

NOTA PRELIMINAR SOBRE **TRYPANOSOMA** VARIEDADE
hastatus ISOLADO DE **PHYLLOSTOMUS hastatus** DA
CAVERNA DE FERCAL - DF. BRASIL

WILLIAM BARBOSA ** SUELI PIRES MARTINS *** RAQUEL
LOPES DE OLIVEIRA ****

RESUMO

De morcêgos **Phyllostomus hastatus hastatus**, capturados em uma caverna, próxima de Brasília, foram isolados **Trypanosomas**, identificáveis aos descritos no Brasil (Goiás, 1933, Minas Gerais 1934-1935, Mato Grosso, 1940, Caxias, RJ, 1940) nestes quirópteros.

Os dados biomorfológicos foram verificados, em material de cultura, e documentação por desenho em câmara clara e microfotografias acompanham este relato.

INTRODUÇÃO

A presença de tripanosomatídeos ocorrentes em quirópteros nas Américas e outras partes do mundo é conhecida desde 1898². No Brasil 6 espécies de morcêgos, pertencentes à 4 famílias já foram encontradas infectadas por **Schizotrypanum**⁵. Da família **Phyllostomidae** o **Phyllostomus hastatus** (Pallas) parece que foi

o primeiro a ser encontrado parasitado. Fato que indicou, provavelmente, a ocorrência "princeps" deste protozoário em morcêgos nas Américas, e que foi verificado por Durham em 1900, segundo Dias². Em Jataí, Goiás, foi encontrado o primeiro **Phyllostomus hastatus** infectado, por Carini^{2,5} em 1931. A este trabalho seguiram-se observações de Dias, em 1933-1934² em Minas, Dias e Romãia⁵ em 1939 e Deane em 1961, que publicou seus achados de 1936 a 1938 sobre investigações de hemoflagelados em mamíferos da região Amazônica do Brasil, na qual se refere ao encontro de **Trypanosomas** em 2 **P. hastatus**, dentre 4 examinados¹. Em Goiás, há cerca de 5 anos encontrou-se, nesses morcegos, espécimes positivos para **Trypanosomas** semelhantes ao **cruzi**. Na ocasião não tendo sido obtido o cultivo não foi

* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical (IPT) da Universidade Federal de Goiás (UFGo.).

** Prof. Titular dos Dept^{os}. de Med. Tropical e Parasitologia do IPT-UFGo.

*** Residente (Bolsista estagiária) (RI) do Dept^o. Parasitologia do IPT-UFGo.

**** Técnica de Laboratório de Protozoologia do Dept^o. de Parasitologia do IPT-UFGo.

publicado (*). Recentemente colhemos da mesma área, exemplares de morcegos daquela espécie, com a finalidade de re-isolar aquele parasito, o que foi conseguido de 1 de 2 infectados num lote de 16 morcegos capturados. Neste trabalho descrevemos esse achado.

MATERIAL E MÉTODOS

O material de investigação constou de 16 morcegos capturados em uma caverna no Distrito Federal conhecida como Fercal.

O gênero destes morcegos foi reconhecido como *Phyllostomus hastatus hastatus* por comparação com material disponível em nosso laboratório, quando estudado anteriormente em 1968.

Cada dia sacrificava-se um animal, o qual recebia como identificação a letra M com o acréscimo do número correspondente ao seu sacrifício, ex.: M1, M2, M3... M16/73.

O sangue do morcego era colhido após anestesia com éter, através de punção cardíaca e examinado entre lâmina e lamínula. Ao mesmo tempo 0,3 a 0,5 ml eram inoculados em 4 camundongos e semeados em meios de cultura para possível desenvolvimento de hemoflagelados.

As lâminas positivas para os hemoflagelados foram identificadas após fixação pelo metanol e coradas pelo Giemsa.

O exame a fresco do sangue dos camundongos acima citados, foi realizado até o período de 40 dias. Os animais mortos e sacri-

ficados foram estudados por impressão de víceras e exame histopatológico.

As culturas obtidas nos meios abaixo discriminados foram examinadas periodicamente, e o crescimento avaliado de início, pelo número aparente de parasitos existentes em todos os campos de uma lamínula de 22 mm.

Os meios de cultura usados foram os seguintes: Ducrey, Meio do carvão de sangue humano, Meio de Lit, Meio de Mc-Connell F., Meio N.N.N., Meio de Roitman, Meio de Warren.

As formas encontradas tanto em meio de cultura como em esfregaço sanguíneo foram desenhadas em câmara clara (Jena), daquelas desenhamos 33 (Trinta e três) epimastigota, e 52 (cinquenta e dois) tripomastigota, e do esfregaço sanguíneo do morcego uma única forma de tripanosoma. Estas formas foram também fotografadas em fotomicroscópio Zeiss — Jena com aumento de 1.000x.

Quanto ao estudo de infectividade para animais de laboratório e barbeiros fêz-se apenas alguns experimentos. Além dos animais inicialmente inoculados, inoculou-se um lote com 10 camundongos, outro lote com 5 camundongos, e três ratos brancos recém-nascidos. Praticamos xen-artificial em 6 ninfas de *Triatoma infestans*.

Os animais inoculados, mortos espontaneamente, ou sacrificados, foram examinados, exaustivamente, através de impressão de órgãos corados pelo Giemsa e os órgãos foram fixados em formal-

a 10% para exames histopatológico. Ainda foi colhido soro destes animais para estudo imunológico. O morcego positivo foi submetido a exame histopatológico cujos os cortes viscerais foram corados pela hematoxilina — eosina (HE).

RESULTADOS

Nos exames diretos de sangue entre lâmina e lamínula não foram observados hemoflagelados, no entanto o sangue periférico corado dos espécimes M1/73 e M10/73 mostraram raras formas de tripanosomas presentes. De ambos não se conseguiu verificar qualquer outro parasito fosse pelo exame das impressões de órgãos fosse pelo exame histopatológico.

A tentativa de cultivo a partir do sangue do morcego só se verificou da amostra do M10/73, e todos os desenhos em câmara clara, mensurações, documentação fotográfica deste trabalho, foram obtidos a partir desta cêpa.

Os dados referentes às mensurações acham-se resumidos nas tabelas I e II respectivamente para as formas epimastigota e tripomastigota.

Os índices nucleares dos tripomastigota encontrados em meios de cultura, demonstraram em suma, uma relação muito pequena — 0,7.

Quanto à morfologia dos parasitos em meio de cultura é bastante variada. Um grande número de epimastigota apresenta extremidade posterior arredondada enquanto que outras, esta extremidade se afila gradativamente. O

cinetoplasto, às vezes ovóide ou em forma de bastonete, é sempre acolado ao núcleo. As formas tripomastigota apresentam o cinetoplasto na maioria das vezes oval, grande, situado relativamente, longe da extremidade. O núcleo mais próximo da extremidade posterior é comprido e estreito. A membrana ondulante é pouco pregueada e o flagelo curto. (Estampa I).

A forma sanguícola é muito parecida com a forma encontrada no meio de cultura. Em virtude da escassez de tripanosoma no sangue periférico não foi possível estudar adequadamente e comparativamente as duas formas. Fig. 9 (Estampa II).

Quanto à sua viabilidade em cultura, observamo-la em diversos meios e verificamos os seguintes resultados:

1) Meio de Ducrey — apesar do parasito ter sido isolado neste meio, o crescimento foi aparentemente escasso o que nos levou a experimentar outros meios.

2) Meio do carvão de sangue humano — (em manga de diálise) — neste meio, no primeiro inóculo houve abundante crescimento, decrescendo no segundo repique, até não obtermos mais desenvolvimento, no 3.º repique.

3) Meio de Lit — Foi nulo o crescimento neste meio.

4) Meio Mc-Connell F. — Foi o meio em que melhor se adaptou o parasito, no qual conservamos a cêpa atualmente.

5) Meio N.N.N. — neste meio o crescimento foi relativamente pouco.

6) Nos meios de Roitman e Warren não houve crescimento.

(*) Trabalho sobre Ecto e Endo parasitos de morcegos publicado esparsamente pelos pesquisadores do IPT-UFGo.

TABELA I

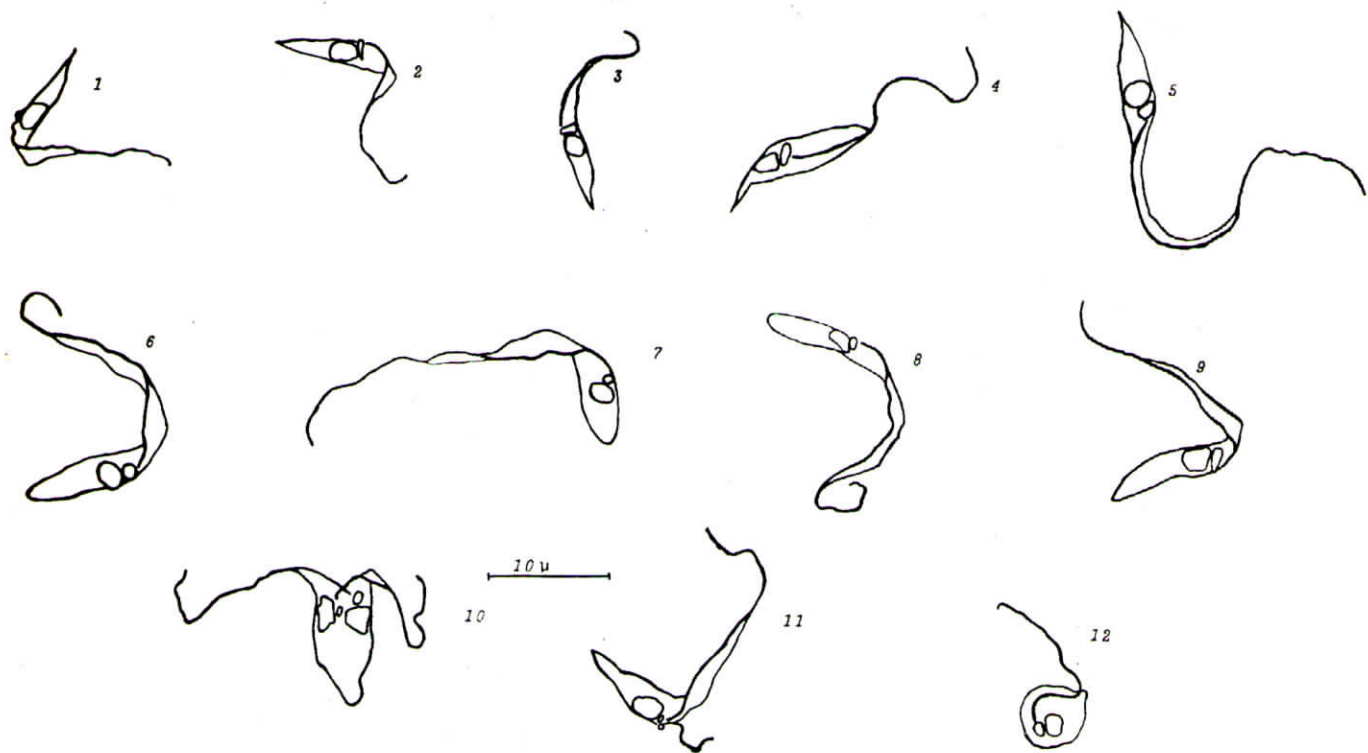
MICROMETRIA DE FORMAS TRIPOMASTIGOTA DO *TRYPANOSOMA* "HASTATUS" EM MEIO DE CULTURA, DESENHADAS EM CÂMARA CLARA E MEDIDOS APÓS COLORAÇÃO PELO GIEMSA DE 52 ESPECIMES

Elementos		(Micra)		
		Méd.	Máx.	Mín.
Corpo	comprimento	18,0	28,0	12,8
	largura	2,1	2,8	1,5
	comp. total	23,4	31,9	18,6
Núcleo	comprimento	3,1	4,2	1,9
	largura	1,4	1,9	1,1
Meio do núcleo à extremidade posterior (NP)		7,4	14,2	5,3
Meio do núcleo à extremidade anterior (NA)		10,4	18,8	4,6
Índice nuclear (NP/NA)		0,7	1,3	0,4
Cinetoplasto, diâmetro		1,1	1,7	0,5
Cinetoplasto à extremidade posterior		3,8	6,9	1,9
Flagelo livre		5,4	10,9	2,1

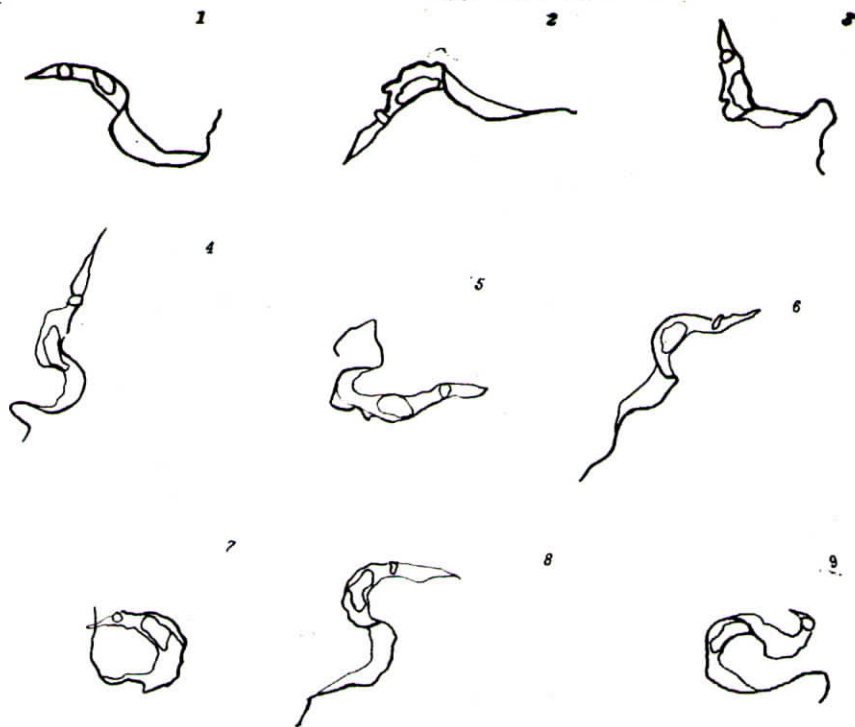
TABELA II

MICROMETRIA DE FORMAS EPIMASTIGOTA DO *TRYPANOSOMA* "HASTATUS" EM MEIO DE CULTURA, DESENHADAS EM CÂMARA CLARA E MEDIDOS APÓS COLORAÇÃO PELO GIEMSA DE 33 ESPECIMES

Elementos		(Micra)		
		Méd.	Máx.	Mín.
Corpo	comprimento	19,9	71,0	32,5
	largura	2,4	4,2	1,5
	comp. total	29,4	109,5	48,0
Núcleo	comprimento	2,4	3,6	1,5
	largura	1,8	2,3	1,3
Meio do núcleo à extremidade posterior (NP)		6,3	25,0	4,2
Meio do núcleo à extremidade anterior (NA)		13,5	20,0	6,9
Índice nuclear (NP/NA)		0,4	0,8	0,2
Cinetoplasto, diâmetro		1,5	5,5	0,7
Cinetoplasto à extremidade posterior		7,5	11,3	5,0
Flagelo livre		9,5	17,5	2,6



ESTAMPA I — Figs. 1 a 5 — Formas epimastigotas do *P. hastatus*, encontradas em meio de Mac Connell, com extremidades afiladas, cinetoplastos ovoides ou bastonetoides; Figs. 6 a 9 — formas de extremidades rombas e Figs. 10 e 11 — formas em divisão. Fig. 12 — Forma esferomastigota.



ESTAMPA II — Figs. 1 a 8 — Formas tripomastigotas em meio de cultura. Observe o grande tamanho e índice nuclear pequeno — cinetoplasto ovoide ou bastoneteoide, subterminal. Fig. 9 — Forma sanguícola do parasita.

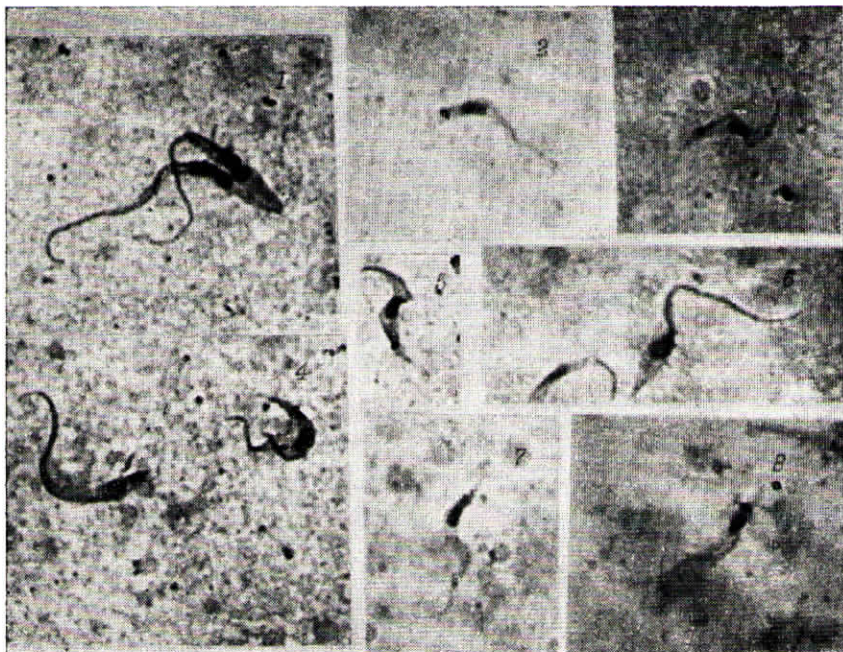


FIGURA 1 — Formas epimastigotas e tripomastigotas de *P. hastatus*. Observar a grande semelhança com o *T. cruzi*, principalmente em 5.

Por simples observação chegamos à conclusão de que o crescimento máximo dava-se no 13.º dia, motivo pelo qual os repiques foram feitos de 15 em 15 dias.

Das formas encontradas no meio de Mc-Connell. F. fizemos diversos esfregaços que após hidrólise ácida eram corados pelo Giemsa. Foram destas lâminas que obtivemos os desenhos em câmara clara que se acham nas estampas I e II.

Infecividade para animais de laboratório:

1.º Grupo — Utilizamos um lote contendo 10 camundongos e inoculamos 0,2 ml de meio de cultura contendo 2.000 tripomastigota por mm³. Fez-se o exame a fresco a partir do segundo dia de inoculação e continuamos com o intervalo de dois dias a examiná-los por um período de vinte dias. A partir daí os exames foram feitos semanalmente. Durante este tempo 4 camundongos morreram não tendo sido determinado a causa de suas mortes. Este lote mostrou-se negativo até o 63.º dia, tanto em exames a fresco, impressões de órgãos e cortes histológicos.

2.º Grupo — Inoculamos 5 camundongos com 0,3 ml de meio contendo 3.300.000 tripanosomatídeos. Quatro mostraram-se negativos pelo exame a fresco durante 30 dias. Um camundongo morreu espontaneamente sem apurarmos a causa. Dois outros foram sacrificados no 9.º dia para obtenção de cortes histológicos e soro.

3.º Grupo — Um lote contendo 3 ratos brancos recém-nasci-

dos foi inoculado permanecendo negativo aos exames a fresco.

Xeno-artificial: — Este exame foi feito de maneira muito precária, com culturas muito pobres, não tendo valor absoluto: Foi realizado com 6 ninfas de *Triatoma infestans*. Os exames de fezes a partir do 1.º dia mostraram-se negativos. Com 68 dias fez-se a dissecação também negativa.

COMENTÁRIOS

Neste trabalho preliminar, sobre *Schizotrypanum* de *Phyllostomus hastatus* pudemos verificar, apenas, que o parasito deve corresponder à mesma espécie já observada no Brasil^{1,2,3,5,6}. O comportamento biológico, ainda que mal estudado por nós, bem como os dados morfológicos são sugestivos de que o parasito se distancia pouco do *T. cruzi*. São pontos relevantes, a nosso ver, a este respeito — a reiterada incapacidade da cêpa de infectar os animais de laboratório em que foram inoculados: camundongos e ratos e o seu comportamento em cultura, deixando de crescer, ou crescendo mal, em meios, nos quais o *T. cruzi* se desenvolve intensamente.

Embora o número de experimentos realizados com a cêpa, que isolamos, tenha sido pequeno e não tenhamos conseguido obter formas sanguíneas pela inoculação de sangue dos morcegos naturalmente infectados, em outros animais, ou por inoculação de culturas nos 3 lotes de respectivamente de 10, 5 e 3 animais — estes dados negativos, confirmam, até certo ponto, os achados de

Dias, 1936 que em 99 experimentos de inoculação obteve apenas 1 infecção em 1 camundongo, obtido através de inoculação de fezes de triatomíneo infectado com xeno-artificial, e é um dado a favor de se tratar da mesma espécie de *Schizotrypanum* de *P. hastatus* estudado por ele.

A espécie estudada por Dias, se caracterizava pelos seguintes dados: tratava-se de *Schizotrypanum* de comprimento médio, em torno de 20 micra, apresentando o maior tamanho entre os tripanosomas do mesmo grupo, o índice nuclear pequeno, o menor dentre as espécies do grupo; infectavam muito dificilmente os animais de laboratório, ou só excepcionalmente², (observar que as amostras que o faziam após a primeira passagem, continuavam transmitindo-se a todos os outros animais em passagens posteriores); mantinham um desenvolvimento inconstante e transitório nos triatomíneos, não obstante poder, algumas vezes, ser duradouro; apresentavam forma de desenvolvimento nos tecidos, com ninhos de leishmanias, observados, frequentemente, no estômago, intestino (camada muscular) no pulmão ou músculo e eram facilmente cultiváveis.

No que diz respeito à posição sistemática, achamos que o assunto não foi ainda adequadamente estudado, e apesar da abalada opinião de Deane¹ que distribue os tripanosomas de morcegos nos seguintes grupos: a) *T. cruzi*, assinalado em morcego das áreas endêmicas, da doença de Chagas, com cerca de 20 micra de comprimento, índice nuclear 1.4 a

1.6, evoluindo bem em “barbeiros” e virulento para animal de laboratório.

b) *T. vespertilionis* — Battaglia, 1904, espécie que seria caracterizada por seu tamanho pequeno, 14 a 16 micra; índice nuclear elevado 3,6 a 2,7; não desenvolvimento ou evolução difícil, nas espécies de triatomíneos que habitualmente veiculam o *T. cruzi*, e sua infectividade muito baixa para os animais de laboratório.

c) formas que não podem ser no momento, incluídas em nenhuma destas categorias e que precisam ser melhor estudadas.

Preferíamos nos colocar, a este respeito, ao lado de Dias, 1940³, que baseando-se no estudo biométrico de vários parasitos do gênero *Schizotrypanum* admite que as três amostras (*cruzi*, *phyllostomus* e *hastatus* diferem morfológicamente de “*Vespertilionis*” “sensu strictu” pelas suas dimensões maiores, e pela situação do núcleo mais medianamente, e biologicamente por evoluírem “facilmente” em reduvídeos. Além disto, as amostras “*phyllostomus*” e “*cruzi*” são infectantes para diversos animais. A “*hastatus*” que biologicamente é a que mais se distancia da “*vespertilionis*” tem em comum com esta a não transmissibilidade aos animais de experiência, só excepcionalmente conseguida^{2,3,4,5}.

Não obstante as diferenças assinaladas, os 4 tipos de *Schizotrypanum* tem caracteres morfológicos e biológicos comuns, tais como: aspecto geral dos tripanosomas, com bleforoplasto mais ou menos volumoso, subterminal ou termi-

nal; indivisibilidade das formas no sangue, com formas sanguícolas adultas; proliferação nos tecidos sob a forma de leishmania, cultivabilidade "in vitro" e evolução em "posterior station" no transmissor.

Em relação ao encontro de formas "leishmanioides" verificadas em cultura, em nossa observação (Fig. 2) ela coincide com o encontro de Deane¹ em *Trypanosoma* do tipo cruzi isolados de ratos silvestres, em cujas culturas verificou formas "leishmanioides", que segundo o autor, representam "formas precursoras do tripanosoma originadas diretamente de leishmânias por desenvolvimento".



FIGURA 2 — Formas em culturas, interpretadas como leishmanioides.

Em último lugar queremos acentuar, como de grande interesse, o fato de termos isolado um "*Schizotrypanum*" não patogênico para mamífero, que mantemos, com bastante facilidade, em cultivo, obtendo grande massa de parasitos e cuja correlação filogenética, tão próxima à espécie *cruzi* nos propicia uma

oportunidade ímpar para investigação de natureza imunológica, em relação à doença de Chagas que acreditamos, teoricamente, muito promissora.

SUMMARY

PREVIOUS NOTE ON TRYPANOSOMA TYPE *hastatus* ISOLATED FROM *P. HASTATUS HASTATUS* OF THE FERCAL CAVE - BRASÍLIA - BRAZIL

Trypanosomes were isolated from the bat *Phyllostomus hastatus hastatus* of the Fercal Cave situated near Brasília. These flagellates were identified with those previously found in Brasil (Goiás, 1933; Minas Gerais, 1934-1935; Mato Grosso, 1940; Caxias, R.J., 1940) in these chiroptera.

The biomorphologic studies were carried out in culture materials and pertinent documentation is included in this paper.

REFERENCES

1. 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.
2. DIAS, E. — Revisão geral dos hemoflagelados de Chirópteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum cruzi*. Identidade com *Schizotrypanum cruzi*. O grupo *Vespertilionis*. 9ª. Reun. Soc. Arg. Pat. Ieg. Norte. 1: 10-88, 1935.
3. DIAS, E. — Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 35: 399-311, 1940.
4. DIAS, E.; MELLO, G.B.; COSTA, O.; DAMASCENO, R. & AZEVEDO, M. — Investigação sobre esquistotripanose de morcegos no Estado do Pará. Encontro do barbeiro. "Cavernícola Pilosa" como transmissor. *Rev. Brasil. Biol.* 2: 102-110, 1942.
5. DIAS, E. & ROMANA, C. — Algumas investigações sobre *Schizotrypanum* de Quirópteros. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 34: 619-625, 1939.
6. PIFANO, F. & DIAS, E. — Investigação sobre o *Schizotrypanum* do morcego "*Phyllostomus hastatus*". *Rev. Brasil. Biol.* 2: 99-102, 1942.