

FORMAS DE CULTURA DE *TRYPANOSOMA* *ROTATORIUM* MAYER, 1843 — ISOLADO DA RÃ *LEPTODACTYLUS* OCELLATUS DO BRASIL¹

NEIZE M. PEREIRA *, SYLVIO CELSO G. COSTA **,
TANIA COLOMBO * e JOSÉ MARCOS DE C. TRAVASSOS ***

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara
(Com 11 figuras)

SUMÁRIO: Os autores estudaram o comportamento "in vitro" do *Trypanosoma* encontrado nas rãs brasileiras, visando critérios adicionais na caracterização específica deste grupo. Utilizaram diferentes meios de cultura (NNN, Novy e Mac Neal, SNB 9 de Diamond 1954, Boné & Steinert, 1956 Boné & Parent 1963 e Halevy & Gisry 1964) no isolamento do *Trypanosoma rotatorium* encontrado com certa freqüência na rã *Leptodactylus* com larga distribuição na região Neotropical. Observamos que o comportamento do *T. rotatorium* das rãs desta região em meios de cultura mostra características bem diferentes daquelas observadas com tripanosomas de outras regiões, quer seja pela dificuldade de manutenção em subcultura, quer pelas formas de divisão desenvolvidas. Empregamos os mesmos meios de cultura utilizados nos isolamentos dos tripanosomas de rã da Europa e como pode ser visto no Quadro I os resultados obtidos com material da região Neotropical são concordantes, sugerindo, pelo menos, uma variação dentro da espécie.

A cultura do *Trypanosoma rotatorium* tem sido referida por muitos autores, porém o isolamento e a manutenção deste tripanosoma em subcultura foi bem sucedida apenas com material de rãs européias (3, 23, 9, 17, 7) e mexicanas (26). Existem muitas referências com relação à manutenção entre lâmina e lamínula, que serviram de base para o estudo "in vitro" deste tripanosoma em alguns hospedeiros. Os autores que estudaram o *Trypanosoma*

rotatorium em rãs da América do Sul, como SCORZA (29) na Venezuela, VUCETICH (30) na Argentina e MACHADO (22) no Brasil, isolaram-no mas não conseguiram mantê-lo em cultura. Esse diferente comportamento talvez esteja relacionado a diferenças específicas, que constituem assunto muito discutido. VUCETICH, (30) através de estudos morfológicos comparativos e inoculações experimentais de tripanosomas em diferentes rãs argentinas, defende o

¹ Recebido para publicação em 29 de junho de 1973.

Trabalho do Laboratório de Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

* Bolsistas do Conselho Nacional de Pesquisas.

** Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz e CNPq.

*** Bolsista da Fundação Instituto Oswaldo Cruz.

Departamento de Zoologia; Laboratório de Protozoologia, C.P. 926; Rio de Janeiro, Brasil.

ponto de vista de que as diferentes espécies de *Trypanosoma* de rãs americanas seriam formas ou variedades de *T. rotatorium* e apresenta vasta sinonímia para este protozoário, colocando também em sinonímia a espécie *T. leptodactyli* descrita por CARINI (5).

NÖLLER, (24) defendia a validade de duas espécies de tripanosomas de rãs: *T. rotatorium* Mayer 1843 e *T. inopinatum*, 1904. Este ponto de vista é defendido por WENYON (32) e KUDO, (19) havendo autores, entretanto, como PEREZ REYES (27) e DIAMOND (13) que defendem a pluralidade das espécies de *Trypanosoma* de anfíbios. É interessante notar que na maioria dos casos, os ciclos evolutivos das diferentes espécies descritas não são conhecidos e os critérios específicos principais utilizados foram características morfológicas, muitas vezes pouco marcantes, bem como o tipo de hospedeiro.

T. rotatorium no Brasil foi encontrado em rãs *Leptodactylus ocellatus* por CARINI (5), (*T. leptodactyli*), MACHADO (22), PESSOA (28) e COSTA E SILVA (8). As diferenças de comportamento em cultura, bem como os meios utilizados são apresentados no Quadro I, onde são assinalados também casos de simples manutenção entre lâmina e lamínula que muitas vezes são citados como referências de "isolamento".

Conforme salienta VUCETICH (30), o critério exclusivamente morfológico seguido para o estabelecimento de novas espécies é insuficiente. Numa tentativa de contribuir para o esclarecimento deste problema, desenvolvemos um programa de trabalho visando o isolamento e a manutenção

em cultura deste protozoário, utilizando os meios de cultura desenvolvidos pelos especialistas que estudaram os tripanosomas de rã fora da América do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

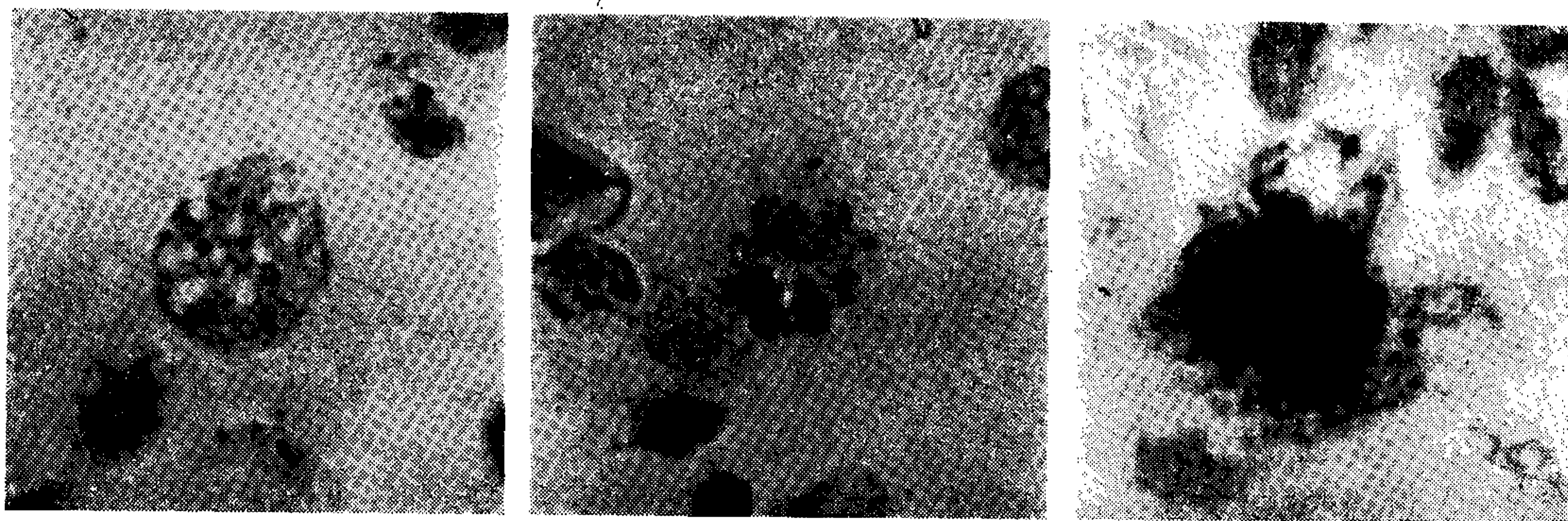
Utilizamos para as inoculações em meio de cultura sangue de 22 rãs *Leptodactylus ocellatus* provenientes de Rio Bonito (Estado do Rio) e Manguinhos (Estado da Guanabara), que se apresentavam parasitadas por *T. rotatorium*. O sangue das rãs era observado a fresco e esfregaços de sangue corados por Giemsa também foram preparados para observação mais detalhada das formas sangüíneas do *Trypanosoma*. Utilizamos, para o isolamento meios difásicos: NNN, de Novy e Mac Neal modificado por Nichole e SNB-9 de Diamond (12) e meios líquidos: meio de Boné e Steinert (1), meio de Boné e Parent (2) e meio de Halevy e Gisry (18). Duas a quatro gotas de sangue retirado do coração da rã eram colocadas diretamente nos tubos de cultura, sendo as primeiras observações realizadas no 2.º, 3.º ou 4.º dias após a inoculação e depois diariamente. Lâminas das culturas foram fixadas em salina tamponada segundo Lehmann, D. L. (21) e coradas com Giemsa. Microfotografias foram feitas com câmara automática Orthomat, Leitz.

RESULTADOS

Numa tentativa de cultura utilizamos primeiramente o meio NNN já empregado para este tripanosoma. Em todas as tentativas neste meio obtivemos resultados negativos. Desejando conservar um meio difásico (WALLACE (31) mostrara a superioridade do meio difásico sobre os meios líquidos para cultura de tripanosomas de rã) resolvemos utilizar o meio SNB-9 de DIAMOND (12). Em 15 tentativas de isolamento neste meio obtivemos resultados positivos 8 vezes, porém, em nenhum dos casos conseguimos manter as culturas por mais

de 15 dias. A utilização do caldo de sangue enriquecido com neopeptona, (WALLACE) ⁽³¹⁾ mostrou resultados negativos. Em 8 tentativas de isolamento com meio Boné e Steinert e Boné e Parent obtivemos resultados positivos duas vezes (meio Boné e Parent) e uma vez (meio Boné e Steinert), porém as culturas não foram mantidas por mais de 8 dias. Nas 5 tentativas de cultivo com o meio de HALEVY e GISRY ⁽¹⁸⁾ utilizado para *T. ranarum* obtivemos resultados negativos. Nossas primeiras observações foram realizadas em culturas de 3 a 4 dias e mesmo nesta fase de desenvolvimento já encontramos os diferentes tipos de formas, que serão es-

tudadas a seguir. Não conseguimos, entretanto, manter as culturas por mais de 15 dias, pois as formas iam diminuindo de número a partir do 6.^o dia de observação. Formas epimastigotas (fig. 2) e promastigotas eram as mais abundantes, sendo geralmente muito móveis; em muitos casos foi possível observá-las em divisão binária. Formas amastigotas de tamanhos diferentes e formas alargadas com citoplasma em divisão originando vários indivíduos flagelados ou não (figs. 1a e 1b) sugerem a realização de reprodução por divisão múltipla neste protozoário, fato já mencionado por MACHADO ⁽²²⁾, em observação feita "in vivo".



1a

1b

1c

Figs. 1a a 1c — *Trypanosoma rotatorium* em cultura; coloração; May Grünwald Giemsa.

Fig. 1a — Somatoplasto muito vacuolizada, com vários cinetoplastos.

Fig. 1b — Forma alargada em divisão originando indivíduos aflagelados.

Fig. 1c — Forma alargada com citoplasma em divisão originando vários indivíduos flagelados.

O aparecimento simultâneo dos diferentes tipos de formas nas culturas torna difícil o estabelecimento de uma seqüência e o relacionamento entre as formas sanguíneas e as derivadas em culturas. A seqüência de formas em divisão binária parece processar-se como indicamos nas figuras 2 a 4). Forma epimastigota (fig. 2)

se dividiria (fig. 3) e posteriormente se alargaria continuando o processo de divisão binária sucessivamente. São bem característicos os septos mostrados na fig. 4.

Muitas vezes formas amastigotas estariam envolvidas no processo de divisão (figs. 5, 6 e 8) bem como formas tripomastigotas (fig. 7).

As formas sanguíneas arredondadas e desprovidas de flagelo poderiam estar envolvidas no processo de divisão múltipla, dando origem às Somatelas contendo inúmeros cinetoplastos em divisão (figs. 1a, 10 e 11).

Os diferentes aspectos do *T. rotatorium* aqui apresentados aliados à não manutenção "in vitro" dos *T. rotatorium* de rãs americanas tanto por nós como por outros autores parecem confirmar, conforme nos referimos no início deste trabalho, o ponto de vista de VUCETICH em relação à diferença específica entre os tripanosomas de rãs americanas e europeias, as quais são mais facilmente isoladas e mantidas in vitro, sendo interessante citar que CORTES* e colaboradores vêm mantendo há 5 anos, em meio difásico, *T. montezumae* da rã mexicana *Rana montezuma*.

DISCUSSÃO

A divisão binária é o processo geral de reprodução referido pelos autores (Quadro I) que observaram a cultura deste tripanosoma. DUTTON, TODD e TOBEY (15), DANILEWSKY (11) FRANÇA e ATHIAS (16) em preparações entre lâmina e lamínula observaram divisão múltipla em que as formas arredondadas se dividem em duas, e estas em quatro e assim por diante até 64 indivíduos (DUTTON e TODD) e 120 (DANILEWSKY). MACHADO (22) considera pela descrição desses autores que o processo descrito não seria divisão múltipla e sim divisão binária rápida acompanhada de fissura do citoplasma. Tanto MACHADO (22) como os demais autores,

somente apresentam desenhos das formas de cultura observadas e, como já nos referimos anteriormente, somente tripanosomas de rãs europeias e mexicanas foram isolados e mantidos em cultura. Em nossas experiências com os meios SNB-9, Boné e Parent e Boné e Steinert isolamos os tripanosomas, porém não conseguimos manter as culturas por mais de 15 dias confirmando os resultados obtidos por MACHADO (22) também com *Trypanosoma rotatorium* de *Leptodactylus ocellatus* do Brasil em meio NNN. Resultados negativos para manutenção em cultura também foram obtidos por VUCETICH (30) e SCORZA (29) com tripanosomas de rãs da Argentina e Venezuela respectivamente. VUCETICH utilizou tripanosoma de rãs *Leptodactylus ocellatus* enquanto SCORZA utilizou *Leptodactylus bolivianus* e *Hyla creptans*. O resultado negativo quanto à manutenção de culturas de rãs sul-americanas talvez seja indicativo de diferenças específicas o que está também de acordo com VUCETICH (30) que defende o ponto de vista de que os tripanosomas de rãs americanas sejam formas ou variedades de *T. rotatorium*. Segundo MACHADO (22), o *Trypanosoma rotatorium* de *Leptodactylus ocellatus* apresenta "in vivo" 4 formas diferentes: grandes formas longas, formas arredondadas, pequenas formas longas e formas largas. Estas formas apresentariam tipos de desenvolvimentos diferentes quer no sangue periférico quer na circulação visceral: as formas largas se reproduziriam por divisão binária e as formas longas alargando-se originariam formas arredondadas que por divisão múltipla originariam pequenas formas redondas, posteriormente transformadas em

* Cortes M. Perez-Reyes R. y Tay J. — Rev. Lat-amer. Microbiol. 14 (3) 183.

pequenas formas longas. Nossos resultados vêm mostrar em cultura alguns dos diferentes aspectos observados "in vivo" por MACHADO (22): — formas largas em divisão binária; formas arredondadas em que somente cinetoplastos estão em divisão (divisão múltipla); alargamento de formas alongadas. As formas arredondadas apresentando vários cinetoplastos, encontradas por MACHADO (22) no sangue da rã, foram por nós observadas em culturas. Estas formas conhecidas pelo nome de Somatelas foram observadas por nós com bastante frequência nas culturas e nunca no sangue

como observou MACHADO. Formas de Somatela também foram descritas no fígado de *Trypanosoma parroti* parasito da rã *Discoglossus pictus* que ocorre na Algéria. Acreditamos que o prosseguimento do estudo deste tripanosoma em cultura, bem como outros aspectos de sua biologia no vetor poderiam esclarecer definitivamente a sistemática do tripanosoma parasito da rã. *L. ocellatus*, para o qual, alguns autores estabeleceram espécies, como *T. ocellati* segundo BRUMPT (4) e *T. leptodactyli* segundo CARINI (5) e outros consideram apenas uma variedade de *T. rotatorium*.

Q U A D R O I

DIFERENTES REFERÊNCIAS AOS TIPOS DE ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE *T. ROTATORIUM* POR DIFERENTES AUTORES

<i>Hospedeiro C/dist. geográfica</i>	<i>Observações in vitro</i>	<i>Autores</i>
—	entre lâmina e lamínula	Danilewsky ** 1885; 1889-1891 (em Machado 1911 e em Wenyon 1965)
—	entre lâmina e lamínula	Chalachnikow ** 1888 (em Wenyon 1965)
<i>Rana esculenta</i> (França ?)	meio Novy Mac Neal * (muitas subculturas)	Bouet 1906
<i>Rana esculenta</i> (França ?)	meio de Novy e Mac Neal * aquecido (amostra de Bouet (1906)	Mathis 1906
<i>Hyla arborea</i> (?)	entre lâmina e lamínula	França e Athias 1907
—	entre lâmina e lamínula	Dutton, Todd e Tobbey 1907
—	entre lâmina e lamínula	Lebedeff 1910 ** (em Wenyon 1965)

Continua

Continuação

—	entre lâmina e lamínula	Dofflein 1910 ** (em Wenyon 1965)
<i>Leptodactylus ocellatus</i> (Brasil)	meio de Novy e Mac Neal (até 15 a 20 dias)	Machado 1911
—	entre lâmina e lamínula	Nöller 1913
Não citado	entre lâmina e lamínula (meio de Ponselle)	Ponselle 1923
Não citado	meios 1, 2, 3 e 6 de Cleveland *	Cleveland e col. 1930
<i>Leptodactylus ocellatus</i> (Argentina)	entre lâmina e lamínula meio NNN (até 15 dias)	Vucetich e cols. 1949
<i>R. Montezuma</i> <i>R. pipiens</i> (México)	entre lâmina e lamínula (até 3 dias somente) meio de Ponselle 1923 (5 repiques)	Pérez Reyes 1960
Não citado (França)	meio BHI * amostra do Instituto Tropical de Anvers	Creemers e col. 1966
<i>Leptodactylus bolivianus</i> <i>Hyla creptans</i> (Venezuela)	entre lâmina e lamínula	Scorza 1968
Não citado (França)	meio de Tobie modificado por Vaucel * (manutenção) meio definido (de Fromentin) só 25 dias (amostra de J. Rodhain isolada em Anvers 1943)	Fromentin H. 1971

* Amostras mantidas normalmente através de subculturas.

** Não conseguimos obter as publicações.

SUMMARY

Culture forms of *T. rotatorium*
Mayer, 1843

Different culture media were employed to isolate *T. rotatorium*, a common parasite in the blood of Brazilian frog *Leptodactylus ocellatus*. Although we have isolated the parasite in three different media (SNB-9, Boné Parent and Boné Steinert media), subcultures were not obtained.

These facts confirm the results also pointed out by Machado 1911 with *T. rotatorium* from hosts collected in the same region. In accordance with the facts observed in the literature (see table I in this work) our

results suggest an important difference between the *T. rotatorium* of neotropical region and that of the other regions, which are easily cultivated in subcultures. The culture forms present some differential aspects in *T. rotatorium* mainly by production of "Somatelas".

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Gilberto de Freitas a oportunidade de discutir alguns de nossos problemas na área dos Tripanosomátídeos.

Agradecemos igualmente à Dr.^a Monica Barth a realização das microfotografias em seu laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BONÉ, G. J. & STEINERT, M., 1956. Isotopes incorporated in nucleic acids *T. mega*. *Nature*, London, 178, 308.
- 2 — BONÉ, G. J. and PARENT, G., 1963. Stearic acid an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. *J. Gen. Microbiol.* 31: 261-266.
- 3 — BOUET, G., 1906. Culture du *Trypanosoma* de la grenouille (*Trypanosoma rotatorium*). *Ann. Inst. Pasteur* XX (1), 564.
- 4 — BRUMPT, E., 1949. *Précis de Parasitologie*, I. Masson et Cie. Ed.. Paris.
- 5 — CARINI, A., 1907. Um novo trypanosoma de rã. *Rev. Med. S. Paulo* 10 (22): 470.
- 6 — CHALACHNIKOV, 1888. Recherches sur les parasites du sang des animaux à sang chaud et à sang froid. Kharkov. (em Wenyon, 1965).
- 7 — CLEVELAND, L. R. and COLLIER, J., 1930. The cultivation of Haemoflagellates in autoclaved media. *Amer. Jour. Hyg.* 12 (3): 614-623.
- 8 — COSTA, S. C. G. & SILVA, A. M., 1969. Hemoparasitos de anfíbios do Brasil: Alguns aspectos citológicos de "*Trypanosoma rotatorium*" Mayer, 1843 (Protozoa, Kinetoplastida) *Atas Soc. Biol. do Rio de Janeiro* 12 (5, 6): 245-246.
- 9 — CREEMERS, J. & JADIN, J. M., 1966. Ultraestrutura et Biologie de *Trypanosoma rotatorium*, Mayer, 1843. *Acta Zool. et Pathol. Anterpiensia.* 41: 119-136.

- 10 — DANILEWSKY, B., 1885. Zur Parasitologie des Blutes. *Biol. Centralbl.* V. 529 (em Wenyon 1965).
- 11 — DANILEWSKY, B., 1889-1891. La parasitologie comparée du sang. I. Nouvelles recherches sur les parasites du sang des visseuse. II. Recherches sur les hematozoaires des tortues. Kharkov. (em Wenyon, 1965).
- 12 — DIAMOND, L. S. and HERMAN, C. M., 1954. Incidence of trypanosomes in the Canada goose as revealed by bone marrow culture. *J. Parasitol.* 40: 195-202.
- 13 — DIAMOND, L. S., 1965. Trypanosomes of Anura. *Wildlife. Dis.* 44: 1-77.
- 14 — DOFFLEIN, F., 1910. Studien zur Naturgeschichte der Protozoen VI. Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Froshes. *Arch. Protist* XIX, 207 (em Wenyon, 1965).
- 15 — DUTTON, J. E., TODD, J. L. and TOBEY, E. N., 1907. Concerning certain parasitic protozoa observed in Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1 (1), 287.
- 16 — FRANÇA, C. and ATHIAS, M., 1907. Recherches sur les trypanosomes des amphibiens II. Le *Trypanosoma rotatorium* de *Hyla arborea*. *Arq. R. Inst. Bact. Camara Pestana* I, 289 (em Wenyon, 1965).
- 17 — FROMENTIN, H., 1971. Contribution à l'étude comparée des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre *Trypanosoma*. Possibilités et limites de la culture a 27° C en milieu semi-synthétique liquide. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 46 (4): 337.
- 18 — HALEVY, S. and GISRY, O., 1964. Lipid composition of *T. rana-rum*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117 (2): 552.
- 19 — KUDO, R. R., 1969. Protozoologia, 905 págs. 388 figs., 1.^a edição espanhola, *Compañia Editorial Continental S. A.*, México.
- 20 — LEBEDEFF, W., 1910, Über *Trypanosoma rotatorium* (Gruby). *Festschr. f. R. Hertwig, Jena* I, 397 (em Wenyon, 1965).
- 21 — LEHMANN, D. L., 1964. A method for the critical staining of culture trypanosomes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58 (4): 366.
- 22 — MACHADO, A., 1911. Pesquisas citológicas sobre o *Trypanosoma rotatorium* Gruby. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3 (1): 108-135.
- 23 — MATHIS, C., 1906. Sur une modification au milieu de Navy-Mac Neal pour la culture des trypanosomes. *C. R. Soc. Biol.* LXI, 550.
- 24 — NÖLLER, W., 1913. Die Blutprotozoen des Wasser frosches und ihre übertragung I. Teil. *Arch. Protist* XXXI, 169.
- 25 — PONSELLE, A., 1923. La culture des trypanosomes et les conditions physico-chimiques qui la déterminent. *Ann. Parasit. Hum. et Comp.* I: 181-189.
- 26 — PÉREZ-REYES, R., 1960. Estudios sobre Hematozoarios X. Algunos *Trypanosomas* de Ranas Mexicanas. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 3 (4): 201-213.
- 27 — PÉREZ-REYES, R., 1968. *Trypanosoma galba* n. sp. parasito de ranas mexicanas. Morfologia y ciclo en el vertebrado. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol.* 10 (2): 79-82.
- 28 — PESSÔA, S. B. & CUNHA NETO, A. G., 1967. Notas sobre hemoparasitas de rãs de Goiânia. *Rev. Goiana Med.* 13: 101-116.
- 29 — SCORZA, J. V. & BOYER, C. D., 1968. Sobre la sinonimia del *Trypa-*

- nosoma rotatorium*. Mayer, 1843. *Bol. Venez. Lab. Clin.* 3 (1-4): 29-36.
- 30 — VUCETICH, M. & GIACOBBE, O., 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. *Ann. Inst. Med. Regional* 2 (3): 225-244.
- 31 — WALLACE, F. G., 1956. Cultivation of *Trypanosoma ranarum* on a liquid medium. *J. Protozool.* 3: 47-49.
- 32 — WENYON, C. M., 1965. *Protozoology*. II. facsimile of 1926 edition. Baillière, Tindall and Cassel Ltd., London.

Figs. 2 a 10 — *T. rotatorium* em cultura; coloração May Grünwald Giemsa.

Fig. 2 — Forma epimastigota mostrando o cinetoplasto em divisão.

Fig. 3 — Forma epimastigota em divisão com alargamento do citoplasma.

Fig. 4 — Forma em divisão com septos bem característicos.

Figs. 5 e 6 — Formas amastigotas em divisão, notando-se nitidamente núcleo e cinetoplasto.

Fig. 6 — Observa-se início de divisão do corpo do parasita e os vacúolos observados parecem resultar da dissolução do núcleo.

Fig. 7 — Forma trypomastigota com núcleo e cinetoplasto em divisão.

Fig. 8 — Formas amastigotas aglomeradas.

Figs. 9, 10 e 11 — Seqüência de desenvolvimento de formas alargadas em divisão. Núcleo e cinetoplasto em início de divisão (fig. 9).

Fig. 10 e 11 — Somatelas, observando-se os inúmeros cinetoplastos espalhados no citoplasma.

Fig. 11 — Notam-se os inúmeros cinetoplastos.

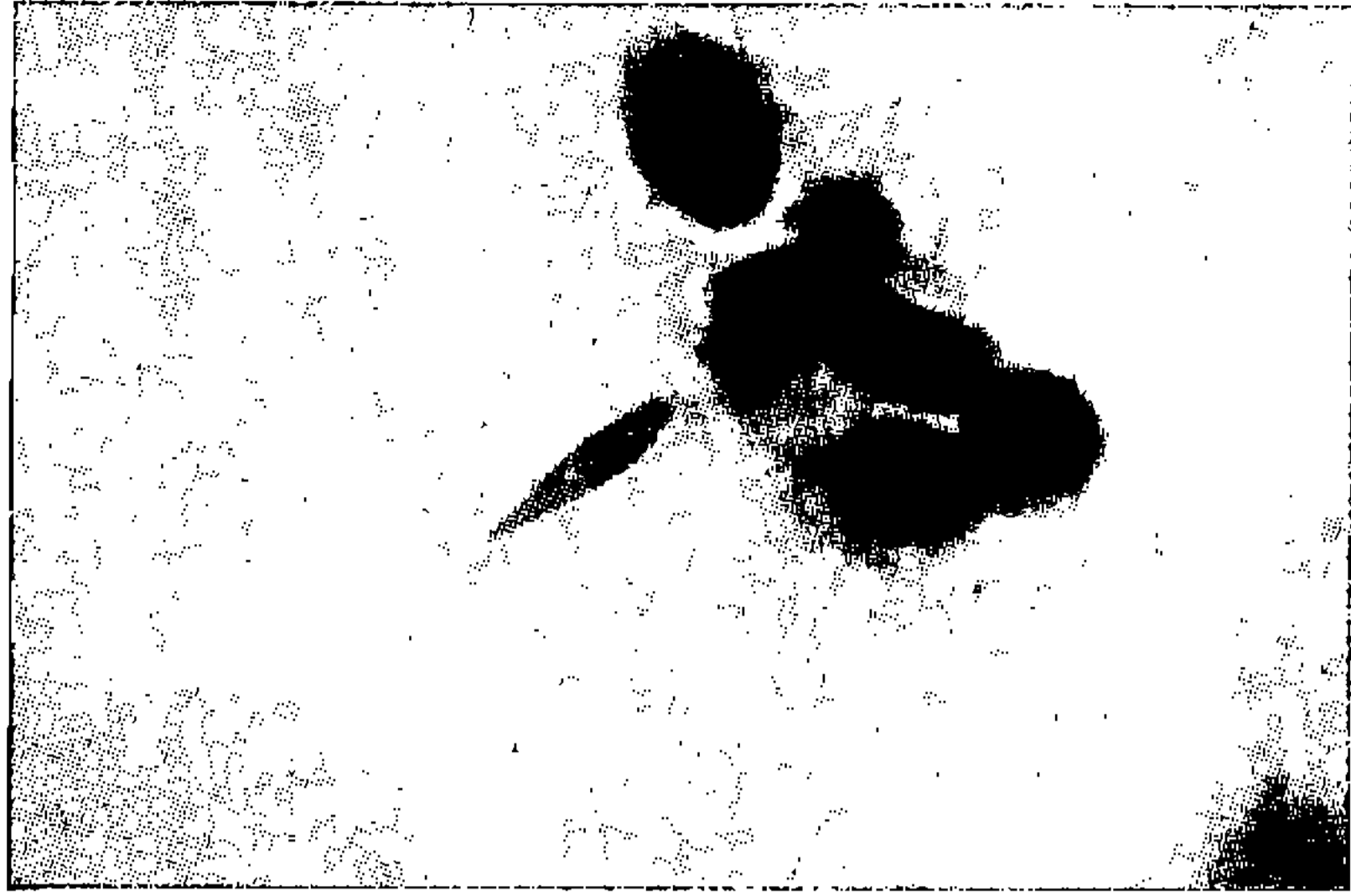


Fig. 2

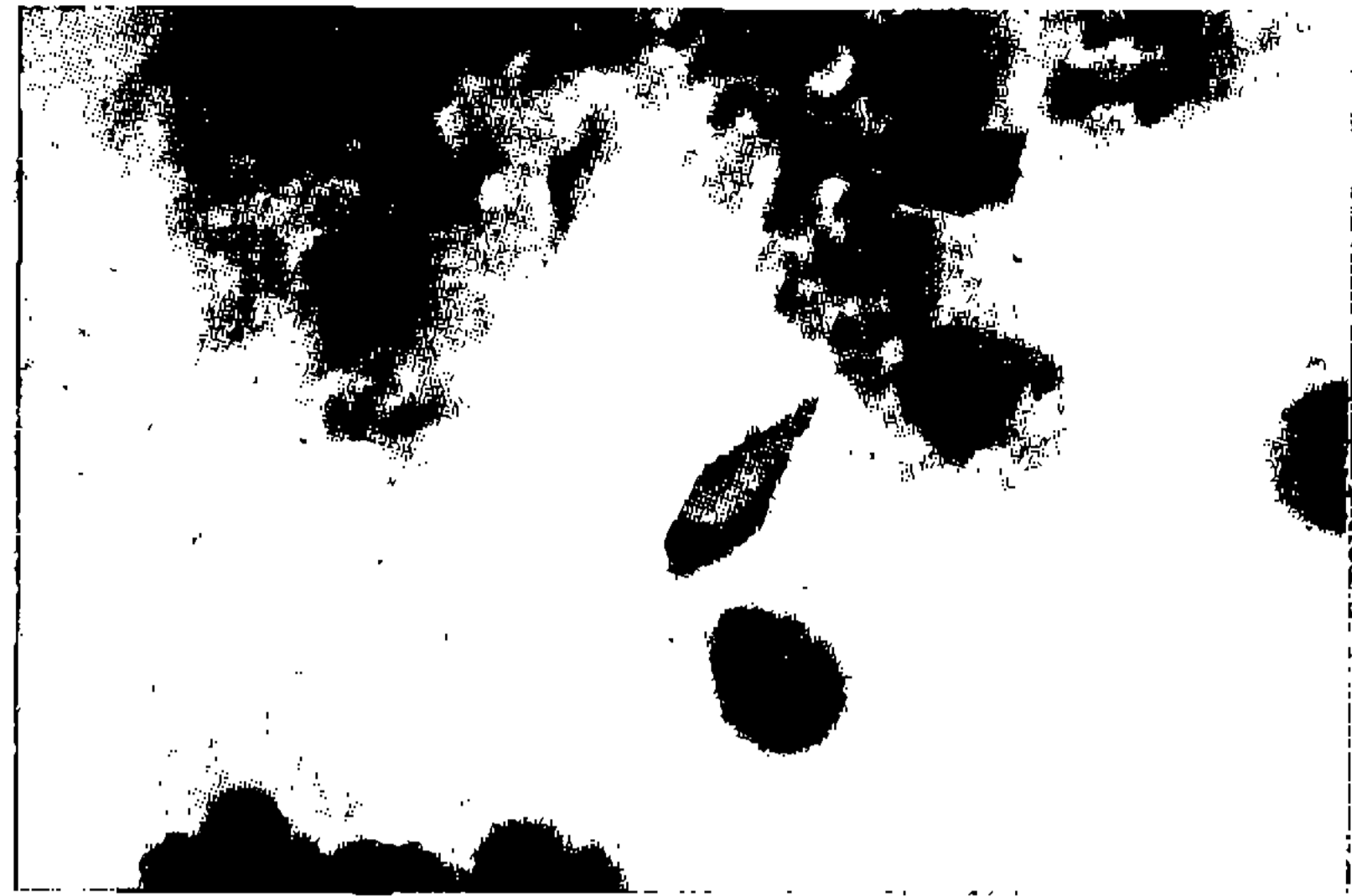


Fig. 3



Fig. 4

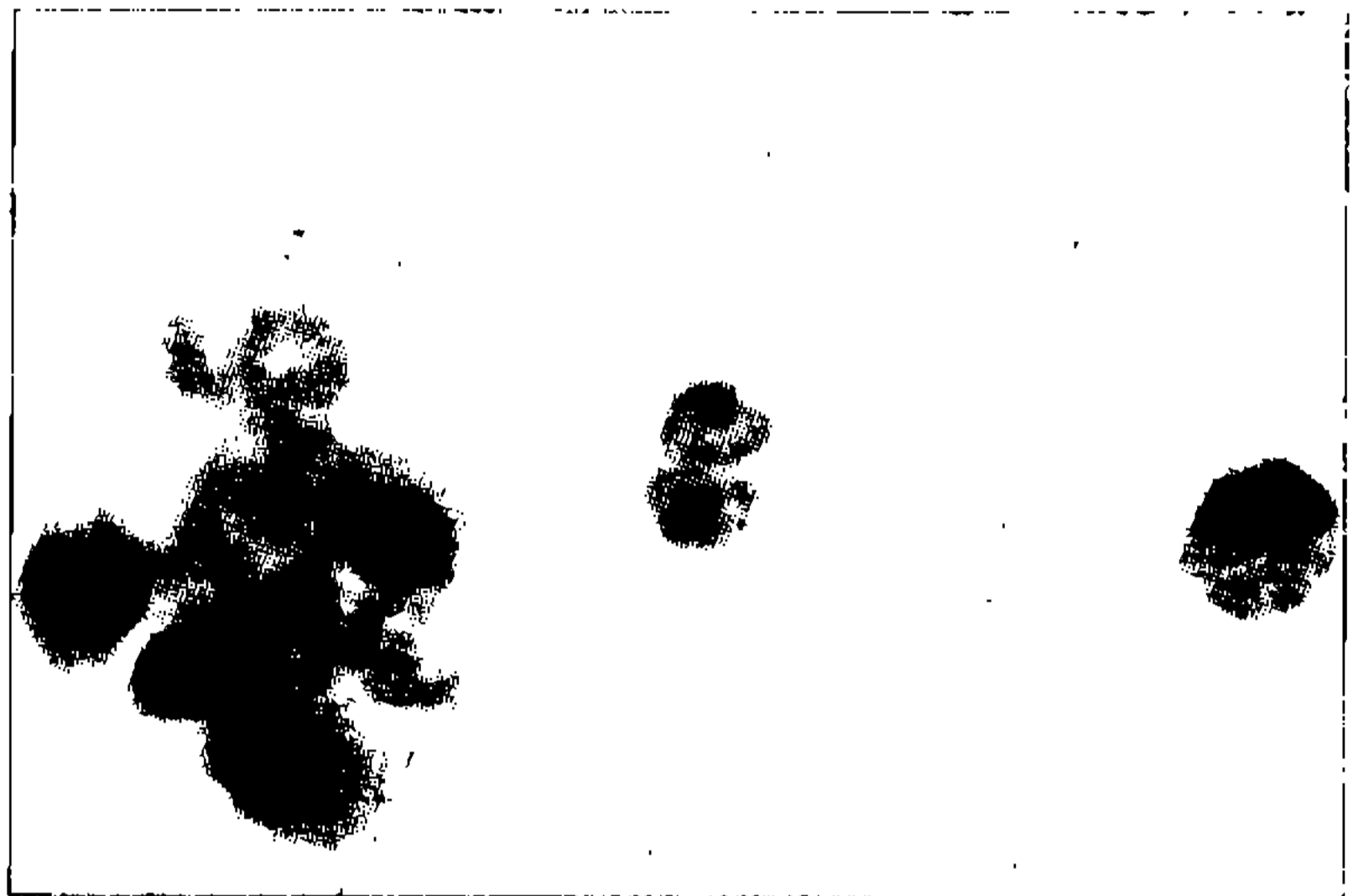


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

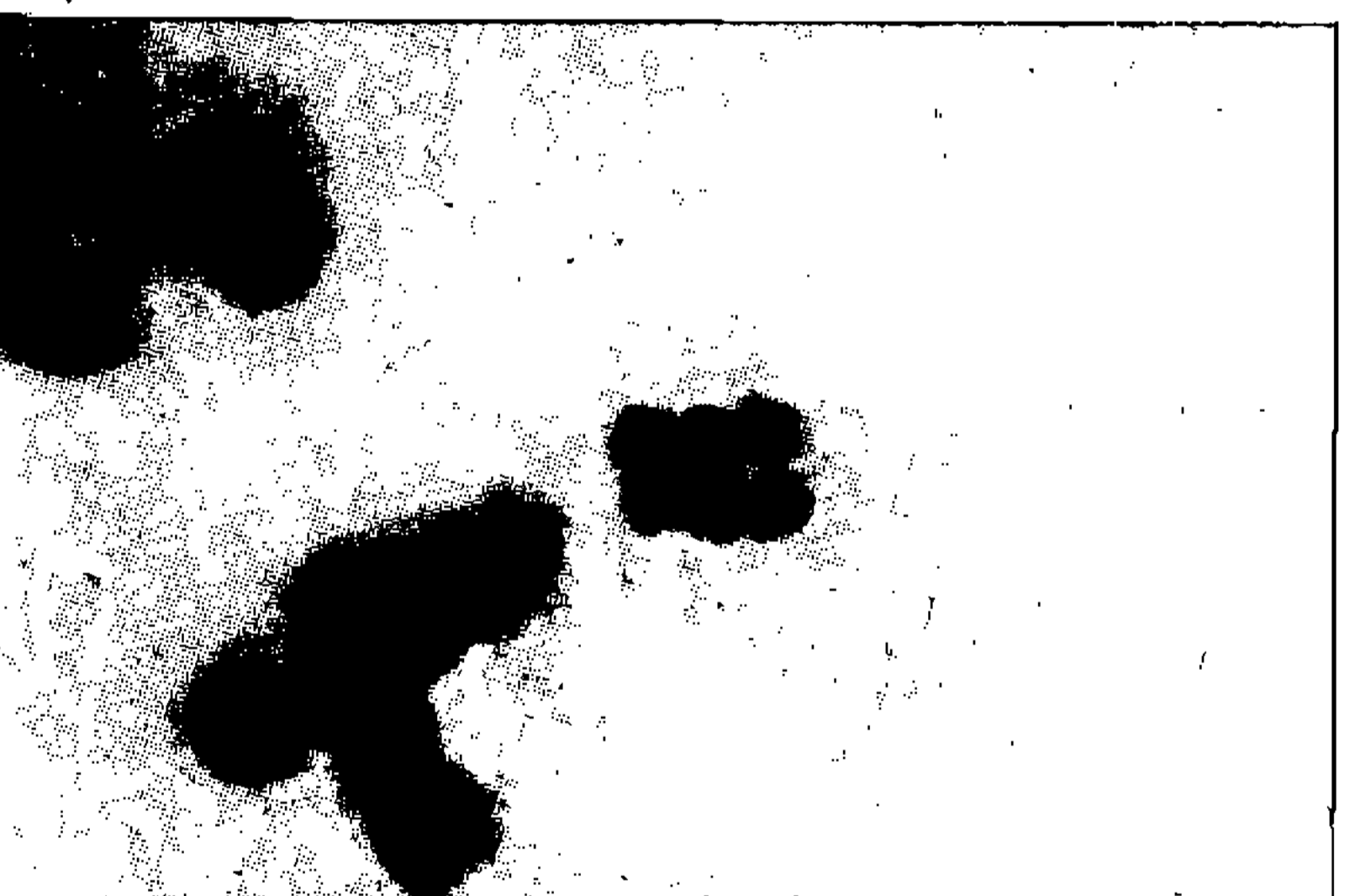


Fig. 8

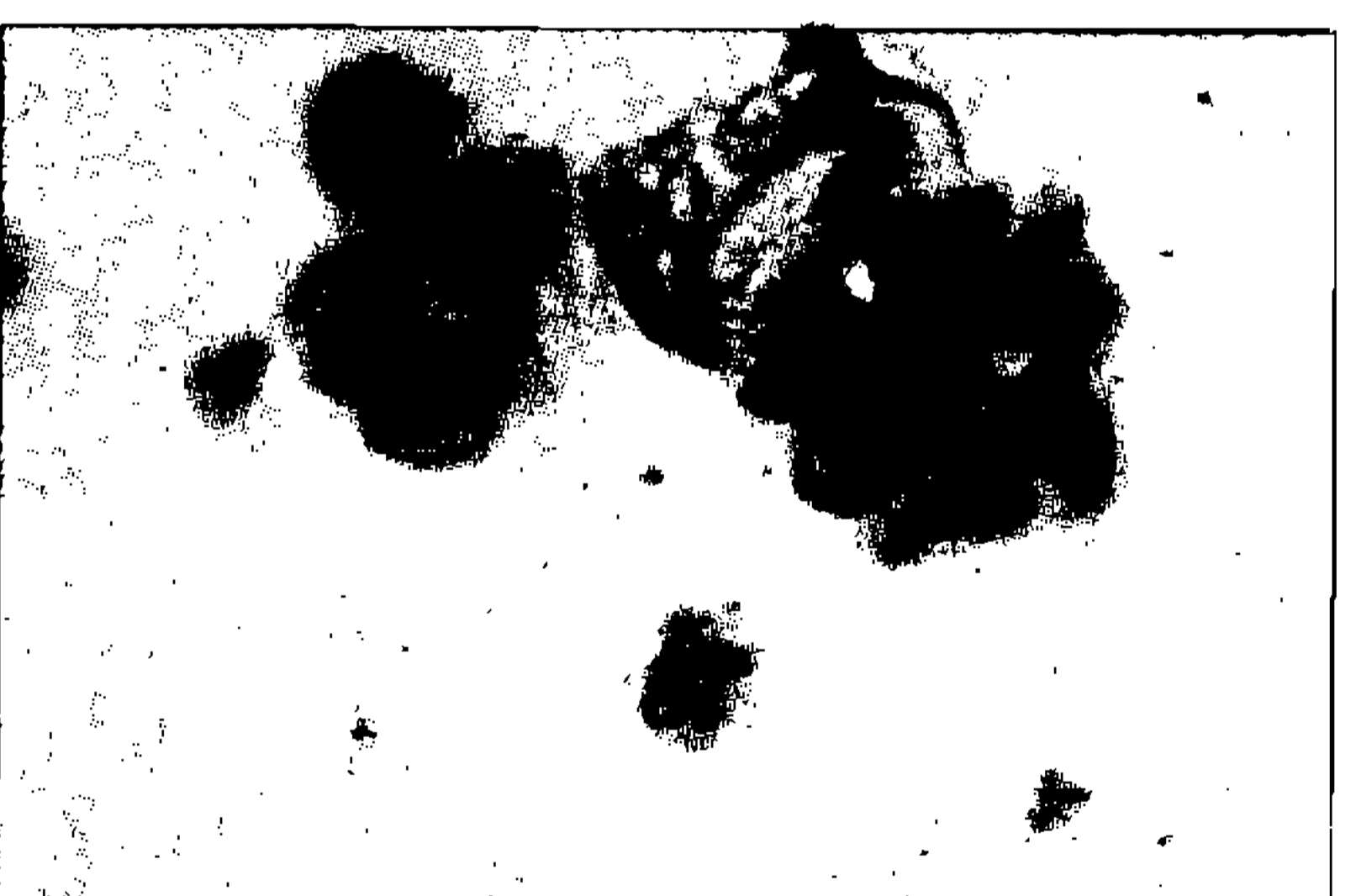


Fig. 9

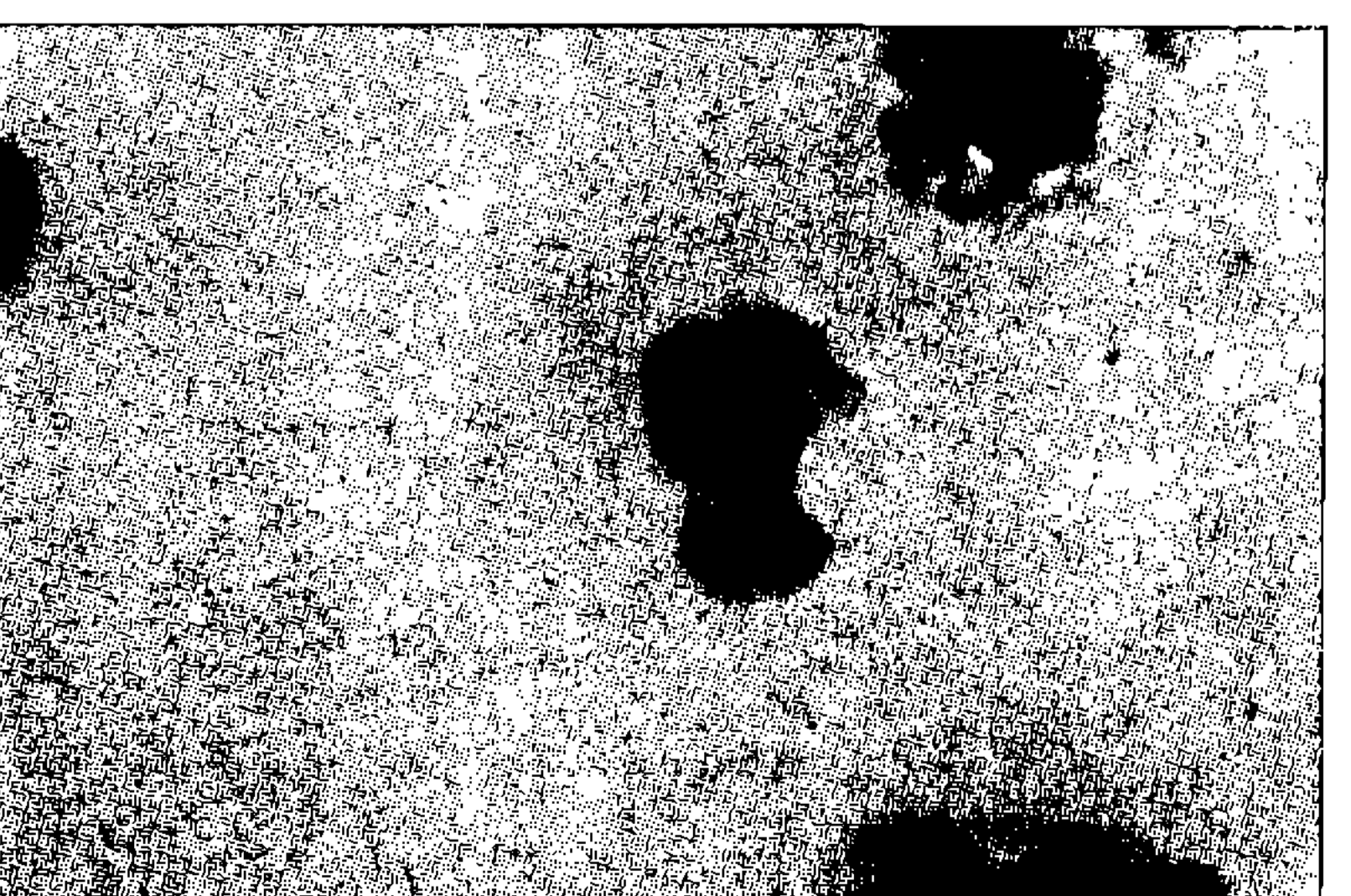


Fig. 10



Fig. 11