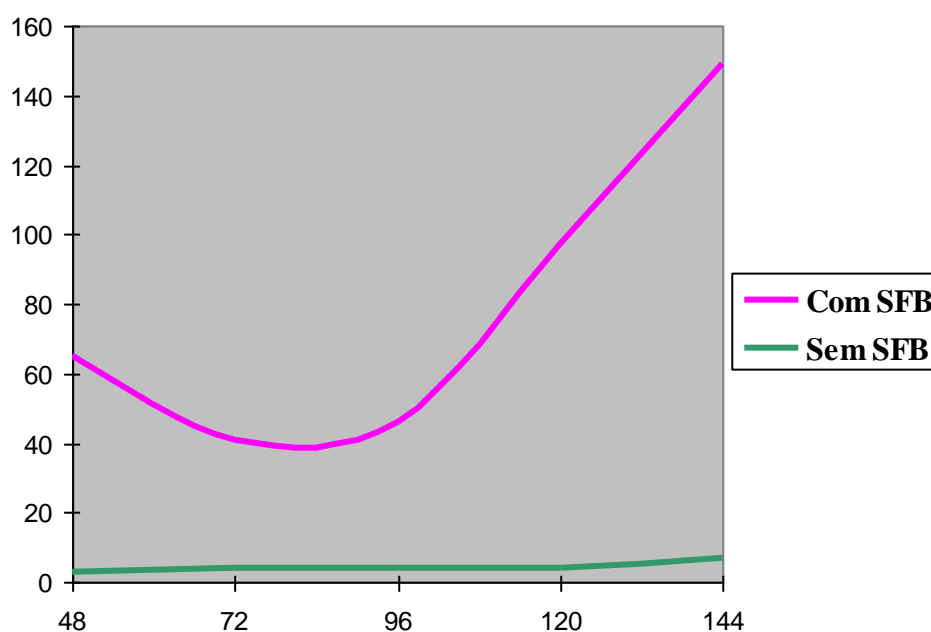


GRÁFICO 1 – Curva de crescimento do clone da amostra isolada de *M. scalaris* em intervalos pré-determinados. O eixo das ordenadas corresponde ao número de parasitas/μl; os das abscissas corresponde ao tempo em horas (h). A legenda indica o clone estudado em meio LIT 10% com SFB e em meio LIT sem SFB.

6.2.2. Análise morfológica e biométrica dos parasitas isolados de *Megaselia scalaris*:

A análise deste isolado revelou a presença de formas promastigotas como estágio predominante (98%) e células em processo de divisão (2%), estas, originando sempre promastigotas. Foi observado polimorfismo neste estágio. Algumas promastigotas apresentaram-se de forma mais alongada do que outras, por vezes com comprimento do corpo menor quando comparadas; outras eram extremamente arredondadas (figuras de 3 a 7, tabela 6). Todas as células apresentaram núcleo na extremidade posterior.

Porém, como pode ser visualizado na figura 8, apesar da variação de tamanho, não foi observada alteração do cinetoplasto em relação ao núcleo, e desta maneira, confirmando sua classificação como promastigotas.

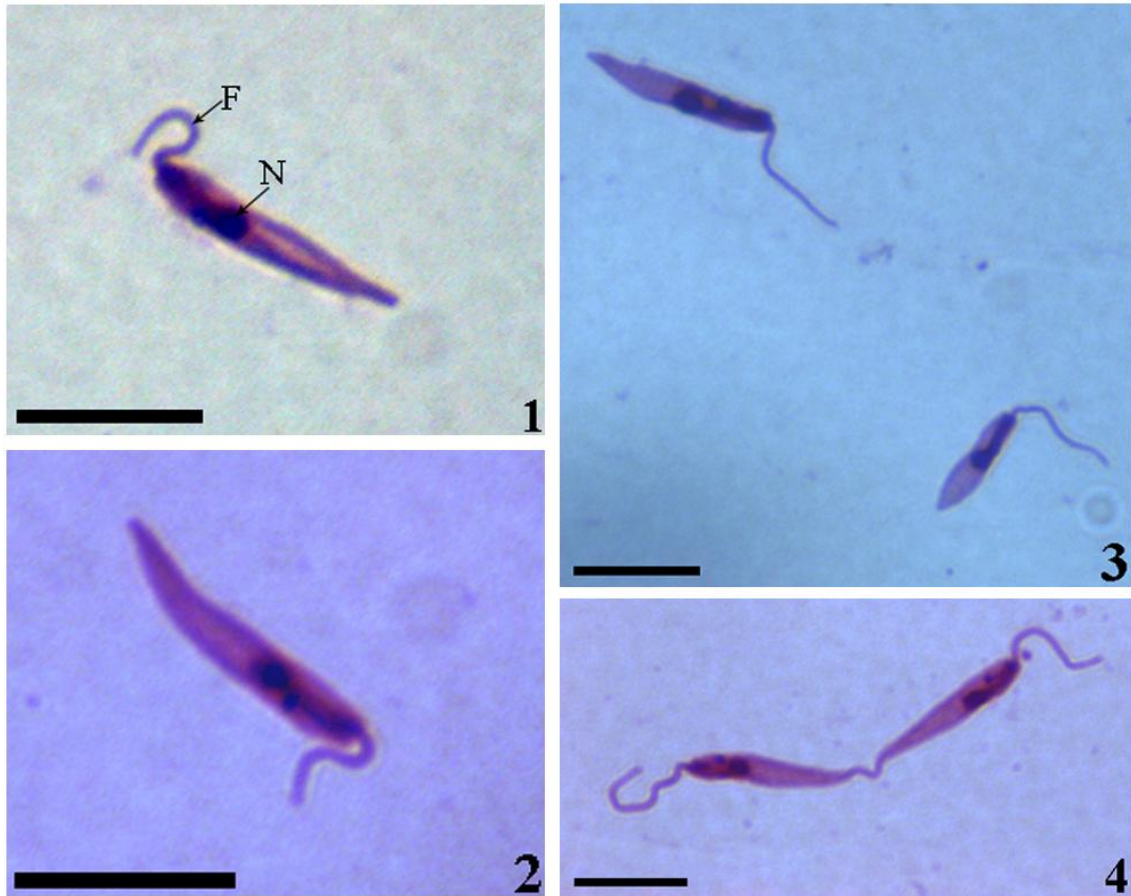


Figura 3: Prancha das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do isolado de *M. scalaris* durante 48h de cultivo em meio LIT 10% sem soro fetal bovino (SFB). N= núcleo, F = flagelo. A escala corresponde a 10µm.

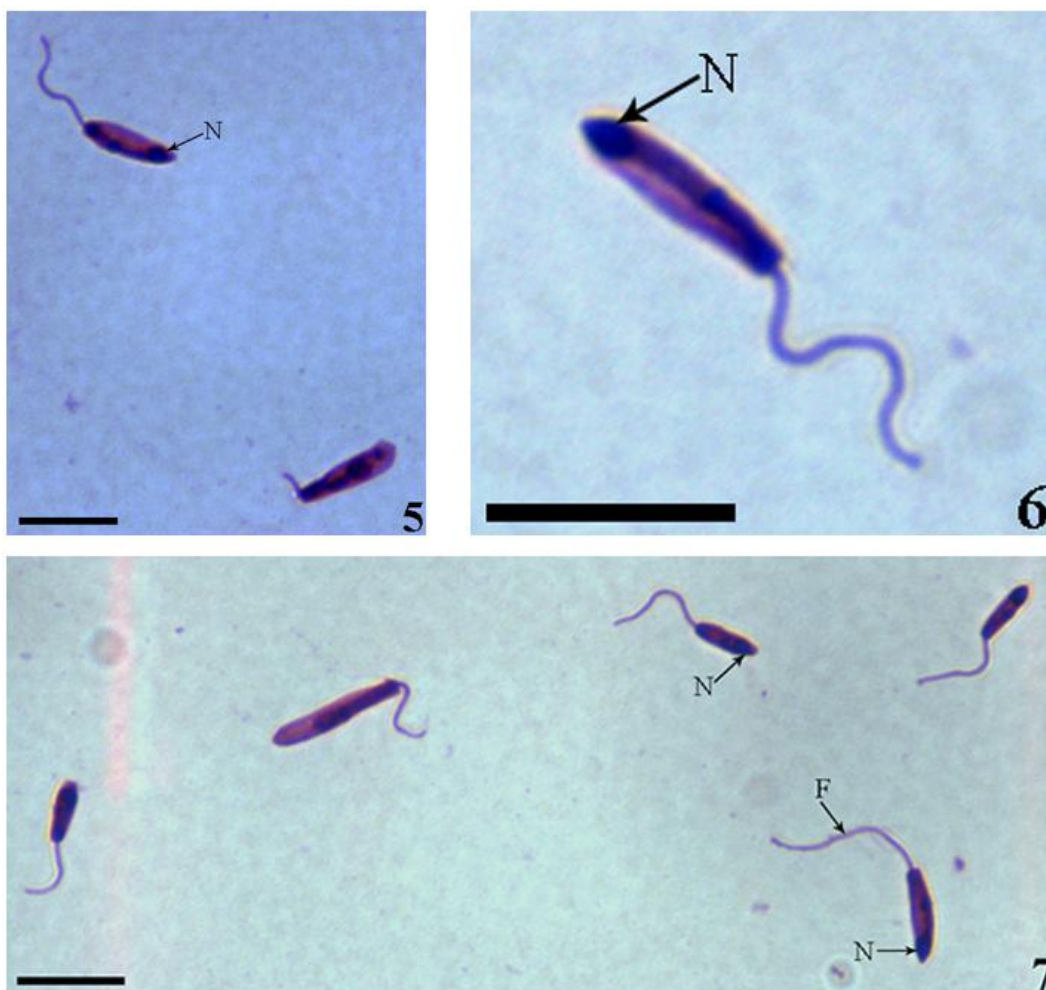


Figura 4: Prancha das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do isolado de *M. scalaris* durante 72h de cultivo em meio LIT 10% sem soro fetal bovino (SFB). N= núcleo, F = flagelo. A escala corresponde a 10 μ m.

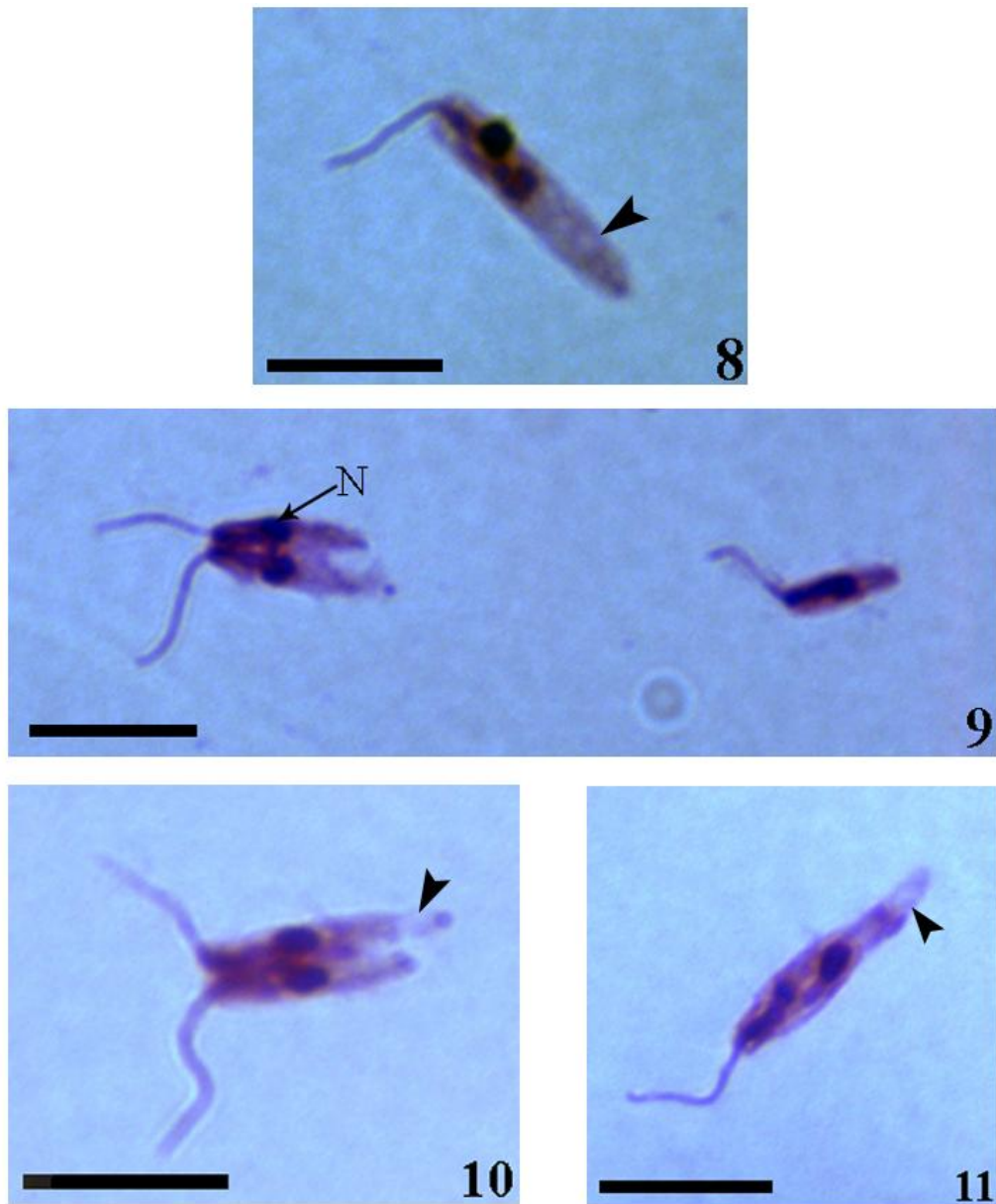


Figura 5: Prancha das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do isolado de *M. scalaris* durante 96h de cultivo em meio LIT 10% sem soro fetal bovino (SFB). N= núcleo. As setas indicam formas em degeneração. A escala corresponde a 10 μ m.

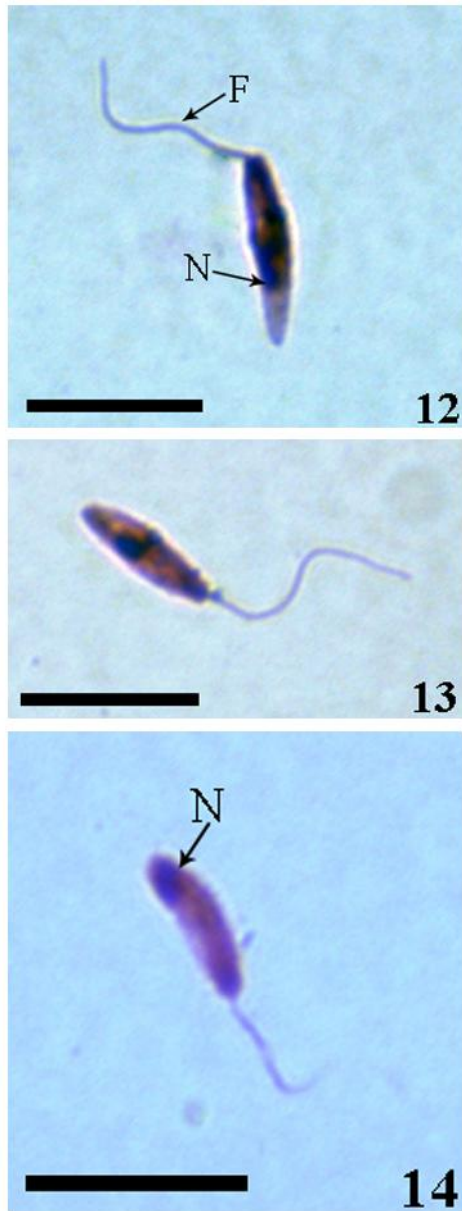


Figura 6: Prancha das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do isolado de *M. scalaris* durante 120h de cultivo em meio LIT 10% sem soro fetal bovino (SFB). N= núcleo, F = flagelo. A escala corresponde a 10µm.

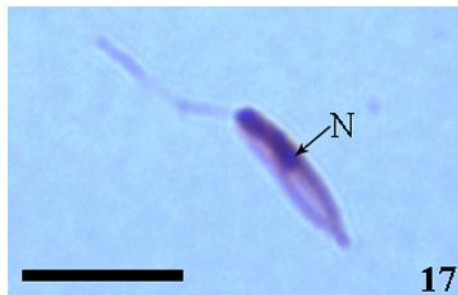
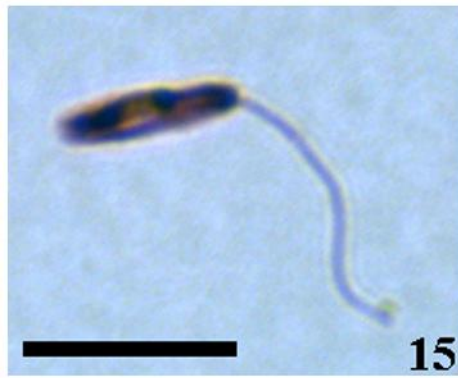
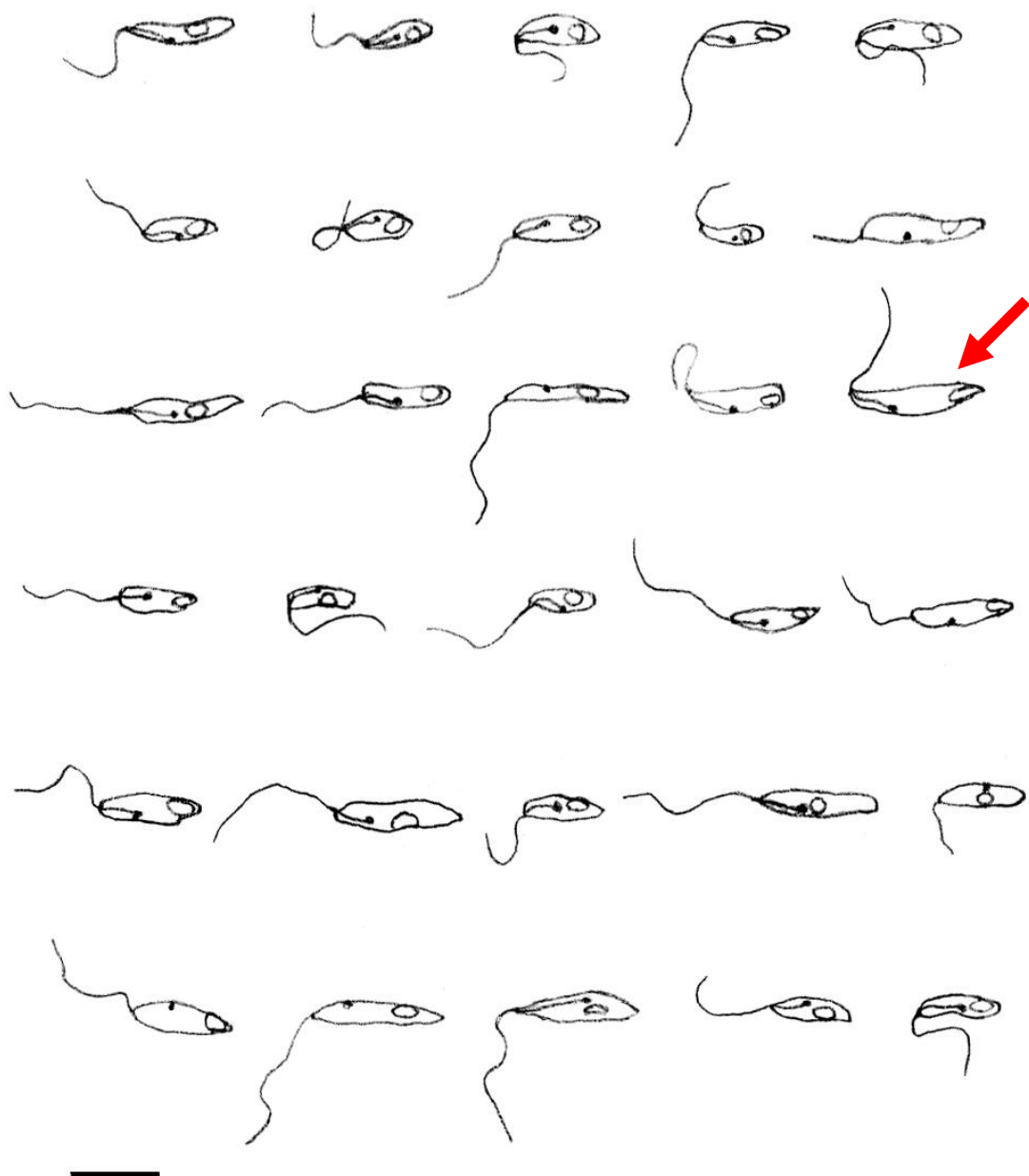


Figura 7: Prancha das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do isolado de *M. scalaris* durante 144h de cultivo em meio LIT 10% sem soro fetal bovino (SFB). N= núcleo. A escala corresponde a 10 μ m.



10 μ m

Figura 8: Desenhos em câmara clara das formas encontradas em esfregaços corados pelo Giemsa (após tratamento com HCl) do clone do isolado de *M. scalaris* durante as 72h de cultivo em meio LIT 10% sem SFB. Observe a presença de promastigotas, uma delas de grande tamanho em relação as outras. A escala corresponde a 10 μ m.

TABELA 6 – Biometria das células flageladas com cinetoplasto antenuclear encontradas na amostra isolada de *M. scalaris* durante as 72 h de cultivo em meio LIT. Os resultados (em μm) indicam a média e o desvio padrão (N = 30).

Amostra	Promastigotas			
	C	L	F	IN
Isolado MS	12,1 \pm 2,75	1,9 \pm 0,8	12,3 \pm 3,4	0,41

C = comprimento do corpo sem o flagelo livre; **L** = largura do corpo nas imediações do núcleo; **F** = comprimento do flagelo livre; **IN** (PN/NA) = índice nuclear (Dias & Freitas, 1943); corresponde à razão entre a distância da extremidade posterior ao centro do núcleo (PN) e a distância da extremidade anterior ao centro do núcleo. Isolado MS = amostra isolada de *M. scalaris*.

6.5. Análise isoenzimática:

6.5.1. Caracterização dos isolados obtidos de *M. scalaris*:

Nesta análise, o isolado estudado apresentou padrão isoenzimático similar ao exibido por *Herpetomonas megaseliae* em 8 dos 10 sistemas utilizados, sendo diferentes nos sistemas 6PGDH e MPI e se distinguiram de todas as outras amostras estudadas na maioria dos sistemas utilizados. Nas figuras de 9 a 13 estão representados os padrões dos perfis isoenzimáticos das amostras analisadas das dez enzimas testadas.

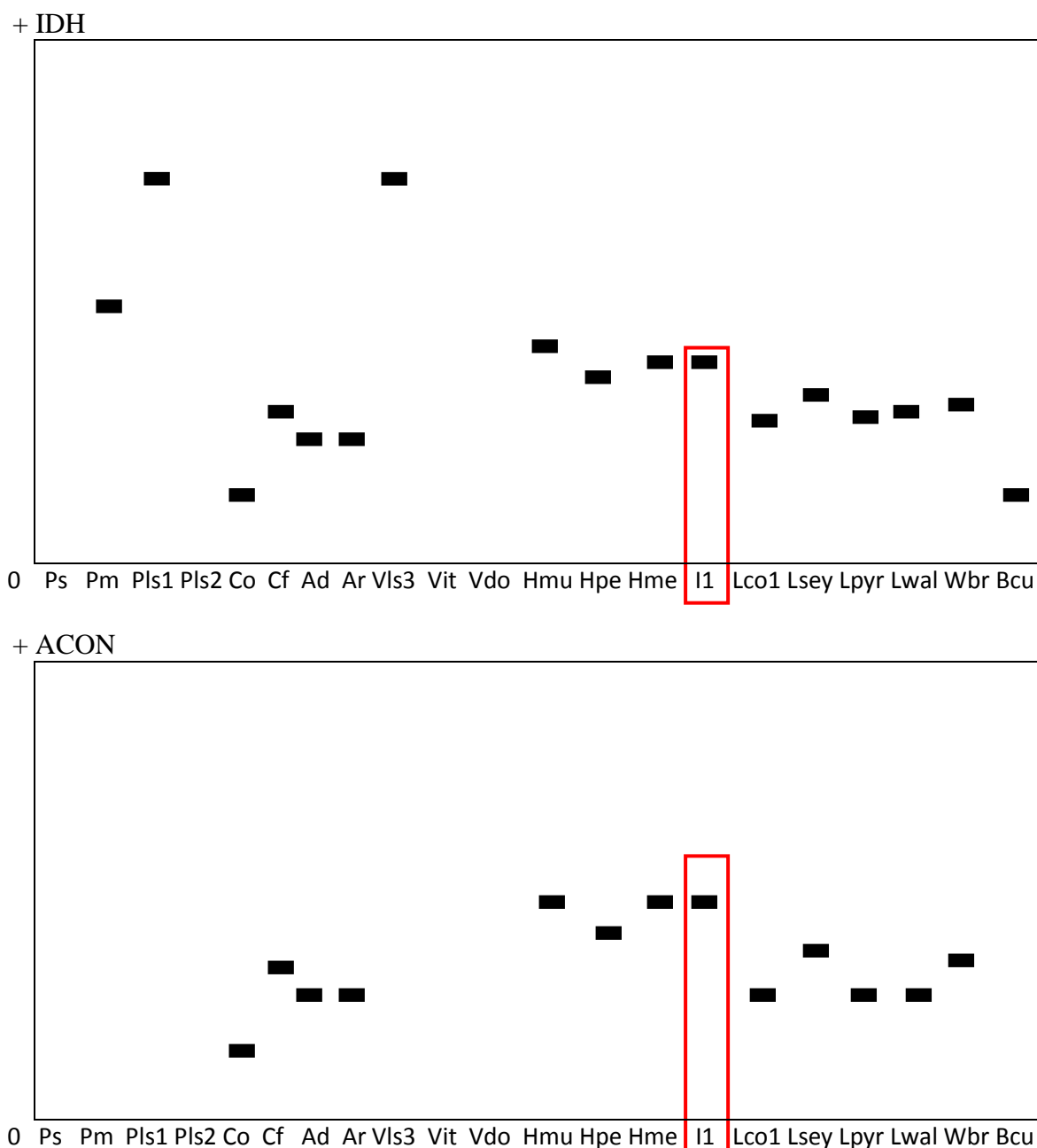
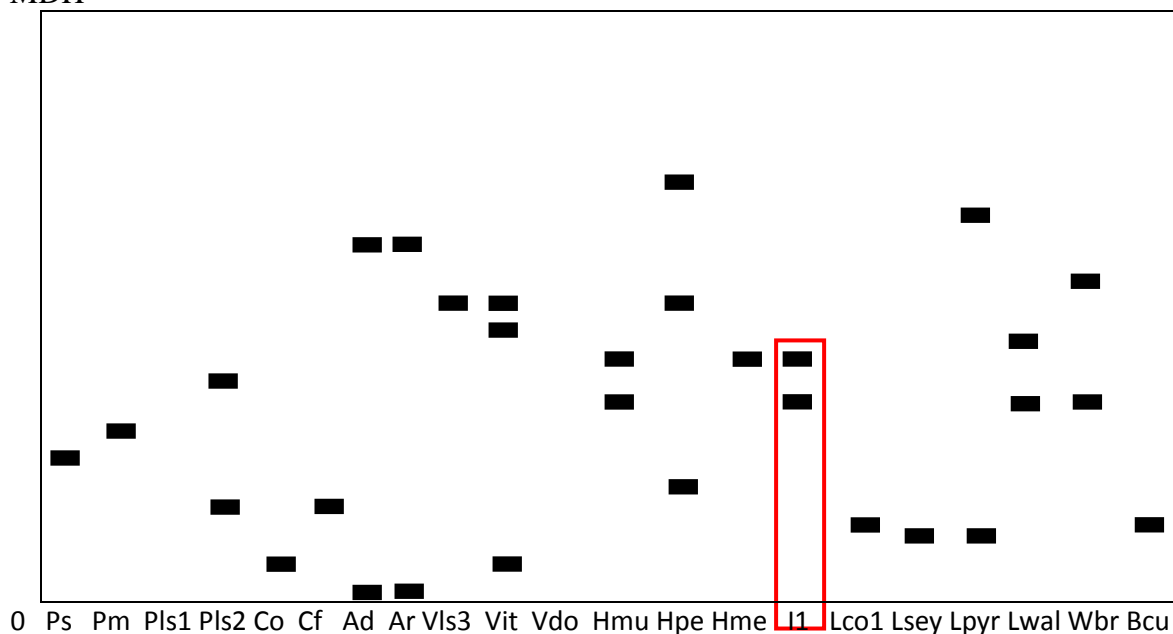


FIGURA 9: Padrão de isoenzimas de amostras de tripanosomatídeos inferiores isolados de insetos e de plantas. Diagramas representando os perfis obtidos dos sistemas: isocitrato desidrogenase (IDH) e aconitase (ACON): Ps – *Phytomonas serpens*; Pm – *Phytomonas mcgheeii*; PLS1 – *Phytomonas* cepa LS1; PLS2 – *Phytomonas* cepa LS2; Co – *Critidia oncopelti*; Cf – *Critidia fasciculata*; Ad – *Angiomonas deane*; Ar – *Angiomonas roitmani*; Vls3 – *Vickermania ls3*; Vit - *Vickermania itaguaiensis*; Vdo – *Vickermania doreliae*; Hmu – *Herptomonas muscarum*; Hpe – *Herptomonas pessoai*; Hme – *Herptomonas megaseliae*; I1 – isolado de *Megaselia scalaris*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Wbr – *Wallaceina brevicula*; Bcu – *Blastocrithidia culicis*

+ MDH



+ 6 GPDH

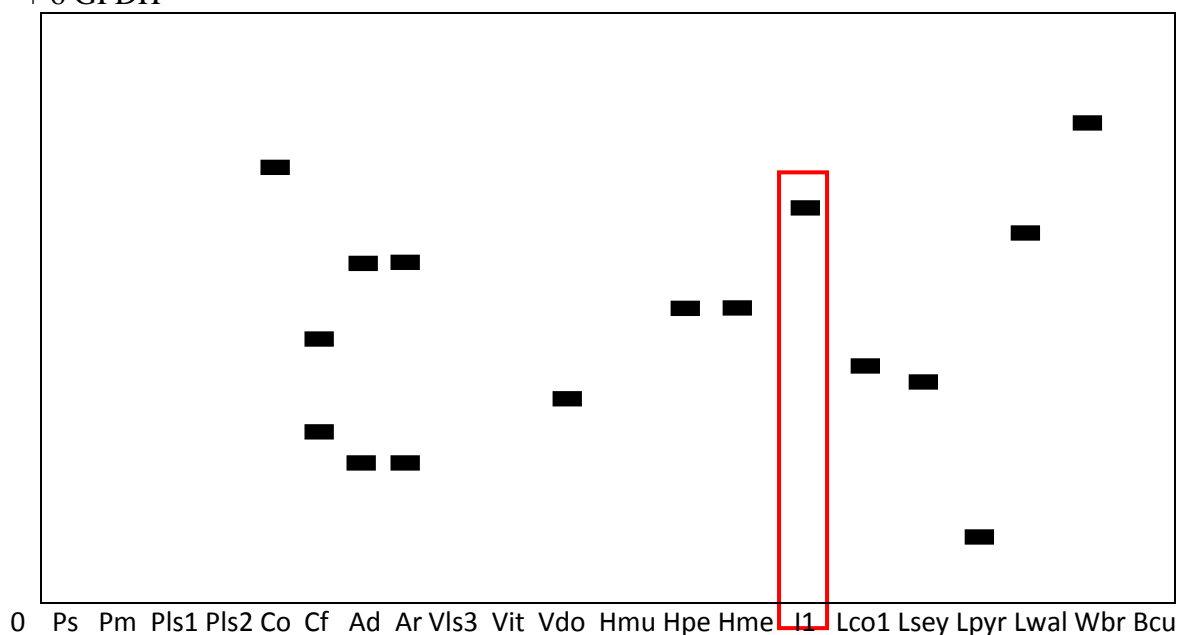
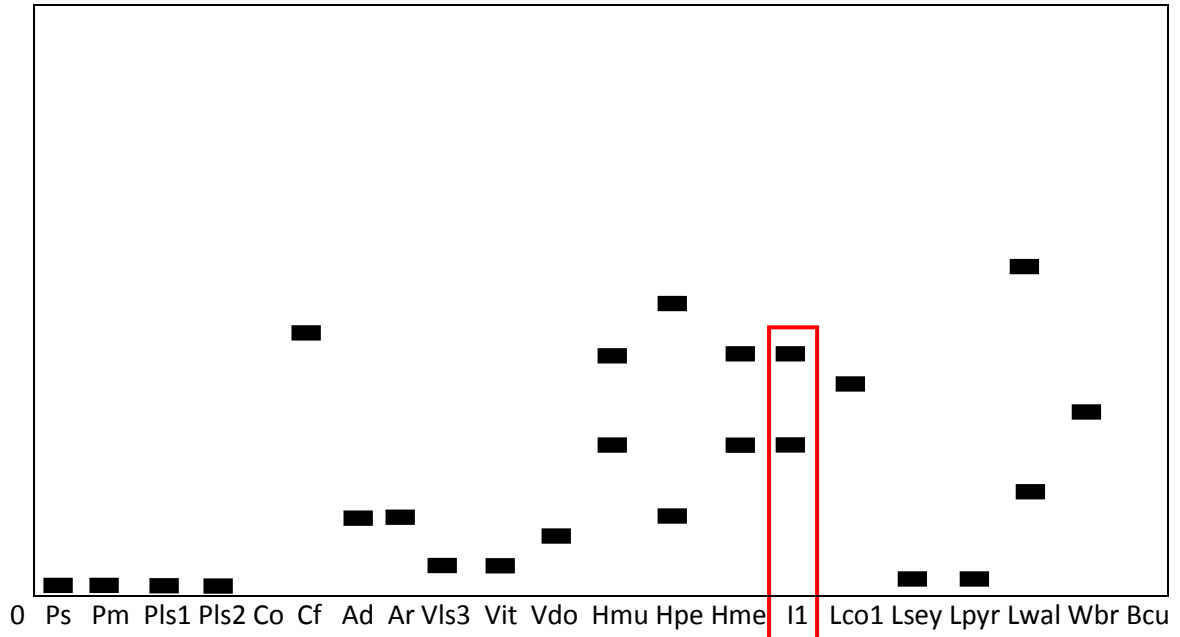


FIGURA 10: Padrão de isoenzimas de amostras de tripanosomatídeos inferiores isolados de insetos e plantas. Diagramas representando os perfis obtidos dos sistemas malato desidrogenase (MDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6GPDH): Ps – *Phytomonas serpens*; Pm – *Phytomonas mcgheeii*; PLS1 – *Phytomonas cepa LS1*; PLS2 – *Phytomonas cepa LS2*; Co – *Critidia oncopelti*; Cf – *Critidia fasciculata*; Ad – *Angiomonas deane*; Ar – *Angiomonas roitmani*; Vls3 – *Vickermania ls3*; Vit - *Vickermania itaguaiensis*; Vdo – *Vickermania doreliae*; Hmu – *Herptomonas muscarum*; Hpe – *Herptomonas pessoai*; Hme – *Herptomonas megaseliae*; I1 – isolado de *Megaselia scalaris*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Wbr – *Wallaceina brevicula*; Bcu – *Blastocrithidia culicis*

+ GPI



+ ME

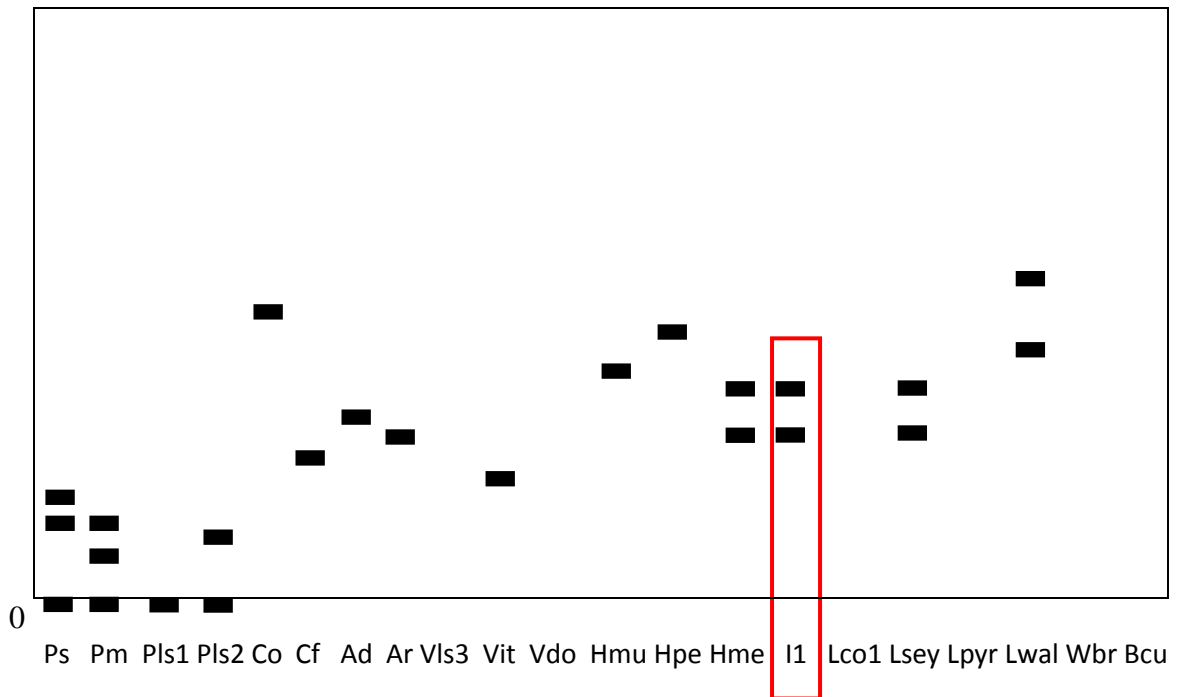
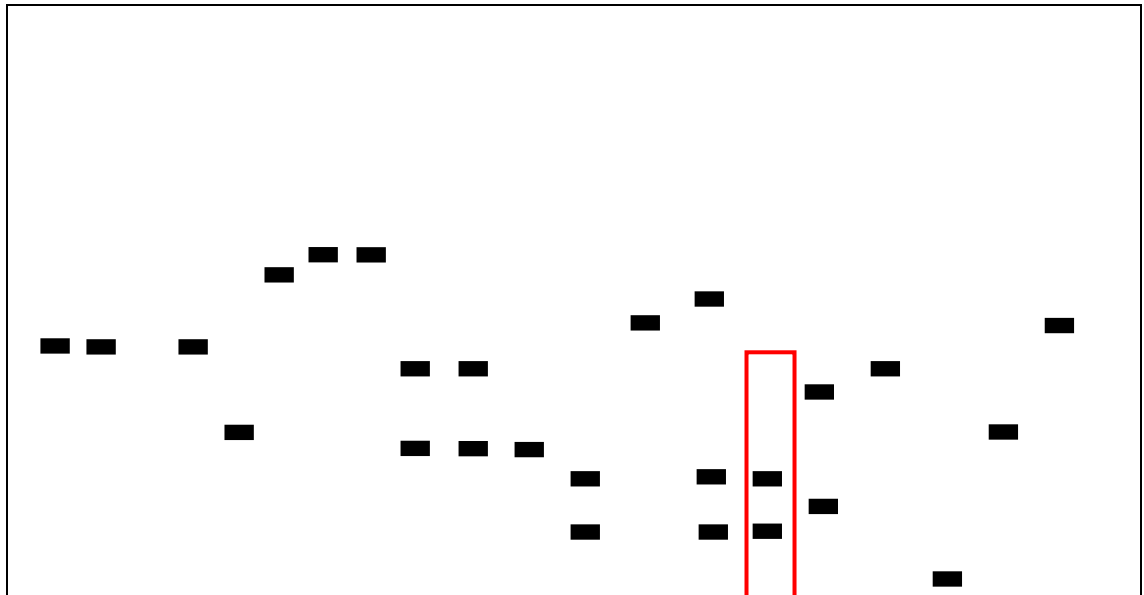


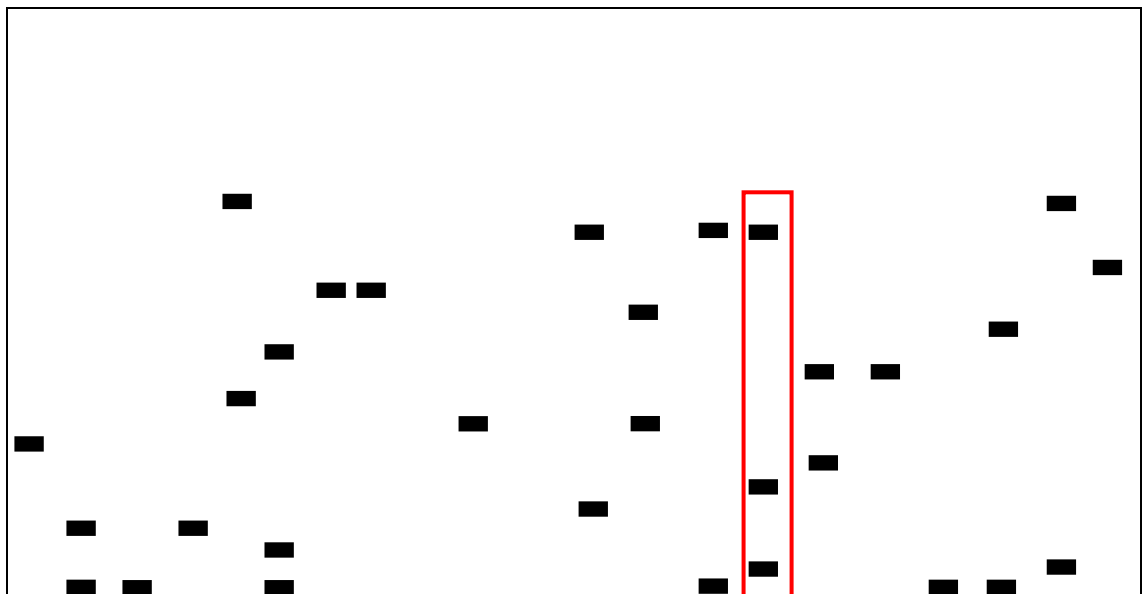
FIGURA 11: Padrão de isoenzimas de amostras de tripanosomatídeos inferiores isolados de insetos e plantas. Diagramas representando os perfis obtidos dos sistemas glicose-6-fosfatase (GPI) e enzima málica (ME): Ps – *Phytomonas serpens*; Pm – *Phytomonas mcgheei*; PLS1 – *Phytomonas* cepa LS1; PLS2 – *Phytomonas* cepa LS2; Co – *Critidia oncopelti*; Cf – *Critidia fasciculata*; Ad – *Angiomonas deane*; Ar – *Angiomonas roitmani*; Vls3 – *Vickermania ls3*; Vit - *Vickermania itaguaiensis*; Vdo – *Vickermania doreliae*; Hmu – *Herptomonas muscarum*; Hpe – *Herptomonas pessoai*; Hme – *Herptomonas megaseliae*; I1 – isolado de *Megaselia scalaris*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Wbr – *Wallaceina brevicula*; Bcu – *Blastocrithidia culicis*

+ PGM



0 Ps Pm Pls1 Pls2 Co Cf Ad Ar Vls3 Vit Vdo Hmu Hpe Hme I1 Lco1 Lsey Lpyr Lwal Wbr Bcu

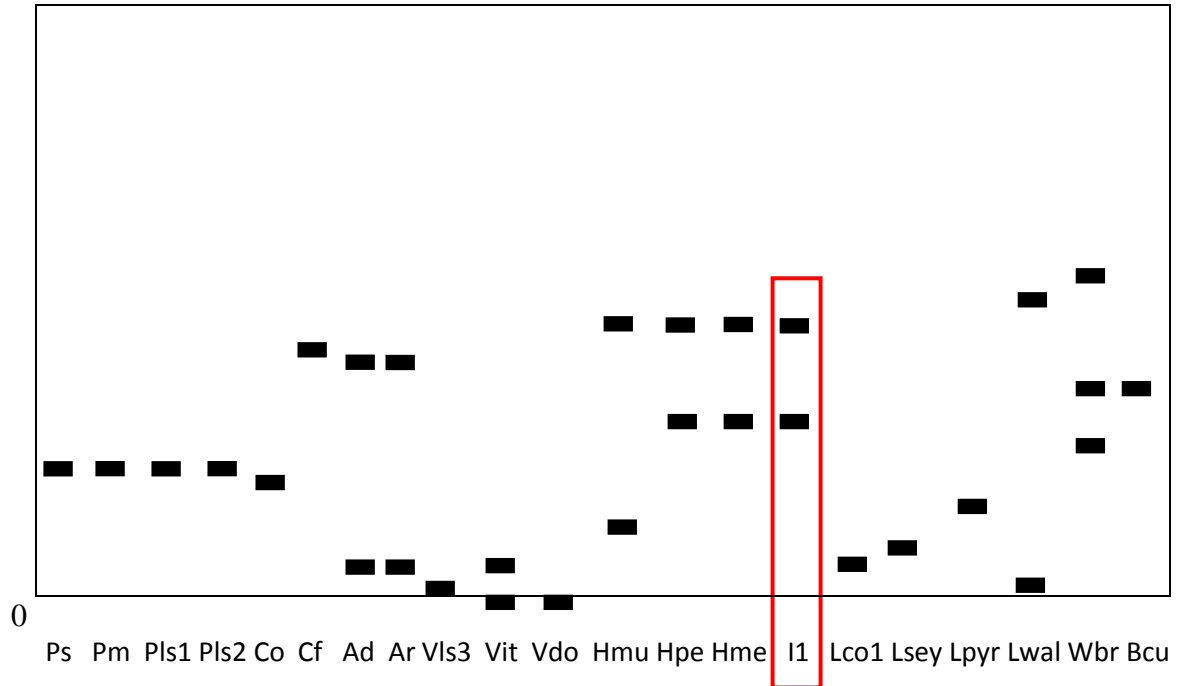
+ MPI



0 Ps Pm Pls1 Pls2 Co Cf Ad Ar Vls3 Vit Vdo Hmu Hpe Hme I1 Lco1 Lsey Lpyr Lwal Wbr Bcu

FIGURA 12: Padrão de isoenzimas de amostras de tripanosomatídeos inferiores isolados de insetos e plantas. Diagramas representando os perfis obtidos nos sistemas fosfoglucomutase (PGM) e mannose-6-phosphate isomerase (MPI): Ps – *Phytomonas serpens*; Pm – *Phytomonas mcgheeii*; PLS1 – *Phytomonas* cepa LS1; PLS2 – *Phytomonas* cepa LS2; Co – *Critidia oncopelti*; Cf – *Critidia fasciculata*; Ad – *Angiomonas deane*; Ar – *Angiomonas roitmani*; Vls3 – *Vickermania ls3*; Vit - *Vickermania itaguaiensis*; Vdo – *Vickermania doreliae*; Hmu – *Herptomonas muscarum*; Hpe – *Herptomonas pessoai*; Hme – *Herptomonas megaseliae*; I1 – isolado de *Megaselia scalaris*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Wbr – *Wallaceina brevicula*; Bcu – *Blastocrithidia culicis*

+ HK



+ FUM

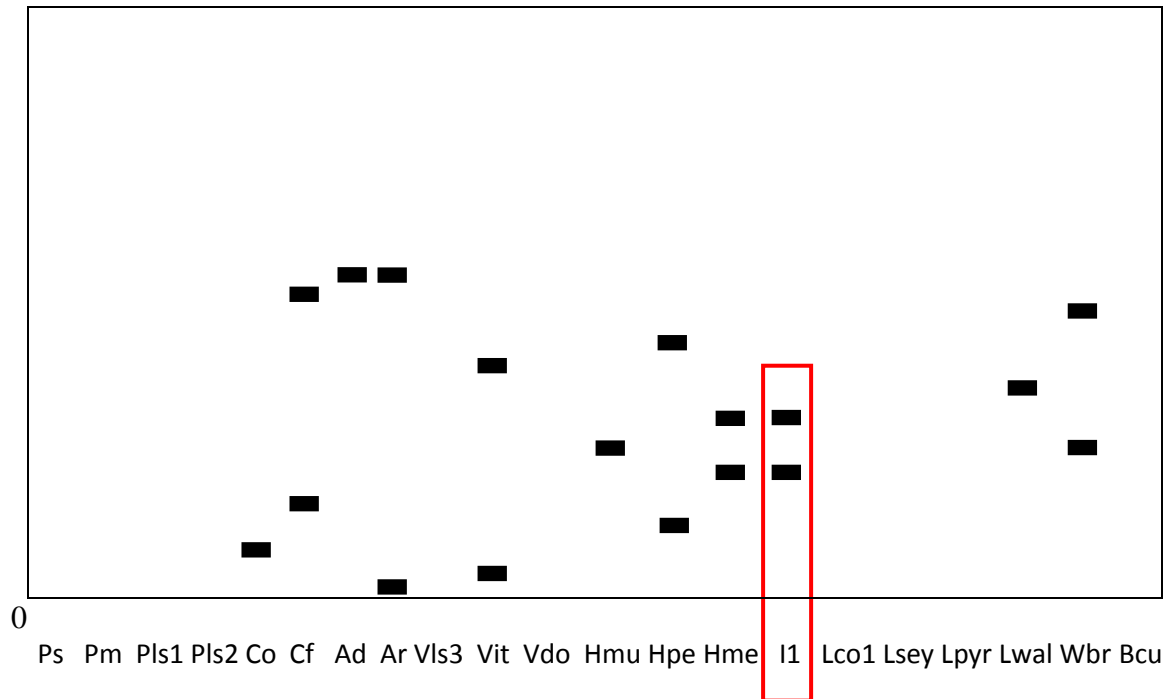


FIGURA 13: Padrão de isoenzimas de amostras de tripanosomatídeos inferiores isolados de insetos e plantas. Diagramas representando os perfis obtidos nos sistemas hexokinase (HK) e fumarase (FUM): Ps – *Phytomonas serpens*; Pm – *Phytomonas mcgheei*; PLS1 – *Phytomonas cepa LS1*; PLS2 – *Phytomonas cepa LS2*; Co – *Critidia oncopelti*; Cf – *Critidia fasciculata*; Ad – *Angiomonas deane*; Ar – *Angiomonas roitmani*; Vls3 – *Vickermania ls3*; Vit – *Vickermania itaguaiensis*; Vdo – *Vickermania doreliae*; Hmu – *Herptomonas muscarum*; Hpe – *Herptomonas pessoai*; Hme – *Herptomonas megaseliae*; I1 – isolado de *Megaselia scalaris*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Wbr – *Wallaceina brevicula*; Bcu – *Blastocrithidia culici*

6.6. Zimotaxonomia:

Com base na distribuição alélica observada nos perfis isoenzimáticos obtidos de cada espécie, foi possível construir um fenograma entre o clone do isolado do *M. scalaris* e os tripanosomatídeos de referência (GRÁFICO 2). Com base nestes resultados, observou-se a similaridade de 70% no *phenon* entre o isolado obtido de *M. scalaris* e *H. megaseliae*.

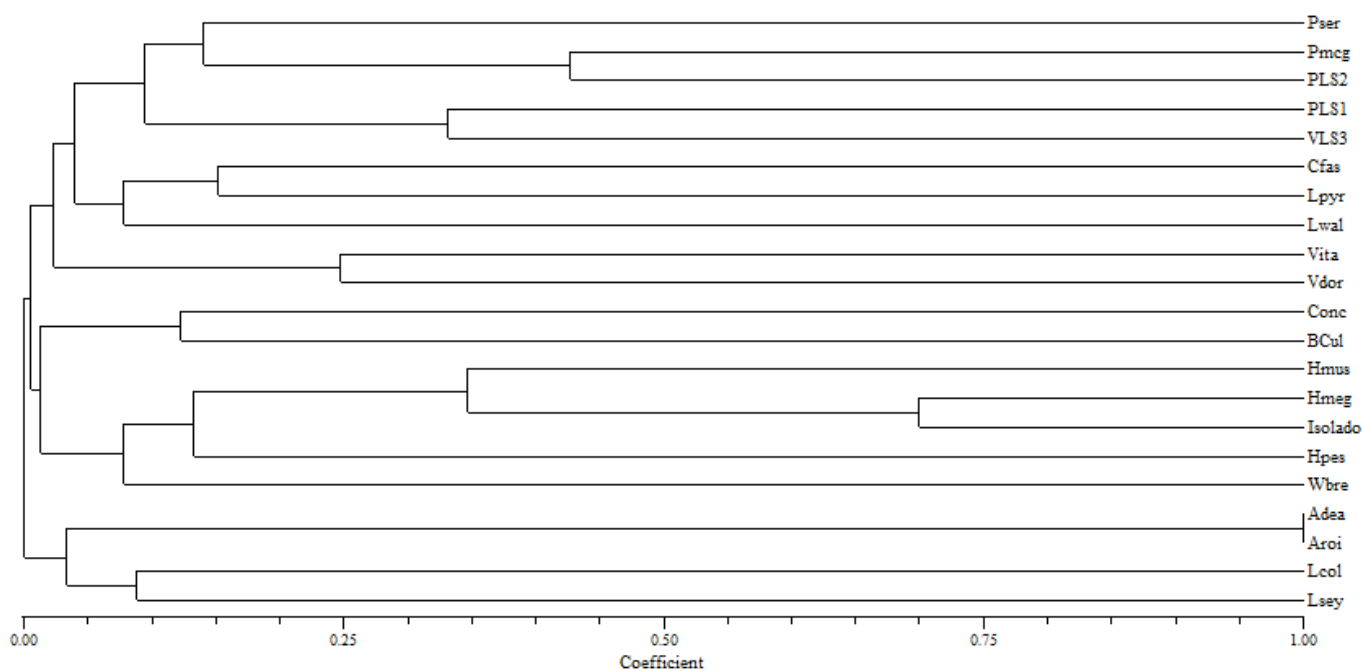


GRÁFICO 2 – Dendrograma de similaridade entre as amostras estudadas e tripanosomatídeos de referência, utilizando-se o coeficiente de associação *Jaccard* e o algoritmo de agrupamento *UPGMA*. Pser – *Phytomonas serpens*; Pmeg – *Phytomonas mcgheei*; PLS2 – *Phytomonas LS2*; PLS1 – *Phytomonas LS1*; VLS3 – *Vickermania LS3*; Cfas – *Critidia fasciculata*; Lpyr – *Leptomonas pyrochoris*; Lwal – *Leptomonas wallacei*; Vita - *Vickermania itaguaiensis*; Vdor – *Vickermania doreliae*; Conc – *Critidia oncopelti*; Bcul – *Blastocrithidia culic*; Hmus – *Herpetomonas muscarum*; Hmeg – *Herpetomonas megaseliae*; Isolado - isolado de *Megaselia scalaris* Hpes – *Herpetomonas pessoai*; Wbre – *Wallaceina brevicula* Adea – *Angiomonas deane*; Aroi – *Angiomonas roitmani*; Lco1 – *Leptomonas collosoma*; Lsey – *Leptomonas seymori*.

7. DISCUSSÃO

Os Tripanosomatídeos têm sido estudados por diversos autores principalmente por sua importância médica, veterinária e agrícola. Entre os representantes da família, destacam-se os agentes etiológicos de doenças no homem (doença de Chagas, leishmanioses, doença do sono), em animais (*e.g.* surra, mal das cadeiras) e em plantas (*hartrot*, *marchitez sorpressiva* e necrose floêmica). Além disso, parasitas descritos como exclusivos de insetos têm sido descritos ou isolados principalmente de seres humanos ou de vertebrados – são as chamadas infecções oportunistas (Sabbatani *et al* 1991, Dedet *et al* 1995, Pacheco *et al* 1998, Sousa *et al* 1998).

Segundo Maslov (2007), uma única espécie de parasito pode ser encontrada em uma diversidade de hospedeiros; entretanto, uma única espécie de hospedeiro pode ser parasitada por mais de uma espécie de tripanosomatídeo.

Neste trabalho, estudou-se o parasitismo por tripanosomatídeos em uma espécie de mosca onívora que se alimenta de plantas, feridas e cadáveres. O exemplar examinado apresentou tripanosomatídeos no trato intestinal.

As dificuldades para o isolamento de alguns gêneros de tripanosomatídeos de insetos e plantas, relatadas por diversos autores (dentre eles Harvey & Lee 1943, Peng & Wallace 1981, Romeiro *et al* 2000, Sousa 2000) também foram observadas durante a execução deste trabalho. A contaminação por bactérias e leveduras, puderam ser eliminadas utilizando-se meio de cultura diluído com antibióticos e fungistáticos ou com uso de tubos de migração em “W” (Vickerman 1990, Romeiro *et al* 2000).

A caracterização de tripanosomatídeos de insetos e plantas baseada em estudos morfológicos e biométricos pode permitir sua a classificação dentro de um gênero já proposto ou evidenciar espécies que não se encaixam em qualquer grupo já conhecido.

Entretanto, diversos equívocos foram cometidos em estudos pioneiros, decorrentes da imprecisa e às vezes discordante diagnose dos gêneros e das descrições de espécies-tipo realizadas com misturas naturais (revisões de Wallace 1966, 1979; Vickerman 1976, 1990 e 1994; Sousa 2000).

A análise de crescimento e diferenciação celular da amostra em meio LIT revelou a presença exclusiva de promastigotas (polimórficas), estas freqüentemente em processo de divisão celular. Esta descrição, é similar à relatada por diversos autores (Wallace 1966, Vickerman 1990, Yurchenko et al 2006 a e b) de uma espécie típica do gênero *Leptomonas* (*sensu* Wenyon 1926). Segundo Podlipaev 1990, e após uma extensa revisão bibliográfica recente, até então, a única espécie de tripanosomatídeo nomeada, obtida de *Megaselia scalaris*, é *Herpetomonas megaseliae* Dagget, 1972. O isolado MS apresentou características morfológicas diferentes da *Herpetomonas* isolada deste mesmo inseto; *H. megaseliae* apresenta, em meio LIT, pro-(64,4%), para- (30,5%) e opistomastigotas (1,3%) (Sousa 2000). O isolado ainda apresenta diferenças morfológicas e morfométricas significativas entre todas as espécies de *Leptomonas* estudadas por Sousa (2000), não se classificando em nenhum dos subgrupos propostos pela autora, principalmente pela ausência de células aflageladas, encontradas em todas as amostras classificadas como representantes do gênero. Morfometricamente, o isolado MS se diferencia de *H. megaseliae* principalmente pelo índice nuclear (1,7 em *H. megaseliae* e isolado MS é de 0,4). Estes resultados sugerem que o isolado MS e *H. megaseliae* tratam-se de espécies distintas, de gêneros diferentes.

Através da zimotaxonomia foi possível confirmar os resultados dos estudos morfológicos e biométricos. O dendograma de similaridade global resultante dos dados isoenzimáticos revelou 30% de dissimilaridade com a espécie *H. megaseliae*, também isolada de *M. scalaris*. Dos 10 sistemas utilizados, 8 apresentaram bandas iguais entre *H. megaseliae* e o isolado de *M. scalaris*.

Entretanto, nesta análise, foi possível observar a heterogeneidade encontrada, por diversos autores, em amostras previamente classificadas como *Leptomonas*, utilizando-se diversas abordagens (Lima et al, 1979, Camargo et al 1992, Muller et al 1994, Sousa 2000, Podlipaev et al 2004, Yurchenko et al 2006 a e b, 2008). Isto foi observado no isolado MS, que se agrupou numa mesma chave com parasitos classificados como *Herpetomonas*. Este fato pode ser parcialmente explicado, pela imprecisão na descrição original de algumas espécies consideradas de referência e pela necessidade de revisão na diagnose dos gêneros *Herpetomonas* e *Leptomonas*. A descrição atual para a inclusão de novas espécies (*sensu* Wenyon 1926), utilizada pela grande maioria de autores da atualidade, não é condizente com a descrição original proposta por Kent em 1880 (Sousa 2000). Entretanto, decidiu-se classificar o isolado MS como *Leptomonas sp.*, com base nos resultados obtidos e segundo os critérios adotados por Sousa 2000, até que uma revisão na sistemática do grupo possa ser realizada.

É possível que este clone obtido constitua uma nova espécie, pois morfológica- e isoenzimaticamente apresenta características taxonômicas (quanto à diagnose e a diversidade) típicas do gênero *Leptomonas*. Embora os tripanosomatídeos sejam estudados por diversas abordagens, pouquíssimas delas utilizaram morfologia e o potencial de crescimento e diferenciação celular em condições padronizadas. Alguns autores (Sousa 2000, Podlipaev et al 2004, Yurchenko et al 2006, Maslov et al 2007) já afirmam que existe a necessidade de uma caracterização multidisciplinar para a diagnose de um novo isolado e o conjunto de resultados obtidos irão definir a validade de uma espécie, sendo os estudos moleculares complementares a esta delimitação. Estudos moleculares podem ainda não evidenciar uma descrição apontada por abordagens fenotípicas, pois, não existe um consenso molecular de agrupamento ou segregação de espécies/gêneros em uma mesma clade (segundo Maslov et al 2007).

O presente trabalho prosseguirá com novas abordagens ultraestruturais, bioquímicas e moleculares que confirmem os resultados obtidos e forneçam novos dados sobre a espécie isolada, possibilitando a sua nomeação. Assinala-se que o presente trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a diversidade da família Trypanosomatidae.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível isolar uma amostra de tripanosomatídeo a partir do trato intestinal deste inseto.

- ✓ Este isolado foi clonado e caracterizado por abordagens parasitológicas clássicas, isoenzimas e taxonomia numérica computacional (zimotaxonomia), permitindo sua classificação como *Leptomonas* sp. (*sensu* Wenyon 1926); entretanto é necessário apurar as afinidades desta amostra com o gênero *Herpetomonas*;

- ✓ O presente trabalho ampliou o conhecimento da biodiversidade da família Trypanosomatidae.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayroza-Galvão AL & Coutinho JO 1941. Nota sobre um flagelado parasita de anofelinos do sub-gênero “Nyssorhynchus”, “Herpetomonas pessoai” *n. sp.* (Mastogophora, Trypanosomatidae). *Rev Bras Biol* 1: 311-319.
- Brandão AA, Miranda A, Degraive WM, Sousa MA 2000. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Research* 86: 809-812.
- Camargo EP 1979. *Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico*. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 158 pp.
- Camargo EP, Sbravate C, Teixeira MMG, Uliana SRB, Soares MBM, Affonso HT, Floeter-Winter L 1992. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. *J Parasitol* 78: 40-48.
- Camargo EP 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29-112.
- Carvalho ALM 1973. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Pat Trop* 2: 223-274.
- Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Huerre M 1995. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Trans R Soc Med Hyg* 89: 644-646.
- Disney R.H. 2007. Natural history of the scuttle fly, *Megaselia scalaris*. *Annu. Rev. Entomol.* 53 (doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093415)

- Furukawa, E. & K. Kaneko. 1981. Studies on Phorid flies (Phoridae, Diptera) in Japan. Part IV. Scanning electron microscopic observations of eggs of two *Megaselia*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 32: 78-81.
- Gillies C & Hanson ED 1963. A new species of *Leptomonas* parasitizing the macronucleus of *Paramecium thrichium*. *J Protozool* 10: 467-473.
- Harvey RB & Lee SB 1943. Flagellates of lactiferous plants. *Plant Physiology* 18; 633-655.
- Hoare C & Wallace FG 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212: 1385-1386.
- Kolesnikov AA, Maslov DA, Podlipaev AS 1990. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of URSS. *Arch Protistenkd* 138: 239-250.
- Koller, W.W., R. Andreotti, A.M. Zanon, A. Gomes & J.C. Barros. 2003. Mosca *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae), parasita do carrapato bovino *Boophilus microplus*
- Lainson R & Shaw JJ 1966. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. III – On the cross-immunity between Panamanian cutaneous leishmaniasis and *Leishmania mexicana* infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 533-535.
- Lima VMQG, Roitman I, Kilgour V 1979. Five trypanosomatid species of insects distinguished by isoenzymes. *J Protozool* 26 (4): 648-652.
- Maslov DA, Westenberger SJ, Xu X, Campbell DA, Sturm NR 2007. Discovery and barcoding by analysis of Spliced Leader RNA gene sequences of new isolates of trypanosomatidae from heteroptera in Costa Rica. *J Euk Microbiol* 54(1): 57-65
- McGhee RB & Hanson WL 1963. The relationship of various crithidias as determined by serological reactions. *J Protozool* 18: 80-81.
- McGhee RB & Cosgrove WB 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 44: 140-173.

- Muller E, Gargani D, Schaeffer V, Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M, Dollet M 1994. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas spp.*) associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur J P Pathol* 100: 425-434.
- Pacheco RS, Marzochi MCA, Pires MQ, Brito CMM, Madeira MF, Barbosa-Santos EGO 1998. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 531-537.
- Patton WS 1908. *Herpetomonas lygaei*. *Archiv für protistenkunde* 13: 1-17.
- Peng PLM & Wallace FG 1981. The cultivation of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola *et al* 1971. *J Protozool* 28 (1): 116-118.
- Podlipaev SA 1990. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proc Zool Inst Acad Sci (Leningrad)* 217: 1-175.
- Podlipaev SA & Lobanov AL 1996. The employing of measure characters for a discrimination of lower trypanosomatids. *Parasitologiya (St Petersburg)* 34; 169-182.
- Podlipaev SA & Naumov AD 2000. Colonies of trypanosomatids on agar plates: the tool for differentiation of the species and isolates. *Protistology* 1 (3): 113-119.
- Podlipaev S. 2001. The more insect trypanosomatids under study – the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int. J. Parasitol.* 31, 648_652.
- Podlipaev S, Sturn NR, Fiala, I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukes J 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *J Eukariot Micobiol* 51(3): 283-290.
- Rohlf 1992 The analysis of shape variation using ordinations of fitted functions. Pp. 95-112, in Sorensen, J. T. and Foottit, R. (eds.) *Ordinations in the study of morphology, evolution and systematics of insects: applications and quantitative genetic rationals*. Elsevier: Amsterdam, 418 pp

- Romeiro A, Solé-Cava A, Sousa MA, De Souza W, Attias M 2000. Ultrastructural and biochemical characterization of promastigote and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. isolated from intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J Euk Microbiol* 47 (3): 208-220.
- Sabbatani S, Calzado AI, Ferro A, Goudlaby AML, Borghi V, Zanchetta GP, Varnier OE 1991. Atypical leishmaniasis in a HIV-2-seropositive patient from Guinea-Bissau. *AIDS* 5: 899-910.
- Schaub GA 1988. Developmental time and mortality in larvae of the Reduviid bugs *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* after coprophagic infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *J Invert Pathol* 51: 23-31.
- Simpson L 1972. The kinetoplast of the hemoflagellates. *Int Rev Cytol* 82: 139-207.
- Sousa MA 1994. Trypomastigotes in cultures of *Blastocrithidia culicis* (Novy, MacNeal & Torrey, 1907) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 165-170.
- Sousa MA, Madeira MF, Cupollilo E, Santos SM, Sá-Xavier C, Soares MJ, Brazil RP 1998. Characterization of a *Herpetomonas* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Nectomys squamipes* (Mammalia: Rodentia). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl II): 101.
- Sousa MA 2000. *Tripanosomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade. Valor taxonômico.* Tese de Doutorado em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 161 pp.
- Sousa MA 2002. Apostila do curso de Biologia e taxonomia de Tripanosomatídeos, Pós-graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
- Tumrasvin, W., S. Sucharit & S. Vutikes. 1997. Studies on the life history of *Megaselia scalaris* (Loew) in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 8: 74-76.

- Vickerman K 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates, p. 1-34. *In: Biology of kinetoplastida*, vol 1, WRL Lumsden & DE Evans (eds), Academic Press, New York.
- Vickerman K & Preston TM 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates, p. 35-310. *In: Biology of kinetoplastida*, vol I, WRL Lumesden & DE Evans (eds), Academic Press, New York.
- Vickerman K 1990. Phylum Zoomastigina: Class Kinetoplastida, p 215-238. *In: Handbook of Protoctista*, L Margulis, JO Corliss, M Melkonian, D Chapman (eds), Ed. Jones & Barlett, Boston.
- Vickerman K 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-1331.
- Yurchenko VY, Lukes J, Jirku, M, Zeledón R & Maslov DA 2006a. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology* 133: 537-546.
- Yurchenko VY, Lukes J, Xu X & Maslov DA 2006b. An Integrated Morphological and Molecular Approach to a New Species Description in the Trypanosomatidae: the Case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a Parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(2): 103-11.
- Yurchenko VY, Lukes J, Tesarová M, Jirku, M & Maslov DA 2008. Morphological discordance of the new trypanosomatids species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. *Protist* 159: 99-114.
- Wallace FG 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol* 18: 124-193.
- Wallace FG 1977. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology revisited. *Protozoology* 3: 51-53.

Wallace FG 1979. Biology of the Kinetoplastida of arthropods, p 213-240. *In*: WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the kinetoplastida*, vol 2, Academic Press, London.

Wenyon CM 1926. *Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists*, vol 1, p. 155-468, Baillière, Tindall & Cox, London.

10. ANEXOS

10.1. Meio N.N.N. (Novy, McNeal & Nicolle, 1908):

Agar (Bacto Agar, Difco 0140)	3,0 g
NaCl	1,5 g
H₂O destilada (q.s.p.).....	200 ml

Os componentes foram adicionados em um balão volumétrico de 500 cm³ e autoclavados a 120°C por 20 min. Após o resfriamento desta base a 40-60°C, foram adicionados 20 ml de sangue de carneiro desfibrinado estéril e imediatamente distribuído em tubos de ensaio (4 ml em cada tubo).

10.2. Meio Agar BHI (*Brain Heart Infusion* - Wallace & Dyer, 1960):

Agar (Bacto Agar, Difco 0140)	3,6 g
<i>Brain Heart Infusion</i> (Difco 0037).....	7,4 g
H₂O destilada q.s.p.	200 ml

As condições de preparação, autoclavação e distribuição foram semelhantes às utilizadas no meio N.N.N.

10.3. Meio LIT de Yeager (LIT Básico - *Liver Infusion Tryptose* - fórmula de Camargo 1979, ligeiramente modificada):

<i>Liver infusion</i> (Difco 0269).....	5,0 g
Tryptose (Difco 0124)	5,0 g
NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na₂HPO₄.7H₂O	8,0 g
Glicose (D+) (anidra)	2,0 g
Hemina (0,01 g/ml em NaOH 1N)	1,0 ml
Penicilina G potássica	200 U/ml
Soro Fetal Bovino (65-68°C, 1h)	100 ml
H₂O destilada q.s.p.....	1000 ml

Utilizou-se HCL 1N ou NaOH 1N para o ajuste do pH a 7,2; posteriormente, o meio foi esterilizado por filtração em um conjunto de pré-filtros e membranas.

O meio LIT, em algumas ocasiões, foi suplementado com mais 10% de SFB (LIT 20% SFB), objetivando otimizar as condições de cultivo de algumas espécies. Durante as tentativas de isolamento, o meio LIT básico foi diluído em SSAF (1:1), reduzindo a oferta de nutrientes para fungos e bactérias (que se multiplicam mais rapidamente) e aumentando a concentração de antibióticos e fungistáticos; entretanto, estas condições são suficientes para manutenção temporária de espécies de tripanosomatídeos “inferiores” com considerável potencial de multiplicação *in vitro* até o isolamento.

10.4. Meio FYTS modificado (FYTSM) (*Folic Acid, Yeast Extract, Trypticase, Sucrose* - meio complexo de Roitman - fórmula de Roitman *et al* 1972, modificada):

<i>Yeast extract (Difco 0127)</i>	5,0 g
<i>Trypticase (ou Tryptose Difco 0124)</i>	5,0 g
Sacarose	20,0 g
Ácido Fólico	0,02 g
Hemina (0,01 g/ml em NaOH 1N)	1,0 g
H₂O q.s.p.	1000 ml
Soro fetal bovino inativado	150 ml
Penicilina G potássica	20.000 UI

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N ou HCl 1N. Após esterilização do meio por autoclavação (120°C, 20 min) adicionou-se o SFB estéril inativado (56°C, 30 min) e penicilina G potássica estéril (filtro Millipore® 0,22 µm).

10.5. Meio BHI (*Brain Heart Infusion* - Wallace & Dyer, 1960):

<i>Brain Heart Infusion (Difco 0037)</i>	7,4 g
Soro fetal bovino inativado	80 ml
H₂O	200 ml

As condições de preparação e autoclavação foram semelhantes às utilizadas no meio FYTSM.