

T. hastatus — TRIPANOSOMA DE MORCEGOS *Phyllostomus hastatus hastatus*. ESTUDO SOBRE FATORES QUE CONDICIONAM "IN VITRO" MODIFICAÇÃO DA SUA FORMA*

William Barbosa **Ana Cândido Czerewuta ***Osvaldira Seabra de Oliveira ***
Raquel Lopes de Oliveira ****e Fátima M. Machado *****

RESUMO

Relatamos o sucesso de cultivos de *T. hastatus* em meios 199, LIT, RPMI e RQ associados ao soro fetal bovino (SFB) 10 a 30%, soro de galinha (SG) 10 e 20%, soro de pato (SP) a 20% e/ou extrato de *Triatoma infestans* a 10% além dos antibióticos: Cloridrato de Tetraciclina e Amoxicilina.

Estas culturas foram inoculadas a 26±6° C (temperatura ambiente), a 26, 28, 32, 34, 35 ou 37° C.

O *T. hastatus* cresceu bem em todos os meios, com elevados índices de crescimento, quando associado com qualquer dos "estimuladores" usados.

Os meios proporcionaram variável grau de morfogênese de 20 a 100%, com cerca de 60% de formas tripomastigotas ou 100% de amastigotas. Parecendo haver uma correlação entre o grau de temperatura de incubação e a intensidade de morfogênese apresentada.

Os fatores existentes nos "estimuladores" usados, aparentemente, induzem, de início, ao aparecimento de uma determinada forma - tripomastigota ou amastigota, mas evolutivamente após a curva estacionária de crescimento; há sempre um número elevado de amastigotas.

Aparentemente, o Soro de Pato, o Extrato de triatomíneos e o Cloridrato de tetraciclina (0,96mg/ml), induzem à formação de tripomastigota enquanto o soro de galinha induz à produção de amastigotas.

Todas as formas de evolução retornam a epimastigotas quando reincubados a 26° C no meio de origem.

UNITERMOS: *Trypanosoma hastatus*, morfogênese. Fatores metaciclôgenicos.

*Trabalho realizado no Depto. de Medicina Tropical, Unidade de Investigação Gaspar Viana, IPTESP da UFG.

**Professor Titular - DMT - Unidade de Investigação Gaspar Viana, IPTESP da UFG.

***Professoras Assistentes - DMT - Unidade de Investigação Gaspar Viana, IPTESP da UFG.

****Técnica de Laboratório - DMT - Unidade de Investigação Gaspar Viana, IPTESP da UFG.

***** Estudante, Bolsista.

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma* "tipo cruzi" do morcego *Phyllostomus hastatus hastatus*, aparentemente, só parasita quirópteros, condicionando quase sempre, no sangue periférico, baixa parasitemia (3, 19, 20, 36), sendo o encontro da forma tissular amastigota, ocorrente nos pulmões, intestinos e outros órgãos, sido descrita ocasionalmente (10, 21); a infecção de outros animais de laboratório como camundongos, não tem sido observada, senão em raríssimas ocasiões (19). O parasita cresce facilmente em meios de cultura relativamente simples, tanto quanto nos mais "complexos", onde se observa 99% de epimastigotas. Os triatomíneos também se infectam por xeno artificial sendo então observadas as formas evolutivas nos barbeiros (3, 19).

Em função destes aspectos especiais; eletividade para o animal receptivo (morcego), que se infecta com baixa parasitemia, raríssimos ninhos de amastigotas no tecido, se conhece, mal por inteiro, as formas evolutivas, principalmente, a tripomastigota de cultura e a forma amastigota e também não se dispõe destas formas como fonte de antígeno ou elemento de comparação para com o *T. cruzi*.

Neste trabalho, através do emprego de meios de culturas adequadamente enriquecidos e sob condições de temperatura ótimas, mais elevadas, estudamos alguns fatores condicionantes da transformação das formas flageladas em amastigotas e da metaciclógênese deste trypanosoma. Estudamos também a capacidade do uso das diversas formas como antígeno particulado nas reações de IFI para doença de chagas — capacidade infectante das formas epimastigotas, amastigota e prin-

cipalmente tripomastigota para camundongos; bem como a capacidade de penetração em macrófagos peritoneal de camundongos das formas epimastigotas, tripomastigota e amastigotas.

Os resultados serão referidos em três comunicações separadas; a primeira sobre as variações morfológicas em função da temperatura e condições do meio, o presente trabalho; a segunda, sobre a capacidade do uso das formas amastigota e epimastigota na RIFI (45), sua comparação com as mesmas formas de *T. cruzi* e a terceira e última, sobre o comportamento das várias formas do *T. hastatus* sobre macrófagos de peritônio de camundongos, e a tentativa de infecção de camundongos (17).

O *T. cruzi* tem sido motivo de extensas pesquisas sobre a sua morfogênese, em função do interesse de se desenvolver um método simples para obtenção de formas puras metacíclicas e mesmo amastigota, que seriam usadas no estudo das características estágio-específica; produção de antígenos, aplicação na imunologia, com produção de anticorpos monoclonais, visando aspecto taxonômico, e também no estudo de aspectos nutricionais e bioquímicos que influenciam a sua morfogênese (4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 22, 26, 27, 28, 31). Conquanto relativamente numerosos, estes trabalhos, ainda não permitiram conhecer o mecanismo íntimo das modificações de formas do parasita. A maioria dos trabalhos existentes tem empregado meios semi-definidos ou complexos, o que dificulta ou impede mesmo certas aplicações.

Como se sabe o *T. cruzi* tem sido cultivado em meios livres de células por muitos anos, à temperatura de 24 a 27°C, onde se mantém por repiques sucessivos,

com proporções de epimastigotas predominando, em torno de 96 a 99%, formas amastigotas tem sido relatadas, ocasionalmente, em culturas velhas, sejam isoladamente, sejam em formas agrupadas, desde Chagas (1909) e formas tripomastigotas ocorrem na fase estacionária de crescimento, habitualmente, sob condições normais, em pequena e variável proporção (6, 12, 35). Isto ocorre quando, presumivelmente, condições de crescimento tornam-se desfavoráveis o que pode ser devido à redução de glicose, concentração e acúmulo de ácidos orgânicos (27); várias manipulações das condições de cultura — como variação do pH, consumo de metabólitos, modificação da temperatura (46, 47); ou enriquecimento do meio com fatores que estimulam de per si a metaciclógênese; Muniz e Freitas (1946), descreveram a realização "in vitro" do ciclo do *T. cruzi* no vertebrado, usando meios de caldo líquido peritoneal (39). Pick, (1957) descreveu um novo meio com sangue permitindo a diferenciação de formas do sangue e metacíclicas para a forma do tripomastigota (49). Wood e Pipkin (1969) foram os primeiros a cultivar epimastigotas em meios de cultura para células de inseto, que eles suplementaram com soro Fetal Bovino (SFB) e hemolinfa de *Phyllosomia Cynthia* obtendo grande diferenciação (59); Wood e Souza (1976) verificaram, excelente crescimento 8,3x 10⁷ tripomastigota/ml em meio constituído de meio de cultura para células de inseto (60), o meio Grace, associado ao SFB e Extrato de *Rhodinus prolixus*. (As formas metacíclicas não se desenvolviam se o extrato de *Rhodinus* fosse excluído do meio).

O'Daly (1975) descreve um meio parcialmente definido, (SM) contendo 5%

de SFB que promove o desenvolvimento de até 90% de formas metacíclicas durante a fase estacionária (42). Pudney e Lamar estabelecem uma linhagem de células de *Triatoma infestans*, em um meio composto do meio LEIBOVITZ — L 15, triptose, glutamina e SFB. (ML15). Estas células suportam o crescimento contínuo da forma tripomastigota do *T. cruzi*, aproximadamente 1x10⁷ tripomastigota/ml, Lamar (1979); quando a forma de tripomastigota do sangue é inoculada nestas culturas de células elas se diferenciam em formas amastigota "like" e subsequentemente, em epimastigotas metacíclicas (34, 51).

Dusanic (1980), mostrou que ligeiras modificações e combinações dos componentes do meio ML-15 e do meio SM de O'Daly mais Soro Fetal Bovino (SFB), permite o cultivo axênico do *T. cruzi* e facilita a evolução para o estágio metacíclico (22).

Isola e cols. (1981) usaram o meio de Grace; o Grade modificado, verificando que quando acrescido de homogenato de estômago, intestino, testículos e ovários de *T. infestans* recém-alimentados, os epimastigotas crescem adequadamente. Similar resultado ocorre em suplementação idêntica de extrato de barbeiros sem se alimentar, contendo mais extrato de intestino. Nenhum deles produz metaciclógênese; o que ocorria quando o meio de Grade era enriquecido com extrato de intestino, ou de estômago de barbeiro alimentado 24 a 48 horas antes em galinha (31).

Sullivan em 1982, refere-se a observações próprias, em que o meio de Grace, acrescido de SFB a 10%, a 26°C, em 7 dias permite o crescimento de 6,0x10⁶, com um índice de transformação em tri-

pomastigota 75% de cepa Y mantida em meio de Offut (1946) (54).

Ávila & cols. (1979), obtiveram pela primeira vez um meio sintético simplificado em que *T. cruzi* virulentos para o hospede pôde ser cultivado com elevado índice de crescimento. Este meio se constitui de somente D-glucose, sais inorgânicos, nucleotídeos, vitaminas e catalase de fígado bovino (S.F.B.) que provê todos os heme e amianoácidos, requeridos para multiplicação ativa. Permitiu o crescimento de inóculos tão baixos quanto 400 cls/ml (0, 0004x10⁶ epi/ml). Cinco cepas de *T. cruzi* cresceram satisfatoriamente no meio. Análises morfológicas revelaram 95% de epimastigotas com 5% de tripomastigota, na fase estacionária do crescimento.

O papel nutricional da catalase (SFB) para o *T. cruzi*, dentre as possíveis explicações teria a ação estimuladora sobre a pinocitose e papel transportadora de hemina. O que o estudo histoquímico a nível de ultraestrutura confirmou, revelando hemoproteínas localizadas dentro de organelas da membrana (1).

Ao contrário do *T. cruzi*, em que se dispõe de todas estas informações, para o *T. hastatus* nada existe e, praticamente, se conhece bem apenas as formas epimastigotas de cultivo, porquanto as formas sanguícolas no quiróptero, são escassas e não permitem comparações estatisticamente, significativas. Neste trabalho pretendemos mais que nada constatar a possibilidade de se dispor das formas amastigotas (ou amastigota "like" e tripomastigota do *T. hastatus* para os estudos imunológicas e outros anteriormente citados para o *T. cruzi*, e mais do que isto fazer testes da potencialidade infectante para animais de laboratório).

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas *T. hastatus hastatus*:

Foram usadas cepas de *Trypanosoma hastatus hastatus* mantidas em nosso laboratório em meio LIT com repiques quinzenais à temperatura média de 26-28°C.

Meios de cultura empregados no experimento e temperatura:

Usamos os meios monofásicos constituídos de RPMI-1640 (Gibco), com L-Glutamina sem Bicarbonato de sódio e antibióticos associados, 20% de soro de galinha; 20% de soro de pato, 10, 20 ou 30% de soro fetal bovino e/ou 10% de extrato de barbeiro, (líquido obtido por liqüidificação em liqüidificadores domésticos com 10 ninfas de 4o. estágio em 100ml de soro-fisiológico); empregamos também o meio RQ, meio LIT e o meio 199 enriquecidos com soros de galinha, pato, fetal de boi, extrato de triatomíneos. As temperaturas em que realizamos os experimentos variaram desde a temperatura ambiente 20±8°C, à época dos trabalhos, até 37°C, indo de 26 a 35°C habitualmente.

A maior parte do trabalho foi realizado com os meios LIT RPMI e 199+SFB por serem os mais conhecidos. Usamos também deliberadamente antibióticos no curso do experimento, não com a pretensão de evitar contaminações, porém com a finalidade de observar sua atividade sobre o metabolismo do parasita, como a Amoxicilina e o Cloridrato de tetraciclina.

Experimento A:

Estudo evolutivo do *T. hastatus* em meio 199+ soro fetal bovino a 30% e

extrato de barbeiro a 10% (1 parte do extrato de barbeiro + 2 partes de meio 199+SFB). Em 5 ml deste meio fizemos um inóculo de 0,2ml com aproximadamente 2x10⁵ epimastigota mantidos no meio LIT por 15 dias. Os experimentos foram sempre realizados em triplicata.

Os cultivos foram examinados durante 20 dias úteis consecutivos (período aproximadamente de 24 horas), diluídos e contados entre lâmina e lamínula e corados pelo Giensa, para estudo de sua morfologia e ocasionalmente contagem. Fazia-se a anotação da contagem absoluta e específica e reinoculava-se em meio RPMI periodicamente. Este experimento foi realizado a 28° e 34°C.

Experimento B:

O segundo experimento constou da observação até 27 dias, periodicamente com intervalos de 24, 48 e 72 horas até o 15o. dia e uma revisão no 27o. dia do comportamento do *T. hastatus* em meio 199 associado ao Extrato de barbeiro a 10%, de um inóculo de 0,2ml de 4x10⁵, crescido a 34°C em meio 199+SFB a 10%. Se observou por contagem específica e absoluta o desenvolvimento dos parasitas.

Foi feita revisão da cultura no 27o. dia, quando se repicou para o LIT a 28°C e para o mesmo meio (2a. passagem) o meio 199+Extrato de barbeiro a 10% a 28°C; durante o crescimento deste inóculo elevou-se a temperatura para 34°C, no 22o. dia e se manteve observação até 35 dias.

Experimento C:

Estudo evolutivo do *T. hastatus* em meio 199 associado a SFB 30%, inóculo de 0,2ml, com aproximadamente 5x10⁵ formas epimastigotas em 5 ml de meio.

As culturas foram realizadas concomitantemente às temperaturas: ambiente (20±8°C), 26, 28, 32, 34, 35 e 37°C, provinham de cultivo em LIT por 15 dias a 26±2°C, foram observados por 124 dias de 27.01. a 28.05., com intervalos de 48 horas até o 43o. dia, quando começou a perder sua vitalidade às temperaturas mais elevadas; posteriormente as culturas foram reexaminadas com 114 e 124 dias.

Experimento D:

Neste experimento verificamos as transformações das formas de *T. hastatus*, crescido em LIT e mantidos neste meio até o 20o. dia, com aumento progressivo da temperatura que ao final, manteve-se a 35°C, tendo alcançado o crescimento de 2x10⁶. Um inóculo de 0,2 ml foi feito respectivamente para o meio no meio LIT acrescido de soro de pato a 20%, ou 0,16 mg/ml de cloridrato de tetraciclina, ou 0,96mg/ml de cloridrato de tetraciclina. As formas presentes nestes três cultivos, foram verificadas, contando-se 1000 formas de suas amostras, no 5o., 8o., 15o., e 20. dias. Do cultivo do 8o. dia repicamos 0,2ml para o meio RQ acrescidos nas mesmas proporções, de soro de pato ou cloridrato de tetraciclina.

Experimentos suplementares:

Além daqueles experimentos de A e D em que usamos os meios bem conhecidos, alguns experimentos foram realizados com soros de aves e antibióticos que merecem referência, com associação de antibióticos ou para comparar com cepa bem conhecida de *T. cruzi*.

Experimento suplementar n. 1:

No experimento suplementar n. 1 fez-se estudo comparativo da capacidade

de transformação de epimastigota do *T. hastatus* crescidos em LIT em sua fase de estabilidade, quando transferido para RPMI acrescido de 20% de soros: a) soro de galinha, b) soro de pato, c) soro fetal bovino e d) extrato de triatomíneo, em amastigota e tripomastigota à temperatura de 35°C.

Experimento suplementar n. 2:

Verificação da capacidade do epimastigota do *T. hastatus* se transformar amastigota ou tripomastigota, quando repicado do LIT a 24°C, para o meio RQ enriquecido em 10 ou 20% de soro de galinha ou com 20% de soro de pato, observação do 1o. ao 5o. dia, no 10o. e 30o. dias.

Experimento suplementar n. 3:

Verificação da capacidade de antibióticos interferirem no metabolismo do *T. hastatus*, modificando a sua forma "in vitro", influenciando na sua metaciclo-gênese.

O primeiro antibiótico testado foi cloridrato de tetraciclina, usado na primeira vez em dosagem não conhecida, mas certamente, elevada, logo depois os experimentos foram realizados com o antibiótico nas dosagens de 0,16 a 0,96mg/ml.

A Amoxicilina também foi usada em dose de 2,5 mg/ml, associada ao meio LIT ou ao meio RQ.

Experimento Suplementar n. 4:

Metaciclo-gênese do *T. cruzi* em função da presença de antibióticos no meio, em doses elevadas. Foi usada a cepa Y patogênica, mantida em nosso laboratório em LIT a 26^o± 2^oC., com repiques quinzenais; postos a crescer em meio RQ, a-

crescido de Amoxicilina 2,5mg/ml e em RQ associado a Cloridrato de tetraciclina 0,96mg/ml e em RQ associado a Cloridrato de tetraciclina 0,96mg/ml a temperatura de 35°C. O cultivo foi estudado no 5o. dia.

RESULTADOS

Experimento A:

Crescimento e morfogênese do *T. hastatus* em meio 199+SFB 30% e Extrato de barbeiro 10% (2/1). Os resultados deste experimento encontram-se sumarizados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2.

Eles demonstram que o *T. hastatus* se multiplica bem no meio, alcançando seu máximo crescimento ao nível do 13o. dia, fase estacionária em que alcança 7x10⁵ parasitas por ml. A 28°C, a partir do 6o. dia aparecem tripomastigotas que aumentam lentamente indo atingir 40% no final do experimento, concomitantemente, se observa evolução do epimastigota para amastigota que evolue lentamente, alcançando 17% aos 21 dias. A 34°C o crescimento como um todo é um pouco mais rápido e já no 6o. dia alcança o índice 7x10⁵ e uma transformação de 34 epimastigota para tripomastigota e já neste momento as amastigotas se diferenciaram na ordem de 21% e ao final do experimento ela representou 92% das formas observadas na cultura com 58 e 34% respectivamente de formas amastigotas ou esferomastigotas.

Experimento B:

Estudo da morfogênese e evolução do *T. hastatus* em meio 199 acrescido de extrato de *Triatoma infestans* a 10%, a 34°C. Mostrou que o *T. hastatus* cresce bem no meio, alcançando seu máximo de

TABELA 1: Estudo evolutivo do *T. hastatus* em meio 199 + SFB a 30% e Extrato de Barbeiro a 10% (1 parte de extrato de barbeiro para 2 partes de 199 + SFB). Inóculo de 0,2ml de *T. hastatus* $2,6 \times 10^5$ formas (15 dias em LIT). Inóculo em 21.09.79.

TEMPERATURA		28°C				34°C			
EXAME		CRESCIMENTO ($\times 10^5$)	DISTRIBUIÇÃO DO TIPO MORFOLÓGICO %			CRESCIMENTO ($\times 10^5$)	DISTRIBUIÇÃO DO TIPO MORFOLÓGICO %		
Nº	DIA		TRIPOMAST.*	EPIMAST.	AMAST.*		TRIPOMAST.*	EPIMAST.	AMAST.*
1º	3º	4,2	-	100	-	5,4	-	100	-
2º	4º	4,4	-	100	-	5,6	-	100	-
3º	5º	4,7	-	100	-	5,9	6	94	-
4º	6º	5,5	5	95	-	6,8	7	90	3
5º	7º	5,8	7	90	3	6,9	9	86	5
6º	10º	6,0	9	86	5	6,9	10	82	8
7º	11º	6,1	10	83	7	7,0	13	76	11
8º	13º	6,9	13	79	8	7,0	18	69	13
9º	14º	6,9	17	73	10	7,0	25	58	17
10º	15º	6,9	23	65	12	7,1	34	45	21
11º	16º	6,9	27	60	13	7,2	38	38	24
12º	17º	7,0	31	54	15	7,2	45	28	27
13º	19º	7,1	34	50	16	7,3	48	23	29
14º	20º	7,1	36	47	17	7,3	54	16	30
15º	21º	7,1	40	43	17	7,3	58	8	34

* = Repiques feitos até o 20º dia, mostraram sempre diferenciação para epimastigota, das formas amastigotas ou tripomastigotas obtidas.

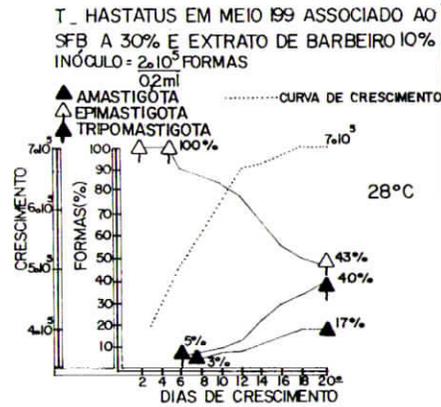


Fig. 1 - Experimento A

crescimento, ao nível do 10o. dia quando alcançou $2,1 \times 10^6$ formas por ml e que se diferencia intensamente apresentando, números relativamente normais de tripomastigota 8% no 12o. dia, mas 98% de amastigota e esferomastigota no 15o. dia de evolução. Além do mais foi verificado que os repiques desta cultura realizado 12 dias depois quando se observou 62% de amastigotas e 38% de esferomastigotas em meio LIT a 28°C, retornou rapidamente a epimastigota, mas quando à esta temperatura 28°C se reinoculou no mesmo meio 199 + extrato de barbeiro a 10%; os reexames de culturas até o 40. dia, mostraram quase só formas amastigotas, com alguns epimastigotas no 1o. e 2o. dias; 12 dias depois a cultura continha só epimastigota; 3 dias depois quando apresentava grande quantidade de epimastigota e alguns amastigotas, foi incubada a 34°C, todas as formas tornaram-se amastigotas em duas verificações subsequentes, 3 dias após a 3a. passagem no meio desenvolveu curva idêntica à da 2a. passagem, isto é a diferenciação direta epimastigota-amastigota-amastigota-epi-

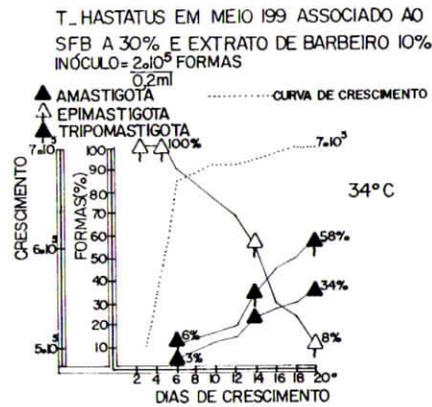


Fig. 2 - Experimento A

mastigota-amastigota. Estes dados encontram-se resumidos na Tabela 2 e Figuras 3 e 4.

Experimento C:

O *T. hastatus* crescido em meio 199 + soro fetal bovino (SFB) 30% em diversas temperaturas demonstrou crescimento bom alcançando seu máximo de crescimento a 26°C por volta do 15o. dia logo após o início da curva estacionária; e quanto às modificações de formas, no meio desta fase, observou-se às temperaturas mais baixas, até 28°C cerca de 10% de tripomastigota, e às temperaturas mais elevadas de 32º a 37°C cerca de 35% de tripomastigota; o que só seria alcançado às temperaturas mais baixas ao final do experimento, 60 dias depois, quando à temperatura mais elevada já se obtem por volta de 60% de tripomastigota, quando não, só amastigotas.

Estes dados acham-se resumidos na Tabela 3, Figuras 5, 6, 7 e 8.

Experimento D:

Diferenciação da morfogênese do *T. hastatus* em função da complementação

TABELA 2: Evolução e morfogênese do *T. hastatus* inóculo de 0,2ml provindo do meio 199 + SFB a 10% (a 34°C) com 4×10^5 formas em meio 199 + extrato de barbeiro a 10%.

TEMPERATURA 34°C	MEIO	199 + EXTRATO DE BARBEIRO 10%			
FORMAS	CRESCIMENTO (x 10 ⁵)	TRIPOMAST.	AMAST.	EPIMAST.	ESFER.%
29	5,6	-	-	100	-
39	6,4	-	-	100	-
59	8,9	-	-	100	-
69	12	-	6	94	-
79	16	-	7	93	-
89	17	5	9	86	-
99	19	5	10	85	-
109	21	6	19	75	-
129	23	8	27	65	-
159	25	-	58	2	40
279	21	-	62	-	38
TEMPERATURA 28°C - 2ª PASSAGEM					
279	-	-	62	-	38
309	-	-	100	-	-
349	-	-	93	7	-
469	-	-	-	100	-
TEMPERATURA 34°C - 2ª PASSAGEM					
499	-	-	-	-	-
539	-	-	95	5	-
579	-	-	100	-	-
629	-	-	100	-	-
TEMPERATURA 28°C - 3ª PASSAGEM					
659	-	-	-	-	-

Evoluiu da mesma forma que a 2ª passagem

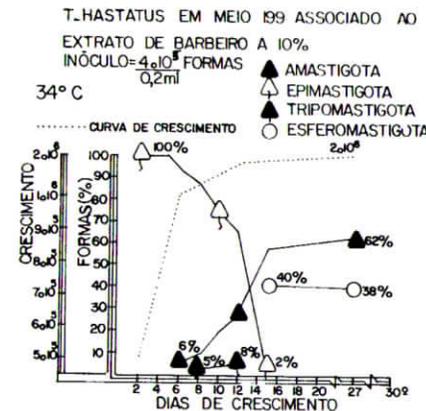


Fig. 3 - Experimento B

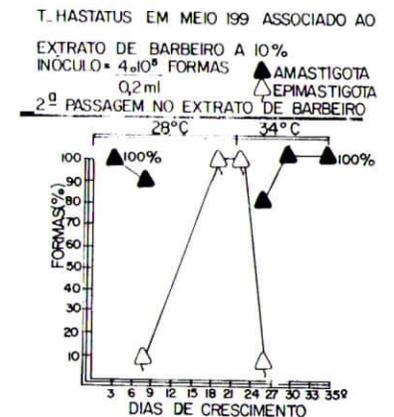


Fig. 4 - Experimento B

TABELA 3: Estudo evolutivo do *T. hastatus* em meio 199 associado a 30% de soro fetal bovino (SFB). Inóculo de $5,4 \times 10^5$ - 0,2ml crescido em LIT no 15º dia.

EXAME Nº DIA	26º C CRESC. (x 10 ⁵)	DISTRIBUIÇÃO DAS FORMAS EPIMASTIGOTA (EPI), TRIPOMASTIGOTA (T) E AMASTIGOTA (A), %																					
		26º C			20 ± 8º C *			28º C		32º C		34º C		35º C		37º C							
		EPI.	T.	A.	EPI.	T.	A.	EPI.	T.	A.	EPI.	T.	A.	EPI.	T.	A.	EPI.	T.	A.				
01 3º	1,9	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	Adaptação	Adaptação	Adaptação							
02 5º	4,6	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	Adaptação	Adaptação	Adaptação							
03 7º	7	96	4	-	100	-	-	97	3	-	100	-	-	Adaptação	Adaptação	Adaptação							
04 9º	12	94	6	-	100	-	-	95	5	-	92	8	-	94	6	-	Adaptação	Adaptação	Adaptação				
05 12º	38	93	7	-	97	3	-	92	8	-	88	12	-	86	14	-	Adaptação	Adaptação	Adaptação				
06 15º	73	91	9	-	95	5	-	90	10	-	73	27	-	68	32	-	67	33	-	Adaptação			
07 17º	77	89	11	-	92	8	-	88	12	-	65	35	-	63	37	-	64	36	-	68	32	-	
08 19º	88	87	13	-	91	9	-	84	16	-	62	38	-	59	41	-	62	38	-	65	35	-	
09 21º	89	84	16	-	87	13	-	84	16	-	60	40	-	54	46	-	56	44	-	65	35	-	
10 23º	91	78	22	-	83	17	-	82	18	-	57	43	-	47	53	-	49	51	-	64	36	-	
11 25º	91	75	25	-	79	21	-	78	22	-	52	48	-	45	55	-	43	57	-	Mortalidade			
12 28º	92	72	28	-	74	26	-	74	26	-	50	50	-	42	58	-	44	56	-	Mortalidade			
13 31º	92	68	32	-	73	27	-	74	26	-	47	53	-	41	59	-	41	59	-	Mortalidade			
14 38º	93	66	34	-	70	30	-	72	28	-	45	55	-	40	60	-	-	-	100	Mortalidade			
15 41º	93	63	37	-	70	30	-	70	30	-	46	54	-	38	62	-	-	-	100	Mortalidade			
16 43º	93	62	38	-	70	30	-	63	35	-	45	55	-	37	63	-	-	-	100	Mortalidade			
17 66º	93	62	38	-	68	32	-	62	38	-	45	55	-	36	64	-	Mortalidade	Mortalidade					
18 114º		97	1	2	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	Mortalidade	Mortalidade		
19 124º		Mortalidade			Mortalidade			Mortalidade			Mortalidade			Mortalidade			Mortalidade			Mortalidade			

*= Temperatura Ambiente

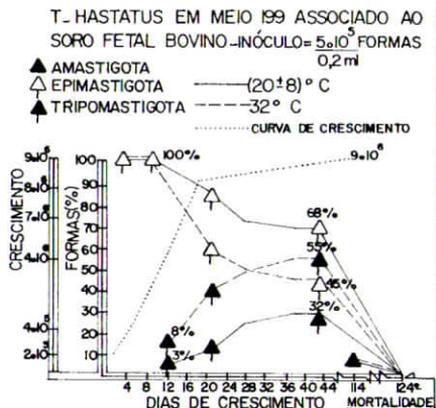


Fig. 5 – Experimento C

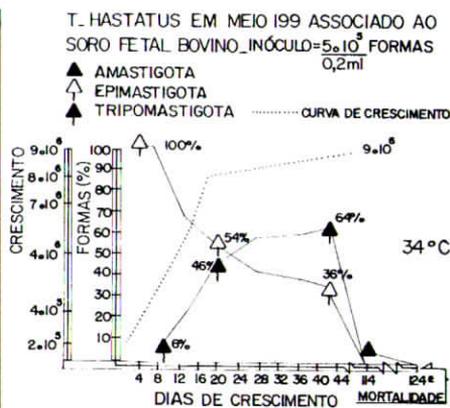


Fig. 6 – Experimento C

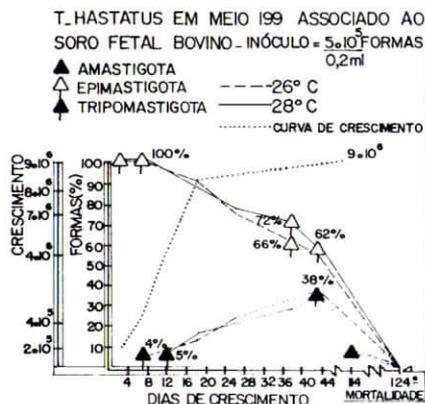


Fig. 7 – Experimento C

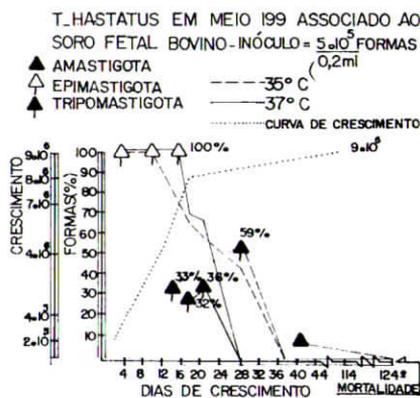


Fig. 8 – Experimento C

do meio LIT a 35°C com soro de pato (20%) ou cloridrato de tetraciclina (0,16 mg/ml e 0,96mg/ml).

O *T. hastatus* que habitualmente é mantido neste meio, a 26°C mantém sua curva clássica de desenvolvimento apresentando de 90 a 93% de epimastigota e tripomastigota, observamos tripomastigota no fim de um cultivo.

No presente experimento a 35°C observamos um bom crescimento do *T.*

hastatus que mostrou sob ação do soro de pato a 20%, diferenciação rápida para a forma tripomastigota e esferomastigota que chegou a alcançar 100% no 20o. dia do cultivo, havendo grande predominância de amastigotas, 970 em 1000 formas contadas. O mesmo pode se observar em relação à tetraciclina nas dosagens empregadas, diferindo principalmente pela produção essencialmente de tripomastigotas no 15o. dia, que chegou em alguns expe-

rintentos a 50%, mostrando rosáceas grandes nesta fase exponencial do crescimento.

Os repiques realizados no meio RQ da cultura do 8o. dia em LIT suplementado com soro de pato (SP) 20% para o RQ suplementado com soro de pato mostrou, no 21o. dia, 10% de tripomastigota, 25% de amastigota, 22,5% de esferomastigota e 42,5% de epimastigota.

O reinóculo em meio RQ+ 0,16mg/ml de Cloridrato de tetraciclina produziu menos tripomastigota 38%, 20% de amastigota, 10% de esferomastigota e 32% de epimastigota.

O reinóculo em meio RQ + 0,96mg/ml de cloridrato de tetraciclina teve 55% de tripomastigota, 10,4% de amastigota, 5,8% de esferomastigota e 28,8% de epimastigota. Os resultados acham-se resumidos nas Tabelas 4 e 5 e Figuras 9, 10 e 11.

TABELA 4: Número de formas em 1.000 elementos contados de *T. hastatus* em cultura de 20 dias a 35°C em LIT suplementado com soro de pato a 20%(SP); cloridrato de tetraciclina 0,16mg/ml (CT) e cloridrato de tetraciclina 0,96mg/ml(CT), inoculados com 2×10^6 epimastigotas.

Meios	LIT+SP20%				LIT+CT 0,16mg/ml				LIT+CT 0,96mg/ml				OBSERVAÇÕES
	T.	A.	Esf.	EPI	T.	A.	Esf.	EPI	T.	A.	Esf.	EPI	
5o.	20	40	50	890	210	30	50	710	320	30	40	670	Repique para o meio RQ com os mesmos suplementos (SP e CT). Rosáceas de tripomastigotas – (Fase exponencial com 20 a 30% CT–0,16mg/ml e 30 a 50%: CT 0,96mg/ml). 97% amastigotas ou esferomastigotas, 3% de tripomastigotas.
8o.	60	140	150	650	350	60	50	540	350	60	50	540	
15o.	80	270	350	300	440	80	50	430	480	70	60	390	
20o.	30	970		0	30	970	0	20	980	0			

T = Tripomastigota

A = Amastigota

ESF = Esferomastigota

EPI = Epimastigota

TABELA 5: Percentual de formas de *T. hastatus* em relação a 1.000 elementos contados, de um repique do 8º dia crescido em LIT + SP 20%; LIT + CT 0,16mg/ml e LIT + CT 0,96mg/ml em meio RQ com os mesmos suplementos.

NÚMERO DE DIAS MEIO RPMI	10	20	30	40	50	...100	OBSERVAÇÕES
	%	%	%	%	%	%	
SG A 20%	Raros A	30 A	± 50 A	> 50 A	100 A	100 A ^{1,2}	A = Amastigota
SP A 20%	-	Raros T	5 T	> 5 T	20 T	25 A	T = Tripomastigota
SFB A 20%	Raros A	50 A	± 50 A	> 50 A	100 A	100 A	1 = Reversão para epimastigota após 5 dias em meio LIT mantida a temperatura de 35°C
EXT.B. A 10%	-	-	5 T	> 5 T	20 T	±30 A	2 = Reversão para epimastigota mantida a temperatura.

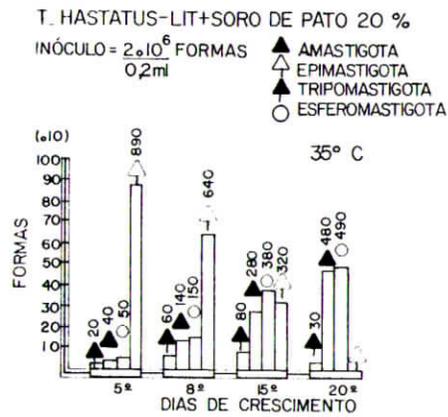


Fig. 9 - Experimento D

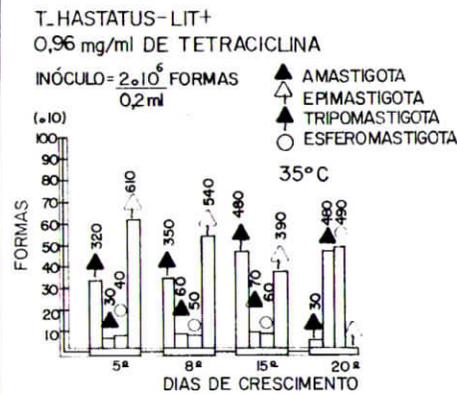


Fig. 10 - Experimento D

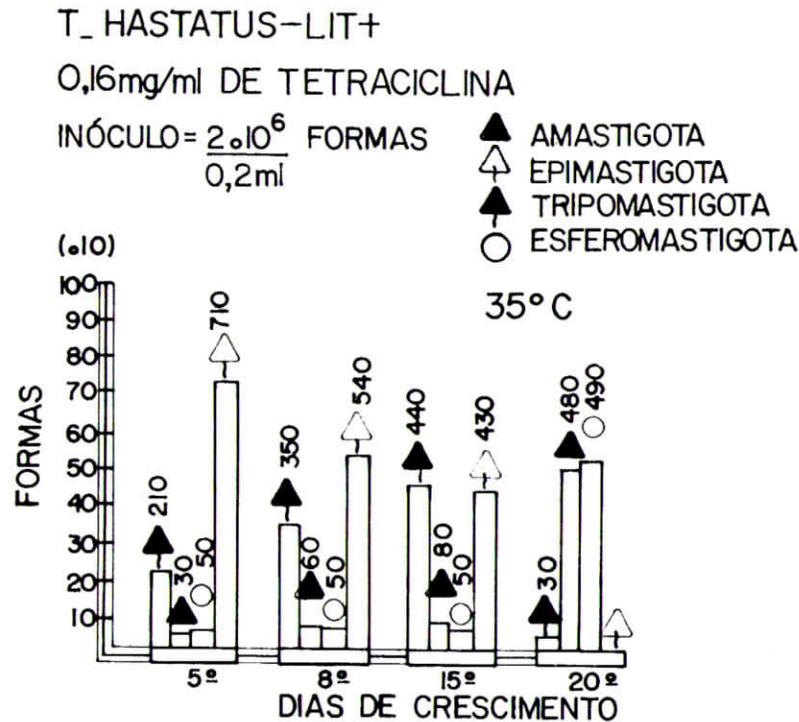


Fig. 11 - Experimento D

Experimento Suplementar n. 1:

O *T. hastatus* provindos do meio LIT a 26°C quando cultivados em meio RPMI associados a soro de pato (SP) a 20% ou extrato de barbeiro (Ext. B) a 10%, mostraram no 30. dia já 5% de tripomastigotas o que chegou a 25 e 30% respectivamente, no 10o. dia de cultivo. O soro de galinha (SG) a 20% e o soro Fetal bovino (SFB) a 20% provocaram diferenciação dos epimastigotas, da ordem de 30% no 2o. dia de cultivo, para amastigotas e que chegaram a 100% no 5o. dia do experimento. Os amastigotas quando transferidos para o meio LIT fresco, ainda que mantida a temperatura de 35°C, retornaram para epimastigota. Tabela 6. Figura 12.

Experimento suplementar n. 2:

O *T. hastatus* repicados do LIT para o meio RQ enriquecido com soro de pato, mostrou de início alteração de morfogênese com mais de dez por cento de tripomastigotas no 4o. dia de cultivo, mais ou menos 30% no 5o. dia e o aparecimento de 30% de amastigotas no 10o. dia, todos diferenciados para amastigota no 30o. dia.

O soro de galinha altera a morfogênese, mas induz o aparecimento precoce e crescente de amastigota que chega a 100% no 5o. dia, única forma encontrada no 30o. dia. As formas amastigotas obtidas revertem para epimastigota quando subcultivadas em LIT fresco a 26°C, o que não acontece se se mantiver a temperatura a 35°C. No meio RQ enriquecido com soro de pato, as subpassagens, independentemente, da temperatura continuam com amastigota e tripomastigota. Tabela 7. Figura 12.

Experimento suplementar ns. 3 e 4:

Influência de alguns antibióticos na

morfogênese do *T. hastatus* e *T. cruzi*. Os resultados deste experimento demonstraram que quando associamos o Cloridrato de tetraciclina ou Amoxicilina em meios variados, obtivemos alteração da morfogênese. Por exemplo, o meio RQ + SP (20%) + Amoxicilina 2,5mg/ml, cultivadas com *T. cruzi* provindos de LIT, quando lidos no 5o. dia mostrou 56,5% de tripomastigota, 9% de amastigotas ou esfenomastigotas, dados muito semelhantes, a cultivos realizados em meio RQ associados ao SP + CL (0,96mg/ml). Tabela 8.

O *T. hastatus* em meio LIT à temperatura de crescimento a habitual 26°C, acrescido de 25mg/ml de Amoxicilina, demonstra a interferência nítida deste antibiótico na morfogênese do protozoário, condicionando o aparecimento precoce de tripomastigota e amastigota. Tabela 9. Figuras 13 e 15.

COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO:

O *Trypanosoma cruzi* em nosso meio, é mantido em meio LIT associado a S.F.B.. Se admite que os trypanosomas nos meios comuns líquidos se mantêm com 96 a 99% de formas Epimastigotas. Crane & Dvorak e Pan, afirmam que segundo Camargo, (1964); Fernandes & Castellani (1966), sob condições normais de crescimento, uma pequena e variável percentagem (até 25%) de epimastigotas se transformam em tripomastigota durante a fase estacionária (8, 16, 25, 26, 46). Esta informação, realmente, se refere ao *Trypanosoma cruzi*, mantido em meio LIT enriquecido com SFB (soro fetal bovino) ou soro bovino (8, 14, 26); e não a qualquer outro meio, em que habitualmente os tripomastigotas não alcançam mais de 6%.

TABELA 6: Percentual de transformação de epimastigota de *Trypanosoma hastatus* de *Phyllostomus hastatus hastatus*, em amastigota e tripomastigotas a temperatura de 35°C, em RPMI enriquecido com 20% de soro de Galinha (SG), Pato (SP) ou fetal bovino (SFB) e extrato de barbeiro (Ext. b).

MEIOS FORMAS LEITURA DIAS	RQ + SP 20%				RQ + CT 0,16mg/ml				RQ + CT 0,96mg/ml				OBSERVAÇÕES
	T.	A.	ESF.	EPI.	T.	A.	ESF.	EPI.	T.	A.	ESF.	EPI.	
89	100	240	260	400	400	100	100	400	507	70	60	363	Presença de rosáceas de tripomastigota nos meios com CT.
169	100	250	120	530	300	200	140	360	400	80	140	380	Presença de rosáceas no meio com CT 0,16mg/ml.
219	100	250	225	425	380	200	100	320	550	104	58	288	Presença de rosáceas nos meios com CT.

T= Tripomastigota

A= Amastigota

ESF= Esferomastigota

EPI= Epimastigota



A



A

Fig. 12 (A e B) – Formas amastigotas em meio RPMI associadas a soro de pato a 20° C e formas amastigotas puras em SFB + soro de galinha.

TABELA 7: Metacicloênese do *T. hastatus* em meio RQ suplementado com soro de pato (SP) a 20%, e soro de Galinha (SG) a 10% e 20%, provindos de LIT a $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, inóculo de 0,2ml de 2×10^6 epimastigotas.

DIAS	10	20	30	40	50	...100	300
MEIO RQ +	%	%	%	%	%	%	%
SP 20%	Alguns T	Alguns T	Alguns T	> 10 T	\pm 30 T	30 A	100 A
SG 10%	Alguns A	\pm 5 A	\pm 10 A	> 10 A	100 A	100 A	100 A
SG A 20%	Alguns A	Alguns A	Alguns A	Alguns A	100 A	100 A	100 A

A = Amastigota T = Tripomastigota

OBSERVAÇÃO: Revertido para epimastigota em LIT a temperatura de 26°C , não reverte para epimastigota em LIT se mantido a temperatura de 35°C . No meio RQ + SP, as subpassagens, independentemente da temperatura continuam amastigota e tripomastigota.

TABELA 8: Metaciclogênese do *T. cruzi*, cepa y, crescido em meio LIT, em meio RQ + SP 20% + CT a 0,96mg/ml e RQ + Amoxicilina 2,5mg/ml, Leitura com 5 dias.

MEIOS FORMAS LEITURA	RQ + SP 20% + CT 0,96mg/ml					RQ + AMOXICILINA 2,5mg/ml					OBSERVAÇÕES
	T.	A.	AN.	ESF.	EPI.	T.	A.	AN.	ESF.	EPI.	
5º Dia	500	70	80	150	200	565	95	85	60	195	Vistas algumas formas coanomastigotas

T= *Tripomastigota*A= *Amastigota*AN= *Anômalas*ESF= *Esferomastigota* EPI= *Epimastigota*

TABELA 9: Metaciclogênese do *T. hastatus* crescido em meio LIT + Amoxicilina 2,5mg/ml, inóculo de $3,6 \times 10^6$ a 26°C, observado por 10 dias e inicialmente até a 10ª hora.

MEIO	LIT + AMOXICILINA 2,5MG/ML					
	TRIP.	AMAST.	ANÔMALAS	ESFER.	EPI.	F. INT. %
1ª Hora	-	-	-	-	100	-
2ª "	3	0	2	1	87	7
3ª "	2	0	7	1	81,5	8
4ª "	1	0	3,5	2,5	86	7,5
5ª "	1,5	0	1	0	92	5
6ª "	1	0	7,5	5	75,5	9
7ª "	1	0	3	3,5	83,5	9
8ª "	12,5	0	9,5	7	62,5	8,5
10ª "	3,5	2,5	2	1,5	2,5	1,5
5 Dias	2,5	0	3	4	90	0
10 " 0,2ml	53	3	2	16,5	25,5	0

TRIP.= *Tripomastigota*

AMAST.= *Amastigota*

ANÔMALAS= *Anômalas*

ESFER.= *Esferomastigotas*

EPI.= *Epimastigotas*

F. INF.= *Formas intermediárias*

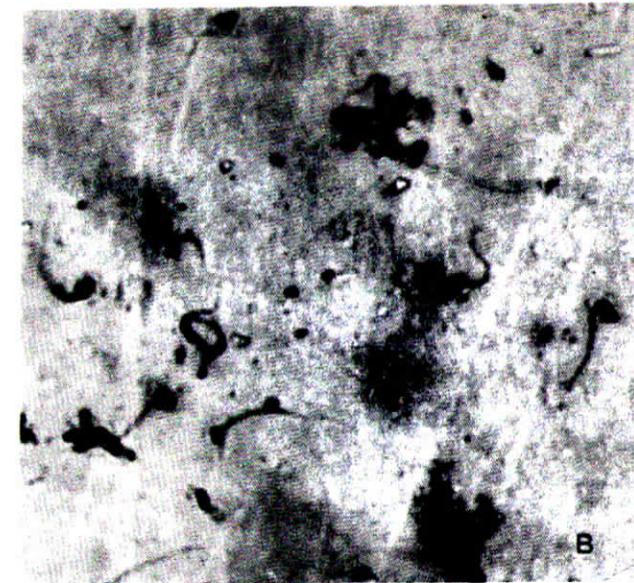
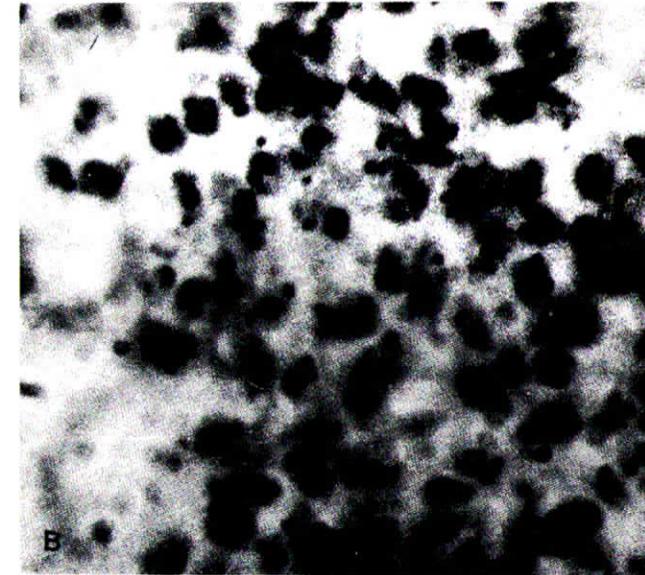


Fig. 13 (A e B) – Formas tripomastigotas e amastigotas precoces em presença de Amoxicilina.

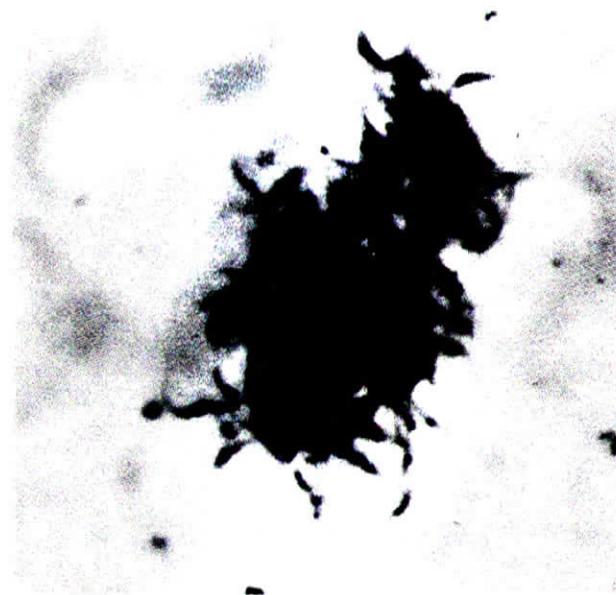


Fig. 14 – Formas bizarras da evolução do *T. hastatus* em presença de Tetraciclina.

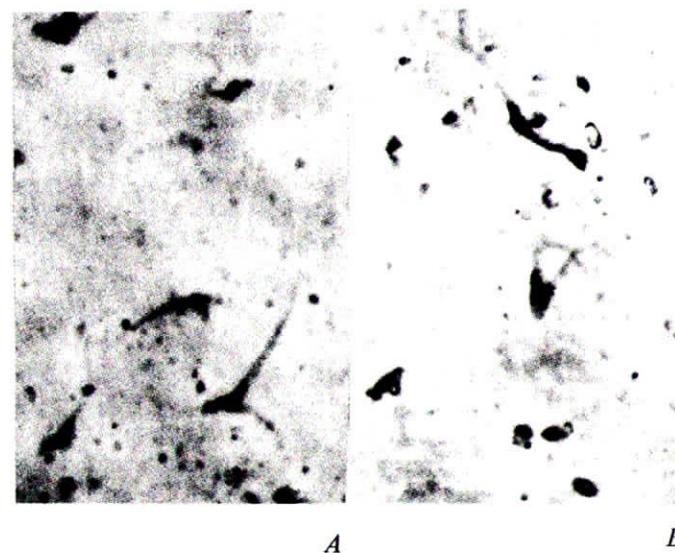


Fig. 15 (A e B) – Formação de "clumps" de trypanosoma nas culturas com antibióticos.

Em 1978, Kimura e cols. referem-se à morfogênese do *T. cruzi* a partir de tripomastigota purificados, obtidos em meio NNN modificado difásico usando o meio LIT como líquido de condensação, após cultivo em meio LIT enriquecido com SFB 10% (a 27, 33 ou 37°C) (32).

Nós usamos o meio LIT, para manter nossas cepas de *T. cruzi* e de *T. hastatus*, já enriquecido com soro bovino. Quando suplementamos com soro de pato a 20%, obtivemos crescente diferenciação dos epimastigotas para amastigotas ou esferomastigotas chegando a 97% no 20o. dia de incubação a 35°C, enquanto que a presença de tripomastigotas mais elevada foi de 8% no 15o. dia.

No mesmo LIT associado a Clor, tetraciclina, em dosagens elevadas (0,16mg/

ml e 0,96mg/ml), houve até o 15o. dia, cerca de 45% de tripomastigota; no 30o. dia 100% das formas presentes enquadravam-se em amastigotas ou esferomastigotas.

Associamos ao meio LIT, 2,5mg/ml de Amoxicilina, e observamos por 10 horas consecutivas, depois no 5o. dia e no 10o. dia – verificamos morfogênese a partir da 2a. hora quando foi vista 13% de formas diferentes do epimastigota em que predominavam formas anômalas ou indeterminadas e intermediárias. (Fig. 15) No 10o. dia os epimastigotas representaram 25,5% da população, 53% era tripomastigota, 3% amastigota, 16,5% de esferomastigota e 2% de formas anômalas.

A fim de comparar o comportamento do *T. cruzi* cepa Y em relação a *T. has-*

tatus, ele foi cultivado a 34°C no meio RQ + soro de pato 20%, associado a 0,96mg/ml de cloridrato de tetraciclina e RQ + Amoxicilina 2,5mg/ml, a leitura feita no 5o. dia mostrou resposta idêntica à obtida com o *T. hastatus*, cerca de 80% de diferenciação com 50 a 56% de tripomastigota.

Até agora o meio 199 só foi usado poucas vezes com a finalidade de se estudar a morfogênese do *T. cruzi* (46). Hendricks e cols. (1978), referem-se em um relatório sobre o uso de meios comercialmente disponíveis para hemoflagelados aos trabalhos de Pan (1968, 1970) sobre a obtenção de formas amastigotas de *T. cruzi* em meio axênico a temperaturas mais elevadas e afirmam textualmente que "os amastigotas "like" observados no seu relatório, foram obtidos por passagens seriadas do organismo a elevada temperatura. O meio F-7 de Pan consiste praticamente no meio 199 acrescido de plasma de galinha, extrato de embrião de galinha, e sangue de coelho desfibrinado, (1 parte para 4 de água destilada) — proporção final de 85:5:5:5, pH 7.8. Neste meio foram cultivados organismos subcultivados em NNN pelo período de 10 anos, em que se encontravam 99,6% de epimastigotas e 0,4% de tripomastigota. Os resultados a 29,5 e 35,5°C mostraram que os epimastigotas desapareceram após a 2a. subcultura e as formas amastigotas predominaram rapidamente, formas tripomastigotas eram raras nas primeiras subculturas, desaparecendo a partir da 2a. Quando retirado do meio F-7 o plasma e o embrião de galinha verificou-se a ausência de metaciclogênese; demonstrando que possivelmente o soro de galinha ou extrato de embrião tenha influência sobre a morfogênese.

Usamos o meio 199 associado a 30% de SFB, com um inóculo pequeno de $5,4 \times 10^5$ e obtivemos a partir de 28°C discreta modificação do epimastigota para tripomastigota da ordem de 26%; que chegou a 50 a 57%; a temperaturas mais elevadas 32 e 34°C, usamos este mesmo meio, em que anexamos além do SFB, extrato de barbeiro a 10% (1v/2v) verificamos a 28°C 40% de tripomastigota e 17% de amastigota, no 21o. dia e 58% de tripomastigota e 34% de amastigota.

No último experimento com meio 199, só acrescentamos o extrato de barbeiro a 10%, ainda usamos um inóculo pequeno 4×10^5 , e obtivemos transformação praticamente, para amastigotas, 98% no 15o. dia (se incluirmos os esferomastigotas) e cerca de 100% no 27o. dia. Em três subpassagens houve tendência à transformação completa para amastigota.

Usamos o meio RPMI, ao que parece pela primeira vez, com a finalidade de verificar sua potencialidade na metaciclogênese do *T. hastatus* e observamos a cultura diariamente até o 5o. dia, depois no 10o. dia obtivemos resultados similares e constantes quando associamos o RPMI ao soro fetal bovino (SFB) ou ao soro de galinha (SG) em ambos os meios houve precoce evolução para amastigota alcançando já no 5o. dia cerca de 100% de formas amastigotas. A associação do meio ao soro de pato (SP) a 20% e extrato de barbeiro a 10%, houve inicialmente, tendência ao aparecimento de tripomastigota, com 20% no 5o. dia, mas com diferenciação para amastigota, da ordem de 30% no 10o. dia.

Aparentemente, os soros de aves não são idênticos estimuladores para o *T. hastatus* — enquanto o sangue de galinha induz precocemente à formação de amas-

tigota o soro de pato induz inicialmente à formação de tripomastigota.

O meio complexo, RQ, descrito para isolamento e cultura de leishmanias, quando associado ao sangue de galinha 10 a 20% ou soro de pato, se comporta exatamente como quando associado ao RPMI, proporcionando a frequência de 100% de amastigotas no 5o. dia do cultivo.

O meio de Grace, foi o que apresentou até agora maior potencial como indutor da metaciclogênese quando associado ao SFB, o mais empregado dos indutores de metaciclogênese. Os primeiros a empregar o meio de Grace foram Wood & Pipkin, (1969) que o enriqueceram com hemolinfa de *P. Cynthia* e soro fetal bovino (SFB) obtendo excelente diferenciação (59); Wood & Souza, substituíram a hemolinfa pelo extrato de *R. prolixus* com bons resultados (60). Verificaram ainda que o extrato de barbeiro era fundamental, sem ele não havia metaciclogênese.

O meio Grace original e ligeiramente modificado foi usado por Isola & Cols. associado ao extrato de "estômago", "intestino", "ovário", e "testículo" de *T. infestans* em jejum de 15 dias ou recém-alimentados em galinha. Todos eram adequados para o crescimento normal de *T. cruzi*, (cepa Tulahuem) mas somente os meios enriquecidos com estômago ou intestino de triatoma, recém-alimentados em galinhas eram capazes de produzir metaciclogênese substancial. O meio de Grace sem o extrato, enriquecido com soro de bovino, ou soro fetal bovino 7% + albumina bovina FV + ultrafiltrado de ovos de aves a 1%, produziu metaciclogênese da ordem de apenas 17% (31).

Sullivan (1982) comunica que o meio Grace, associado a soro fetal bovino

a 10%, a 26°C em 7 dias, permite metaciclogênese da ordem de 75% de uma cepa Y, mantida no meio de Offut (1946) por longo período e que recentemente foi transferida para o meio de Tobie usando como fase líquida o LIT, enriquecido com SFB 10%, partindo dele para o meio de Grace. Refere ainda que a retirada ou diminuição do SFB do meio de Grace afetam adversamente o crescimento mas não diminui o índice de transformação (54). Estes resultados, são aparentemente, contraditórios em relação à potencialidade do meio de Grace associado ao SFB, e mesmo sem ele, como afirma Sullivan pois diferem dos achados de Wood e cols. para quem mesmo na presença do meio e do fator de indução o SFB, não havia metaciclogênese com o extrato de *R. prolixus*; mais exigência ainda, seriam necessárias segundo Isola e cols. que dispoem do meio enriquecido por fatores estimuladores do crescimento como a albumina bovina além do SFB só obtiveram a metaciclogênese entre 60 e 90% na presença de extrato de intestino ou estômago de *T. infestans* recém-alimentados em galinha. O meio de Grace somente com SFB proporcionava apenas 17% de metaciclogênese menos que o LIT + SFB à temperatura ambiente.

Crane & Dvorak, (1982) relataram a transformação "espontânea" do *T. cruzi* em meio líquido que exibe frequência de 97% de transformação de epimastigota para tripomastigota quando cultivado no meio líquido em que foi isolado.

A cepa em questão é a Y (Silva & Nussenzweig, 1953) obtida de Z. Brener em Belo Horizonte, e que foi mantida desde 1977 por passagens semanais em cultura de células: músculo esquelético de embrião bovino (Dvorak & Hyde 1973), e há 2 anos transferido dessa cultura de

tecido, através tripomastigota, para o meio LIT enriquecido com 20ug/ml de hemina, 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado, 100ug/ml de penicilina e 100 ug/ml de Streptomomicina, produzia epimastigotas. Repiques de 7/10 dias 24 a 26°C.

Neste meio a cepa quando inoculada em proporção 0,1–5,0x10⁷ parasito/ml de epimastigota transformando-se em tripomastigota 90% no 14o. ao 16o. dia. Inóculo na concentração de 10⁶/parasitas/ml, alonga o tempo e a transformação se dá no 16o. dia com inóculo de 10⁶/parasitas/ml, 16 dias são necessários para a fase estacionária de crescimento, e somente 20% de tripomastigota são observados no 28o. dia. Clones formados desta cepa apresentam o mesmo comportamento.

Por que esta cepa Y se comporta desta maneira e a cepa Tulahuem posta sob as mesmas condições não o faz? Provavelmente isto se deve à potencialidade intrínseca do parasita aparentemente, ganha no caso, pelo parasita, durante a sua passagem prolongada em cultura de células embrionárias de músculo esquelético bovino – pois a mesma cepa mantida em condições normais em Belo Horizonte, ao que se sabe, não apresentou esta “espontânea” capacidade metaciclôgenica.

Do presente trabalho em suma, ficou demonstrado que o *Trypanosoma hastatus*, da mesma forma que o *T. cruzi*, embora habitualmente cresça e se mantenha em meio de cultura com cerca de 97% de formas epimastigota, é passível de se modificar, “in vitro”, em meio acelular, reproduzindo as formas ocorrentes em sua evolução tanto no triatomíneo quanto no hospedeiro vertebrado, na dependência de fatores nutricionais e esti-

muladores encontrados em soros de diversos animais – mamíferos e aves, ou em extratos de insetos como triatomíneos. Estes fatores de ordem química, podem ser encontrados também em substâncias sintetizadas ou naturalmente produzidas, biologicamente como antibióticos, por exemplo, tetraciclina, rifocina, amoxicilina. Além destes fatores a temperatura até determinado patamar, 35°C, influencia na metaciclôgenese, a partir deste nível ela torna-se lesiva e pode destruir os protozoários não adaptados.

Esta capacidade de morfogênese, aparentemente, pode ser estimulada em uma cepa, que poderá mantê-la indefinidamente, como que haja sofrido uma mutação ou perdê-la após a 1a. ou poucas passagens quando posto em condições normais de crescimento. Para que ocorra esta modificação permanente, talvez seja necessário manutenção das condições de experimento por tempo prolongado.

O comportamento variável de morfogênese de cepas diferentes, observadas em relação a determinados estímulos, como o meio de Grace associado ao Soro Fetal Bovino, que sozinho é capaz de estimular uma intensa metaciclôgenese de uma cepa, o que só se observa em outras, na presença de extrato de barbeiro e ou ainda, na presença de extrato de triatomíneos recém-alimentados em galinhas, são sugestivos de que existe um componente importante para que se instale a diferenciação para tripomastigotas e amastigotas em função de condições intrínsecas do parasita.

Estamos convictos de que a metaciclôgenese do *T. cruzi* depende de uma interação entre o parasita e o meio que deve conter substâncias estimuladoras.

O parasita em si, intrinsecamente, é a resultante da somatória das ações de

condições preliminares metabólicas pretéritas de natureza química e ou física.

O perfil morfológico depende, provavelmente, daquela interação meio/parasita, em função da capacidade nutridora do meio e da ação de estímulos químicos ou físicos que atuam transitória ou continuamente sobre parasitas “sensibilizados” através de estímulos preliminares prolongados e que lhe imprime condições intrínsecas de diferenciação morfológica que podem ser permanentes ou fugazes.

A morfogênese de uma cepa depende ainda do tamanho do inóculo, da adequação do tempo do repique em relação à curva natural do crescimento.

A extrapolação dessas observações nascidas da análise do comportamento do *T. cruzi* em laboratório, em meios de cultivos celulares e acelulares, acreditamos, permitem inferir que esta tão grande variação de “cepas” observadas pelos caracteres taxonômicos do parasita, seja em função de variações clínicas Regionais da doença, das diferenças de esquizodemas, do perfil enzimático, da caracterização antigênicas e morfológicas podem representar apenas a potencialidade de variação das cepas de *T. cruzi*.

O mecanismo de ação dos estimuladores da metaciclôgenese, como dissemos, é desconhecido, mas alguns trabalhos têm sugerido a importância de fatores estimuladores da pinocitose como sua causa desencadeante. Tem sido demonstrado a ação fortemente estimuladora da pinocitose do Soro Fetal Bovino e de hemoproteínas como a catalase do soro bovino, albumina bovina e a peroxidase. Por outro lado, trabalhos experimentais já demonstraram interferência de drogas como a Stilomicina bloqueando a incorporação de nucleotídeos e ácidos nucleicos, induzindo a um crescimento desorganizado.

Alterações parecidas ocorreram com o uso da mitomicina C e Actinomicina.

Em nossos experimentos com antibióticos, a Tetraciclina deve ter interferido no mecanismo da síntese do RNA facultando modificação à morfogênese e a Amoxicilina deve ter agido diretamente por mecanismo de pinocitose, porquanto a atuação normal sobre a parede das bactérias não teria sentido frente ao *T. cruzi* ou talvez como carreadora de fatores para dentro do trypanosoma.

SUMMARY

T. Hastatus – Trypanosoma of bat Phyllostomus hastatus hastatus. Study about factors involved in its morphogenesis “in vitro”

The successful cultivation and morphogenesis of *T. hastatus* in a variety of media (199, RPMI, LIT and RQ), and enriched by fetal calf serum (FCS) 10 a 30%, chicken serum (10 and 20%) duck serum (20%) and/or *T. infestans* extract, and/or antibiotics (Chortetraciline and Amoxicilina) is reported.

The cultures were incubated at 20+ 80°C, (inviroment) 26, 28, 32, 34, 35 or 37°C.

All media employed were able to support developing of *T. hastatus* in epimastigotes forms, at high yield, and when associated with wathever “stimulators” used, occurred variable morphogenesis, (20 to 100%) with about 60% of metacyclic forms or 100% of amastigotes.

A certain connotation with incubation temperature grade is observed.

Seemed wich the “stimulators” used has diferent activity: induce the

differentiation to amastigote or tripomastigote early, for an intrinsic condition, but in the end of the stationary stage there are a elevated number of amastigotes.

Seemed wick duck serum, triatoma extracts, and chlortetraciline (0,96mg/ml), induce to trypomastigotes differentiation while chicken serum induce the production of amastigotes.

All differentiate forms, trypomastigotes or amastigote, both return to epimastigote when cultured at 26°C in medium has been maintained.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ÁVILA, J. L.; BRETANA, A.; CASANOVA, M. A.; ÁVILA, A. & RODRIGUEZ, F. - "Trypanosoma cruzi": defined medium for continuous cultivation of virulent parasites. *Exp. Parasitology*, 48: 27-35, 1979.
- 02 - BAKER, J. & PRICE, J. - Growth in vitro of "Trypanosoma cruzi" as amastigotes at temperatures below 37°C. *Int. J. Parasitol.*, 3: 549-551, 1973.
- 03 - BARBOSA, W.; MARTINS, S. P. & OLIVEIRA, R. L. - Nota preliminar sobre "Trypanosoma" variedade "hastatus" isolado de "Phyllostomus hastatus" da Caverna de Fercal - D.F. - Brasil. *Rev. Pat. Trop.*, 2(4): 367-376, 1973.
- 04 - BONÉ, G. L. & PARENT, G. - Stearic acid, an essential growth factor for "Trypanosoma cruzi". *J. Gen. Microbiol.*, 31: 261-266, 1963.
- 05 - BRENER, Z. & CHIARI, E. - Aspects of early growth of different "Trypanosoma cruzi" strains in culture medium. *J. Parasitol.*, 51: 922-926, 1965.
- 06 - BRENER, Z. - Biology of "Trypanosoma cruzi". *Annual Review of Microbiology* 27: 347-382, 1973.
- 07 - BRETANA, A. & O'DALY, J. A. - Uptake of fetal proteins by "Trypanosoma cruzi". *Immunofluorescence and ultrastructural studies. International Journal for Parasitol.*, 6: 379-386, 1976.
- 08 - CAMARGO, E. P. - Growth and differentiation in "Trypanosoma cruzi". I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 93-100, 1964.
- 09 - CARNEIRO, M.; DE LANA, M. & CHIARI, E. - Stimulatory effects by "conditioning" cultures medium "TSH" on the transformation from epimastigotes to trypomastigotes in "Trypanosoma cruzi". In: *Pesquisa básica em doença de Chagas Fifth Annual Meeting. Caxambu, Brazil.*, p. B-28.
- 10 - CASTELLANI, O. & FERNANDES, J. - the effects of antipurines and antipurimidines on the growth and nucleic acid synthesis in. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 275-282, 1965.
- 11 - CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. - Differentiation of "Trypanosoma cruzi" in culture. *J. Protozool.*, 14: 447-451, 1967.
- 12 - CHAGAS, C. - Nova tripanosomíaze humana: Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do "Schizotrypanum cruzi", n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. (A new human trypanosomiasis: studies on the morphology and life cycle of "Schizotrypanum cruzi", new genus, new species, etiological agent of new human disease). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.
- 13 - CHIARI, E. - Crescimento, diferenciação e infectividade de formas de cultura do "Trypanosoma cruzi", mantidas em laboratório por diferentes períodos. Tese. Univ. Fed. Minas Gerais, 72 p. 1971.
- 14 - CHIARI, E. - Growth and differentiation of "Trypanosoma cruzi" culture forms kept in laboratory for different periods of time. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 16: 81-87, 1974.
- 15 - COHN, Z. A. & PARKS, E. - The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. II Factors inducing vesicle formation. In: *AVILA & Cols*, n. 01.
- 16 - CRANE, S. ST. J. & DVORAK, J. A. - "Trypanosoma cruzi": Spontaneous transformation by a y strain variant in liquid medium. *Exp. Parasitol.*, 54: 87-92, 1982.
- 17 - CZEREWUTA, A. C.; BARBOSA, W. & OLIVEIRA, O. S. - Formas de cultura - Tripomastigota e amastigota de "T. hastatus" (Trypanosoma cruzi-like de morcegos), na tentativa de infecção de macrófago de camundongos e do próprio camundongo. *Rev. Pat. Trop.* 3 (3): 1984. "In prensa".
- 18 - DEANE, L. M. - Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I - Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 3: 15-28, 1961.
- 19 - DIAS, E. - Revisão geral dos hemoflagelados de chiropteros. Estudo experimental do "Schizotrypanum cruzi". Identidade com "Schizotrypanum cruzi". O grupo vespetilionis. 9a. Reun. Soc. Arg. Pat. Seg. Norte. 1: 10-88, 1935.
- 20 - DIAS, E.; MELLO, G.B.; COSTA, O.; DAMASCENO, R. & AZEVEDO, M. - Investigação sobre esquistotripanose de morcegos no Estado do Pará. Encontro do barbeiro "Cavernicola Pilosa" como transmissor. *Rev. Brasil. Biol.* 2: 102-110, 1942.
- 21 - DIAS, E. & ROMANA, C. - Algumas investigações sobre "Schizotrypanum" de Quirópteros. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 34: 619-625, 1939.
- 22 - DUSANIC, D. G. - In vitro production of metacyclic trypomastigotes of "Trypanosoma cruzi". *J. Parasitol.*, 66(6): 1046-1049, 1980.
- 23 - EAGLE, H. - Amino acid metabolism in mammalian cell culture. *Science*, 130: 432-437, 1959.
- 24 - FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. - Nucleotide and polynucleotide synthesis in "Trypanosoma cruzi". I - Precursors of purine compounds. *Exp. Parasitol.*, 7: 224-235, 1958.
- 25 - FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. - *Exp. Parasitol.* 8: 480-485, 1959. citado por LUSTOSA, E. S. n. 35.
- 26 - FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. - Growth characteristics and chemical composition of "Trypanosoma cruzi". *Exp. Parasitol.*, 18: 195-202, 1966.
- 27 - FERNANDES, J. F., CASTELLANI, O. & KIMURA, F. - Physiological on "Trypanosoma cruzi" Genetics (Suppl.) 61: 213-226, 1969.
- 28 - GRACE, F. D. C. - Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 195: 788-789, 1962.
- 29 - HENDRICKS, I. D., WOOD, D. E., HAJDUK, M. F. - Haemoflagellates: Commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology*, 70: 309-316, 1978.
- 30 - HOWRE, C. A. & WALLACE, F. G. - Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature (London)*, 212: 1385-1386, 1966.
- 31 - ISOLA, E. L. D.; LAMMEL, E. M.; KATZIN, V. J. & CAPPA, S. M. G. - Influence of organ extracts of "Triatoma infestans" on differentiation of "Try-

- panosoma cruzi". *J. Parasitol.*, 67(1): 53-58, 1981.
- 32 - KIMURA, E.; LAY, W. H. & FERNANDES, J. F. - Extracellular "in vitro" evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from "Trypanosoma cruzi" cultures. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 20(3): 133-138, 1978.
- 33 - LAMBRECHT, F. L. - Biological variations in trypanosomes and their relationship to the epidemiology of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 346-352, 1965.
- 34 - LANAR, D. D. - Growth and differentiation of "Trypanosoma cruzi" cultivated with a "Triatoma infestans" - embryo - cell-line. *J. Protozool.*, 26: 457-462, 1979.
- 35 - LUSTOSA, E. S. - Crescimento e diferenciação do "Trypanosoma cruzi" em meio líquido. *Rev. Pat. Trop.* 7(3-4): 183-192, 1978.
- 36 - MARINKELLE, C. J. - Biology of the trypanosomes of bats. In: *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A. - Academic Press, London.
- 37 - MENEZES, H. - Protective effect of an avirulent (Cultivated) strain of "Trypanosoma cruzi" against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 1-4, 1968.
- 38 - MUNIZ, J. & BORRIELLO, A. - Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguíneas do "Schizotrypanum cruzi". *Rev. Brasil. Biol.*, 5: 563-576, 1945.
- 39 - MUNIZ, J. & FREITAS, G. - Realização "in vitro" do ciclo do "S. cruzi" no vertebrado, em meios de caldo líquido peritoneal. *Rev. Brasil. Biol.*, 6: 467-484, 1946.
- 40 - NEVA, F.A.; MALONE, M.F. & MYERS, B. R. - Factors influencing the intracellular growth of "Trypanosoma cruzi" "in vitro". *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 10: 140-154, 1961.
- 41 - NOBLE, E. R. - The morphology and life cycles of tripanosomes. *Quart. Rev. Biol.*, 30: 1-28, 1955.
- 42 - O'DALY, J. A. - A new liquid for "Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi". *Journal of Parasitology*, 22: 265-270, 1975.
- 43 - O'DALY, J. A. - Effects of fetal calf serum fractions and proteins on division and transformation of "Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi" in vitro. *Journal of Protozoology*, 23: 577-583, 1976.
- 44 - OFFUT, E. P. Studies in the life cycle and viability of "L. tropica" in vitro. *Journal of Parasitology*, 32 (Suppl.): 1, 1946.
- 45 - OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CZE-REWUTA, A. C. & MENDONÇA, J. R. - Uso de amastigota de trypanosomas cultivados a 35°C em meios sem células na RIFI para doença de chagas. *Rev. Pat. Trop.*, 13(3): 1984, "in Prensa".
- 46 - PAN, C. T. - Cultivation of the leishmaniform stage of "Trypanosoma cruzi" cell-free media at different temperatures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 17(6): 823-832, 1968.
- 47 - PAN, C. T. - Cultivation and morphogenesis of "Trypanosoma cruzi" in improved liquid media. *J. Protozool.*, 18: 556-560, 1971.
- 48 - PAN, C. T. - "Trypanosoma cruzi": Intracellular stages grown in a cell-free media at 37°C. *Exp. Parasit.*, 45: 215-224, 1978.
- 49 - PICK, F. - Sur un nouveau milieu au sang permettant la transmission rapide du "Trypanosoma cruzi" (formes sanguines et metacycliques) en formes leishmaniennes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 50: 216-219, 1957.
- 50 - PIZZI, P. T. - Estudos citológicos sobre "Trypanosoma cruzi" I - Observações en medios de cultivo: a - Morfologia general; b - Núcleo; c - Condrioma. *Biológica*, 8-11: 93-104, 1949.
- 51 - PUPNEY, M. & LANAR, D. - Establishment and characterization of a cell line (BTC-32) from the triatomine bug "Triatoma infestans" (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 71: 109-118, 1976.
- 52 - SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. - Sobre uma cepa de "Trypanosoma cruzi" altamente virulenta para o camundongo branco. (on a strain of "Trypanosoma cruzi" Highly virulent for white mice). *Folia Clínica et Biologica*, 20: 191-207, 1953.
- 53 - SOUZA, W.; CARVALHO, T.U.; BENCHIMOL, M. & CHIARI, E. - "Trypanosoma cruzi": Ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.*, 45: 101-115, 1978.
- 54 - SULLIVAN, J. J. - Metacyclogenesis of "Trypanosoma cruzi" in vitro: a simplified procedure. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3): 300-303, 1982.
- 55 - TOBIE, E. J. - Cultivation of mammalian trypanosomes. *J. Protozool.*, 11: 418-423, 1964.
- 56 - TRAGER, W. - Nutrition and biosynthetic capabilities of flagellates: Problems of in vitro cultivation and differentiation. In: "Trypanosomiasis and leishmaniasis" - CIBA Foundation Symposium 20 (New series), pp. 225-245, 1977. Elsevier, Amsterdam.
- 57 - TREJOS, A.; GODOY, G.A.; GREENBLATT, C. & CEDILLOS, R. - Effects of temperature on morphologic variation of Schizotrypanum cruzi in tissue culture. *Exp. Parasitol.*, 13: 211-218, 1963.
- 58 - WARREN, I. G. & BORSOS, T. - Studies on immune factors occurring in sera of chickens against the tritrichia stage of "Trypanosoma cruzi". *J. Immunol.*, 82: 585-590, 1959.
- 59 - WOOD, D. E. & PIPKIN, A. E. - Multiplication and differentiation of "Trypanosoma cruzi" in an insect cell culture system. *Exp. Parasitol.*, 24: 176-183, 1959.
- 60 - WOOD, D. E. & SOUZA, O. E. - Trypanosoma cruzi. Effects of Rhodnius prolixus extracts on in vitro development. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18: 93-96, 1976.
- 61 - WOOD, S. F. - Hematologic differentiation of the intramuscular developmental forms of "Trypanosoma cruzi" Chagas. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 2: 1015-1035, 1953.