

PESQUISAS SOBRE TRYPANOSOMAS

I. *Trypanosoma butantanense*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* WAGLER, 1824

POR

J. B. ARANTES E FLAVIO DA FONSECA

Entre muitas dezenas de exemplares de *Ophis merremii* Wagler, 1824, de proveniencia diversa, cujo sangue peripherico foi examinado, tivemos oportunidade de encontrar em alguns duas especies diversas de *Trypanosoma*.

Uma das especies, *Trypanosoma merremii*, constitue objecto de uma outra nota. No presente trabalho occupar-nos-emos do *Trypanosoma butantanense*, sp. n., o qual foi objecto de estudo mais acurado, aliás ainda em andamento.

Trypanosoma butantanense, encontrado por 4 vezes em infecção natural e pura, differe totalmente da outra especie de *Trypanosoma* que ocorre em *Ophis merremii*, pois trata-se aqui de uma especie menor, dotada de grande polymorphismo, multiplicando-se activamente no sangue peripherico, onde é encontrado em grande abundancia em infecção natural e em numero ainda maior em certos casos de infecção experimental, onde o seu numero chega a ser superior ao de globulos vermelhos (Est. II, fig. 18, photographia de preparado obtido de serpente viva), divergindo ainda pela enorme mobilidade de que é dotado. Esses caracteres differenciaes, alem de outros de menor importancia, bem como o facto de serem os dois *Trypanosomas* encontrados em estado de pureza, serviram de base á distincção que estabelecemos, embora occurram na mesma especie de ophidio.

MORPHOLOGIA

EXAME A FRESCO — *Trypanosoma butantanense* apresenta grande mobilidade, quando visto a fresco, sendo mais moveis as formas do typo I. Alem do movimento de propulsão observa-se tambem, nas formas longas, movimento retrogrado, quando encontrado algum obstaculo.

Tambem se observam a fresco formas de reproducção, assistindo-se com frequencia os esforços levados a effeito para terminar a separação dos elementos em phase final de divisão.

EXAME APÓS COLORAÇÃO — O estudo comparado das 4 amostras desta especie de *Trypanosoma*, feito em laminas de sangue obtido, quer dos exemplares naturalmente infectados, quer de outros ophidios inoculados, permite distinguir um certo numero de typos, dos quaes nos occuparemos separadamente.

A distincção destes typos foi baseada apenas em exemplares adultos, i. é, apresentando já a morphologia perfeita dos representantes do genero, não sendo tomada em consideração a morphologia variada de exemplares em phase de divisão ou em phases atrasadas de desenvolvimento, como a phase de crithidia, leptomonas e outras, que tambem são observadas no sangue peripherico de cobras vivas. E' possivel que os tres typos morphologicamente distinctos que descrevemos constituam algumas phases de evolução do typo mais adiantado.

TYPO I
ESTAMPA I

Neste typo foram incluidas as formas aparentemente mais adiantadas, caracterizadas pelo maior comprimento do corpo, que se apresenta naturalmente alongado, perdendo em largura o que ganha em comprimento, com nucleo pequeno muito mais proximo da extremidade anterior do que da posterior, cinetoplasta muito volumoso, occupando toda a largura do *Trypanosoma* e tambem muito afastado da extremidade posterior; a porção posterior ao cinetoplasta apresenta-se espiralada. O corpo apresenta numerosas granulações azuladas em toda a porção situada adiante do cinetoplasta. A coloração é violeta pallida. O nucleo é avermelhado e o cinetoplasta vermelho carregado. A membrana nitida, muito estreita, e pouco sinuosa acompanha um dos bordos do corpo desde o cinetoplasta até a extremidade anterior (fig. 1).

Foram medidos 3 exemplares:

		DIMENSÕES		
		Media	Maxima	Minima
Comprimento total excluido o flagello		45,9	48,5	44,6
Largura ao nivel do nucleo		2,4	2,6	2,1
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior		17,5	17,5	17,5
Nucleo	{ Comprimento	2,4	2,6	2,1
	{ Largura	1,0	1,0	1,0
Cinetoplasta	{ Comprimento	1,3	1,3	1,3
	{ Largura	0,4	0,4	0,4
Flagello livre.		8,1	8,75	7,0

TYPO II

A este typo correspondem os exemplares adultos de tamanho medio, differindo dos do typo I não só por esse caracter, como tambem pela largura maior do corpo ao nivel do nucleo, pelo menor comprimento relativo da zona posterior ao cinetoplasta, que é espiralada, presença de grande numero de granulações nessa porção do corpo, menor comprimento do flagello livre e dimensões relativamente maiores do cinetoplasta, maior largura do nucleo e situação mais central do nucleo em relação ao comprimento do flagellado (Fig. 2).

DIMENSÕES

As medidas de 3 exemplares deram os seguintes resultados:

	<i>Media</i>	<i>Maxima</i>	<i>Minima</i>
Comprimento total excluido o flagello	21,9	23,1	20,5
Largura ao nivel do nucleo	2,6	2,6	2,6
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior	7,8	8,7	7,0
Nucleo { Comprimento	2,6	2,6	2,6
{ Largura	1,7	1,7	1,7
Cinetoplasta { Comprimento	1,3	1,3	1,3
{ Largura	0,4	0,4	0,4
Flagello livre.	6,6	7,8	5,2

TYPO III

O typo que nos occupa é representado por exemplares ainda menores do que os precedentes e, proporcionalmente ao tamanho, ainda mais largos. Um dos aspectos mais característicos desse typo é a proximidade do cinetoplasta do nucleo. As dimensões do nucleo e do cinetoplasta não variando sensivelmente nos diferentes typos, succede que tambem aqui, em relação ás dimensões do corpo, se apresentam estes elementos maiores. Tambem o flagello é longo, relativamente ás dimensões do *Trypanosoma*. O protoplasma parece ser mais pobre em granulações do que o das formas restantes.

O protoplasma cora-se em violeta mais pallido do que os do typo I e o nucleo em tom vermelho habitual, sendo o cinetoplasta vermelho mais vivo (Fig. 3).

DIMENSÕES

	Media	Maxima	Minima	
Comprimento total excluido o flagello	13,7	15,2	12,6	
Largura ao nivel do nucleo	2,2	2,6	2,1	
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior	3,7	4,3	3,5	
Nucleo {	Comprimento	2,1	2,1	2,1
	Largura	1,8	2,1	1,7
Cinetoplasta {	Comprimento	1,3	1,3	1,3
	Largura	0,4	0,4	0,4
Flagello livre.	6,4	7,0	6,1	

Formas de reproducção

No *Trypanosoma butantanense* uma das verificações mais interessantes é o numero extraordinario das formas de reproducção que occorrem no sangue peripherico. Assumem estas formas os aspectos mais variados, indo desde a forma arredondada da *Leishmania* (Fig. 4), até a forma perfeita do *Trypanosoma*, passando pelas formas intermediarias de *Leptomonas* e *Crithidia* (Figs. 5 e 6). A impressão que se tem á primeira vista é a de estar examinando uma cultura e não uma lamina de sangue. Chamamos muito a attenção para o facto de tratar-se de sangue retirado de serpentes vivas e não (como se poderia suppor, devido á apparição de formas de *Leishmania*, *Leptomonas* e *Crithidia*) de sangue retirado para exame após a morte do animal, quando o trypanosoma se comportaria como meio de cultura artificial, apresentando então as formas denunciadoras de sua derivação phylogenetica.

A reproducção no sangue peripherico effectua-se quasi sempre pela forma binaria, predominando, porém, as formas anômalas, nas quaes os resultantes de divisão são desiguaes (Figs. 7 e 8). Por excepção, divisão multipla em tres e quatro, neste caso divisão multipla do cinetoplasta ou do nucleo em primeiro lugar e posteriormente separação do protoplasma (Figs. 9 e 10).

Alem desta frequente anomalia, observa-se tambem o facto, em contradicção com a morphologia geral dos Trypanosomas, de preceder muitas vezes a divisão do nucleo á do cinetoplasta, vendo-se frequentemente o nucleo perfeitamente dividido e já afastados os dois nucleos filhos, ao passo que o cinetoplasta apenas teve sua divisão esboçada (Figs. 11, 12, 13 e 14).

As formas que mais frequentemente são vistas em reproducção são formas cujo cinetoplasta se encontra na mesma altura do nucleo, parecendo formas em transição entre *Crithidia* e *Trypanosoma*. Os resultantes dessa divisão são dois

elementos, um dos quaes é uma *Crithidia*, sendo o outro um *Trypanosoma* (fig. 8).

Seguem-se por ordem de frequencia, entre as formas vistas em divisão, as que se acham em phase de *Crithidia* (fig. 7), vindo depois os verdadeiros *Trypanosomata* (fig. 8) aos quaes se seguem as *Leptomonas* (fig. 6) e finalmente a de *Leishmania* (fig. 5).

Além das citadas, são ainda vistas muitas outras fórmãs, quer representando variantes de um dos typos descriptos, quer fórmãs anomalias que não se enquadram nestes typos (figs. 15-20).

ESTAMPA II

COLORAÇÃO PELO METHODO DE ROSENBUSCH — Pelo methodo de coloração de Rosenbusch, observa-se, nos exemplares dos 3 typos descriptos, que o cinetoplasta apresenta forma mais linear do que a dos preparados corados pelo methodo de Giemsa; o nucleo em repouso tem zona de succo nuclear mais rica e um caryosoma bastante volumoso, central e redondo (figs. 1, 2, 3), sendo frequente ver-se um vacuolo na metade posterior do parasita.

As figuras 4, 5, 6 e 7 representam, respectivamente, formas de leishmania, leptomonas e crithidia.

As figuras 8 e 9 mostram formas de divisão dando resultantes de tamanho desigual, sendo que na fig. 8 está representada uma phase mais atrasada de divisão, na qual os dois caryosomas filhos ainda se apresentam ligados pela centrodesmose e a fig. 9 uma phase terminal do processo.

O facto, assignalado paginas atrás, de terminar-se a divisão nuclear antes da do cinetoplasta, é confirmado tambem pelo exame de preparados corados pela hematoxylina, como se verifica nas figs. 10, 11, 12.

Foi-nos igualmente dado observar, em preparados fixados a humido, formas de reproducção em que um dos resultantes é um trypanosoma, ao passo que o outro está ainda em phase de crithidia (figs. 9, 13, 14).

As figs. 15, 16, 17 representam fórmãs anomalias coradas pelo methodo de Rosenbusch.

BIOLOGIA

Inoculações experimentaes

Trypanosoma butantanense é facilmente inoculavel, tendo sido obtidos inoculações positivas, quer com sangue, quer com culturas nas seguintes especies de ophidios: *Ophis merremii*, *Drymobius bifossatus*, *Spilotes pullatus*, *Leimadophis poecilogyrus*, *Chlorosoma schottii* e *Pseudoboa trigemina* entre as não venenosas e *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox* e *Bothrops alternata* entre as venenosas. Mostraram-se refractarias: *Constrictor constrictor* e *Epicrates cenchria*. Chiro-

ninus carinatus foi inoculada uma só vez, não tendo sido obtida infecção, nada se podendo concluir, porque também em *Ophis merremii*, embora excepcionalmente, falhou a inoculação. *Crotalus terrificus* foi inoculado varias vezes, como, porém, morre em poucos dias, quando manipulado com frequencia, nada se pode concluir quanto á sua sensibilidade á infecção experimental.

Alem de ophidios, foi também obtida a inoculação em um batrachio, *Bufo paracnemis* Lutz. De 5 exemplares, inoculados com sangue de *Ophis merremii* infectada, um apresentou infecção. Em 2 exemplares de *Bufo marinus* não foi obtida infecção.

As cobras infectadas pareceram soffrer pouco com o parasitismo, tendo-se a impressão de que a virulencia é diminuta, pois as cobras duram ainda muito tempo, apesar do numero colossal, muitas vezes, de *Trypanosomata* presentes na circulação.

Cultura artificial

Foram obtidos, aliás com certa difficuldade inicial, culturas em meio de NNN, preparado com sangue de coelho e com sangue de cobra, attribuindo-se a contaminação, tão frequentemente observada, a uma possivel bacteriemia das cobras conservadas em captiveiro em condições precarias de saúde.

Uma vez obtidas, as culturas se desenvolveram em geral com exuberancia, casos havendo, porém, de mau desenvolvimento.

As culturas persistem vivas durante quasi todo o tempo em que existe agua de condensação no meio.

Continuamos a manter *I. butantanense* no laboratorio, por meio de inoculações successivas em serpentes e de culturas; estamos tentando ainda sua transmissão por meio do Ixodideo, *Amblyomma dissimile*.

RESUMO

No sangue de exemplares, naturalmente infectados, de Boipeva (*Ophis merremii* Wagler, 1824) foi encontrado um trypanosoma que, por seus caracteres morphologicos e propriedades biologicas, representa uma nova especie a ser chamada de *Trypanosoma butantanense*, n. sp.. Na phase adulta, este trypanosoma apresenta 3 typos differentes de morphologia; reproduz-se activamente no sangue de serpentes natural ou experimentalmente infectadas, apresentando então todas as phases conhecidas do cyclo evolutivo dos trypanosomas; infecta facilmente varias especies de ophidios que, todavia, não parecem ser por elle molestadas; finalmente, mostrou-se cultivavel no meio NNN, no qual sobreviveu emquanto havia presença de agua de condensação.

ABSTRACT

Trypanosoma butantanense, n. sp. has been found in naturally infested specimens of the Boipeva snake (*Ophis merremii* Wagler, 1824) and differs from *T. boipevae* (described elsewhere in this issue) by its small size, type of motility, polymorphism, heavier infestation (Pl. II, fig. 18), besides other morphological and physiological peculiarities.

Comparison of specimens in adult stage (*Trypanosoma*-form) discloses 3 different types: Type I bears a body larger and proportionately narrower, with a small nucleus, lying nearer the anterior end, a voluminous kinetoplasta at a great distance from the posterior extremity; the body is spiral-like behind the kinetoplasta; protoplasm granulous, pale violet. Nucleus red and kinetoplasta deeply red. Undulating membrane narrow with little pronounced sinuosities, well visible (Pl. I, fig. 1). In type II the total length is decreased and the width increased; the length of the body behind the kinetoplasta is smaller and this portion is not spiral-like as in type I; the kinetoplasta is relatively larger; the nucleus is wider and occupies a more central position; the flagellum is shorter (fig. 2). In type III the body is still shorter and wider than in type II and kinetoplasta lies at a shorter distance from the nucleus. In comparison with the length the nucleus and the kinetoplasta are of larger size (fig. 3).

Reproduction takes place very actively in the blood of the naturally or experimentally infected snakes, a feature which is characteristic of this new species. The forms found in the blood of living snakes represent all stages known in the life-cycle of Trypanosomata: *Leishmania* — (fig. 4), *Leptomonas*, *Crithidia* — (figs. 5 and 6) and *Trypanosoma*-form, so as to appear as a real artificial culture of the parasite rather than anything else. It must be emphasized that this aspect was seen in living snakes; therefore, it has nothing in common with a simple culture that may occur in the blood of dead animals.

Reproduction is almost always binary and the resulting individuals are unequal (figs. 7 and 8). Exceptionally multiple division may be seen (figs. 9-10). Division of the nucleus may precede that of the kinetoplasta (figs. 11, 12, 13, 14), a fact that is also seen in blood-films stained by hematoxylin (figs. 10, 11, 12). The most frequent reproduction form bears the kinetoplasta at the level of the nucleus and seems to be an intermediate form between *Crithidia* and *Trypanosoma*, a *Crithidia* and a *Trypanosoma* (figs. 8, 9, 13, 14) resulting from the same division. Anomalous forms are seen in Pl. I, figs. 15-20 and Pl. II, figs. 15-17.

Trypanosoma butantanense in both blood and cultures is readily inoculable to other species of snakes, the following species having been found to be susceptible: *Ophis merremii*, *Drymobius bifossatus*, *Spilotes pullatus*, *Leima-*

dophis poecilogyrus, *Chlorosoma schottii*, *Pseudoboa trigemina*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox* and *Bothrops alternata*. In *Constrictor constrictor*, *Epicrates cenchria*, *Chironius carinatus* and *Crotalus terrificus* the experimental infection was unsuccessful.

One toad out of five (*Bufo paracnemis*) also became infected but in *Bufo marinus* it was not possible to obtain infection.

The infected snakes seemed to live about as long as those used as controls.

Culture was easily obtained in NNN medium (with rabbit's or snake's blood), and remained alive so long as condensation water was present in the medium.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).