

Pesquisas sôbre o *Endotrypanum schaudinni* Mesnil e Brimont, 1908, parasita do *Choloepus didactylus* (L) (*)

pelos

Drs. Aristides Marques da Cunha e Julio Muniz

Entre os protozoários hemoparasitas, o *Endotrypanum schaudinni* é sem dúvida um dos mais interessantes e sôbre o qual poucos conhecimentos possuímos até o presente momento ; pois, a não ser os dados referentes à morfologia por êle apresentada no sangue do hospedador vertebrado que é o *Choloepus didactylus* (L.), todas as tentativas de cultivo e de transmissão a outros animais deram sempre resultados negativos, de acôrdo com os trabalhos de vários pesquisadores que estudaram êste parasita. No próprio hospedador vertebrado nenhuma outra fôrma além das encontradas no sangue, foi vista em qualquer outro órgão ou tecido, que pudesse ser interpretada como forma evolutiva dêsse protoziário, a não ser as de *Trypanosoma* que Mesnil e Brimont observaram, e que, segundo êles, nenhuma relação apresentava com os parasitos contidos no mesmo material por êles estudado e para os quais propuzeram o nome genérico de *Endotrypanum*.

Em 1936, um de nós (Cunha) em excursão pelo Estado do Pará teve ocasião de observar dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), pertencentes ao Museu Goeldi, que se achavam parasitados pelo *Endotrypanum*, mas devido a curta permanência em Belém não pôde proceder a maiores estudos, principalmente visando a obtenção de culturas. Em 1937 um dos auxiliares da seção de Protozoologia, tendo sido designado para ir em comissão trabalhar no Instituto de Biologia Experimental do Norte, em Belém do Pará, levou a incumbência de proceder a sementeiras em meios de N.N.N., Noguchi e Nöller, do sangue dos exemplares de *Choloepus didactylus* (L.) em cativeiro no museu Goeldi, bem como de outros exemplares que pudessem ser obtidos naquele Estado, sendo dessa incumbência notificado o Dr. Evandro Chagas, que dirigia aquele Instituto. Mais tarde, em 1938, recebíamos daquele nosso malgrado colega, tubos de meio de Nöller que tinham sido semeados com sangue de um exemplar de *Choloepus didac-*

* Recebido para publicação a 15 de julho de 1944 e dado à publicidade em agosto de 1944.

tylus (L.) parasitado com o *Endotrypanum*, tubos êsses que apresentavam um enduto abundante na superfície do meio, constituído por flagelados com características de *Leptomonas*. Mais tarde em 1941, o nosso companheiro de seção, Dr. Emanuel Dias, em excursão pelo Estado do Pará, teve ocasião de semear no meio de Nöller, sangue de um cutro exemplar de *Choloepus didactylus* (L.) infetado naturalmente com *Endotrypanum*, e obter novamente cultura abundante de um flagelado com as características de *Leptomonas*, culturas essas que nos foram entregues também para estudo.

O presente trabalho constitui o relato dos estudos que procedemos nesses diversos materiais, obtidos em épocas diferentes e compreende :

1.º — Descrição das formas encontradas no sangue dos dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), material êsse colhido por um de nós (Cunha) quando em excursão pelo Estado do Pará.

2.º — Estudo das duas amostras obtidas em cultura, com a descrição das formas de desenvolvimento.

3.º — Comportamento das mesmas em relação a certas reações de imunidade.

4.º — Tentativas de infecção de diversos animais, partindo do material das culturas.

5.º — Tentativas de infecção do *Rhodnius prolixus* com material das culturas.

FORMAS ENCONTRADAS NO SANGUE

O nosso estudo se baseia principalmente em esfregaços de sangue corados pelo método de Giemsa, pois o estudo do material a fresco foi dificultado devido o pequeno número de parasitas que os dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.) apresentavam no sangue. Em ambos os materiais, a maioria dos parasitas encontrados se acham como que aderentes às hemátias, e só raros exemplares foram encontrados fora dêsses elementos. A forma por êles assumida geralmente é de uma salchicha, com as extremidades arredondadas ou ligeiramente afiladas, podendo o parasita se apresentar encurvado ou não.

Na maioria dos elementos pode-se observar a presença de um núcleo perfeitamente individualizado, de forma redonda ou ovóide, com cromatina abundante muitas vezes disposta em forma de raios, localizado em muitos exemplares na parte média do corpo e em outros ocupando a extremidade posterior. Aglomerados de grânulos finos corando-se intensamente em ver-

melho e ocupando a região posterior do corpo ou dispostos em tórno do núcleo, foram freqüentemente observados.

A maioria das formas encontradas apresentam próximo do núcleo um cinetoplasto bem visível, quase sempre em forma de barra, e dele na maioria dos exemplares pode ser visto se originar um flagelo que percorrendo uma das bordas do parasita se transforma muitas vezes em flagelo livre. Essa organela em muitas formas pôde ser observada fazendo saliência para fóra da hematia parasitada, enquanto que em outras, após se encurvar, permanece aderente à mesma.

Em grande número de elementos o flagelo livre se mostra bem desenvolvido, atingindo um comprimento equivalente à metade do corpo; em outros êle é representado apenas por um rudimento de flagelo. Formas completamente desprovidas de flagelo livre foram observadas em pequeno número.

Embora os aspectos que acabamos de descrever correspondam aos da maioria dos elementos observados, outros foram encontrados tais como: formas em que o flagelo em vez de percorrer uma das bórdas do corpo do parasita assume uma posição mediana; formas como que desprovidas de flagelo, só com o núcleo e cinetoplasto; formas nas quais o flagelo ao percorrer o corpo do parasita se apresenta com ondulações, dando a impressão da existência de uma membrana ondulante.

Quanto à hemátia parasitada nenhuma alteração foi observada, a não ser quanto à forma, dando a impressão de se acharem distendidas pela presença do parasita.

Em ambos os materiais não encontramos absolutamente elementos com a morfologia de tripanosomas. As medidas apresentadas pelas formas por nós observadas no sangue variavam entre 8 a 12 micra de comp., por 2 a 25 micra de largo.

COMPORTAMENTO NOS MEIOS DE CULTIVO DAS AMOSTRAS ISOLADAS E DESCRIÇÃO DAS FORMAS

As duas amostras isoladas em cultura pura e com as quais trabalhamos apresentam um comportamento idêntico em relação aos meios comumente utilizados na técnica de cultivo dos representantes da família *Trypanosomidae*. No meio de agar glicosado ao qual se junta sangue desfibrinado de coelho ou de cavalo, pH 7,2, o cultivo se apresenta de maneira exuberante, como demonstra o desenvolvimento de um induto espesso, úmido, de côr esbranquiçada na superfície do meio semeado e que se desenvolve no fim de três a quatro dias após o repique. A exuberância da cultura nesse meio só é comparável com a observada nas culturas de certos flagelados de insetos

(*H. culicidarum*, *H. oncopelti*). No meio semi-sólido de Noguchi o desenvolvimento ocorre na camada mais superficial do meio onde se forma uma zona intensamente turva no fim de quatro a seis dias.

No meio de N.N.N. o desenvolvimento é muito menos abundante e só ocorre na água de condensação, não se estendendo à superfície do meio acima da camada líquida. A água de condensação não se turva, mesmo após um tempo longo, mas pôde-se observar a formação de um depósito pulverulento, não abundante, no fundo da camada líquida. As culturas só se desenvolvem em presença do oxigênio e a temperatura ótima varia entre 25 a 30 graus. A temperatura de 37 graus se mostra prejudicial ao desenvolvimento do cultivo, levando-o rapidamente à morte.

FORMAS ENCONTRADAS NA CULTURA

Ao exame a fresco, as culturas mais novas (entre 4 e 10 dias) mostram-se constituídas pelos seguintes elementos :

1.º — Formas arredondadas ou em pêra, desprovidas de flagelos livres e por conseguinte imóveis.

2.º — Formas arredondadas ou ligeiramente alongadas, apresentando um esboço de flagelo livre e praticamente desprovidas de movimento.

3.º — Formas em pêra, formas em naveta, formas em bastão, tôdas elas apresentando flagelo livre bem desenvolvido, de comprimento igual ou excedendo o comprimento do corpo. Êsses elementos apresentam-se dotados de mobilidade moderada. Amontoados dêsses elementos reunidos pelos flagela e assumindo o aspecto de roseta, são encontrados em grande número nas culturas.

4.º — Formas extremamente finas, com a extremidade posterior terminada em ponta, apresentando um longo flagelo de comprimento equivalente a duas ou três vezes aquele do corpo, e dotadas de movimentos extremamente intensos que lhes permitem se deslocar com extrema ligeireza através o campo microscópico.

A maioria dessas formas que acabamos de descrever, apresenta o protoplasma com numerosos grânulos de aspecto refringente e, em algumas delas, o protoplasma assume o aspecto vacuolizado.

Nas culturas mais novas as formas de leptomonas predominam sobre as formas do tipo leishmania. Nas culturas velhas poucos elementos do tipo leptomonas são encontrados, predominando formas de leishmania e elementos em degeneração. Nas culturas das duas amostras por nós estudadas nunca tivemos ocasião de observar formas de critídias.

O estudo das preparações fixadas e coradas (fixação a úmido pelo sublimado álcool de Schaudinn — coloração pelo Heidenhein — diferenciação pela solução de ácido pícrico em álcool a 95.^o), feitas com o material das culturas, mostram que não só as formas de leishmanias como as formas de leptomonas podem apresentar dois tipos de estrutura nuclear. O 1.^o representado por um núcleo cariosômico, com cario-membrana bem individualizada, junto à qual se dispõe quase sempre finos grânulos de cromatina e um cariosoma bem desenvolvido ocupando a parte central. O 2.^o representado por um núcleo compacto constituído por uma grande massa de cromatina bem desenvolvida e em torno da qual não se pôde observar uma cariomembrana individualizada. A maioria dos elementos das culturas apresentam o 1.^o tipo acima descrito e um menor número o 2.^o tipo. Além do núcleo principal, todos os elementos apresentam um cinetoplasto em barra, localizado nas formas de leishmânia junto do núcleo principal e quase sempre disposto lateralmente, e nas formas de leptomonas localizado na metade da porção do corpo compreendida entre o núcleo e a extremidade anterior. Os diversos tipos de evolução entre formas de leishmania e formas de leptomonas são encontrados no material estudado tais como: formas com núcleo principal e cinetoplasto; formas apresentando um rizoplasto; formas com um esboço de flagelo livre, e finalmente formas típicas de leptomonas. Em relação ao comprimento do flagelo livre, nas formas de leptomonas, podemos observar que em grande número desses elementos ele não ultrapassa o comprimento do corpo, ao passo que em menor número de formas ele pôde exceder de muito. São justamente estas últimas formas dotadas de um longo flagelo que ao exame a fresco se mostram extremamente móveis, atravessando com grande rapidez o campo microscópico. Formas de divisão foram observadas com frequência nas preparações, e o tipo que predomina é o da divisão binária, embora tenham sido observadas em pequeno número, formas com 4 flagelos e com o núcleo principal ainda indiviso, bem como elementos com 3 núcleos principais mas com um único aparelho flagelar dando a impressão da existência de um processo de divisão múltipla ocorrendo ao lado da divisão binária. A divisão nuclear se processa aparentemente por um estiramento do núcleo seguido de estrangulamento, não tendo sido possível a observação de um processo de verdadeira mitose. A divisão nuclear muitas vezes ocorre antes da divisão do cinetoplasto.

Formas de tripanosoma — Nas preparações das culturas por nós estudadas, pudemos observar, embora raramente, a existência de verdadeiras formas de tripanosomas, com o cinetoplasto ocupando a extremidade posterior do corpo do parasita, membrana ondulante, flagelo livre fazendo saliência na extremidade anterior do corpo e um núcleo principal que as vezes se dispõe junto do cinetoplasto, outras vezes ocupando a parte central do corpo.

Medidas — Formas de leishmânia : 3 a 4 micra de comp., por 2,5 a 3 micra de largo

Formas de leptômonas: { comprimento do corpo : 3 a 16 micra.
largura do corpo : 1 a 3.5 micra
comprimento do flagelo : 7 a 30 micra

Formas de tripanosomas : { corpo: 7 a 9 micra de comp., por 1 a 2 micra de largo
flagelo livre : 3 a 8 micra de comp.

COMPORTAMENTO DAS CULTURAS EM RELAÇÃO A CERTAS REAÇÕES DE IMUNIDADE

Apesar do estudo morfológico das formas encontradas nas culturas por nós estudadas permitir diferenciar o flagelado em questão de todos os demais representantes da família *Trypanosomidae*, parasitos de vertebrados, resolvemos proceder a algumas experiências de imunidade com o fim de estudar as relações imunológicas existentes entre o *Endotrypanum* e os representantes mais afins da família *Trypanosomidae*, tais como os pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Schizotrypanum*.

Relataremos primeiro os resultados obtidos com as reações de aglutinação, para passarmos depois às reações de fixação de complemento. Nas primeiras utilizamos sôros específicos preparados em coelho por inoculação por via venosa de emulsão de culturas, a princípio mortas pelo formol, seguidas de emulsões vivas. A pesquisa de aglutininas foi feita sempre utilizando suspensões vivas em soluto fisiológico das diversas amostras de flagelados com que trabalhamos, pois as suspensões mortas, quer por agentes físicos ou químicos, de acôrdo com as nossas experiências, não se prestaram para êsse estudos. Tôdas essas amostras utilizadas por nós com êsse fim não apresentavam o chamado tipo de aglutinação espontânea, tão frequentemente observada entre êsses flagelados. A leitura dos resultados era procedida sempre após a permanência das misturas por duas horas no banho maria a 37°. Nas reações de fixação de complemento os antígenos por nós utilizados eram constituídos por uma suspensão de cultura em soluto fisiológico feita 24 horas antes de se proceder a reação e conservadas durante êsse tempo na geladeira.

As culturas dos diversos flagelados com que trabalhamos foram obtidas no meio de agar glicosado a 2%, pH 7,2, ao qual se adicionava sangue defibrinado de coelho ou de cavalo nas seguintes proporções : para sangue de coelho 1:10, para o de cavalo 1:5.

As culturas de *Leishmania* foram obtidas em placas de Petri do tipo alto, e as sementeiras eram feitas pelo sistema de estrias utilizando para isso pincéis. Após a sementeira as placas eram invertidas, ficando a superfície

Essa primeira experiência teve por fim excluir a hipótese de ser o flagelado em estudo, idêntico a *Leishmania visceral americana*, e poder representar o *Choloepus didactylus* (L.) um depositário desse parasita no mundo exterior, pois ainda não tínhamos verificado nas culturas, o que foi conseguido mais tarde, a presença de verdadeiras formas de *Trypanosomas*, fato esse que permitiu excluir desde então, essa hipótese. Pelo quadro acima pôde-se ver que um soro aglutinante preparado com uma amostra recentemente isolada de *Leishmania visceral americana* não aglutina o *Endotrypanum*, mesmo nos títulos mais baixos. Mais tarde tivemos ocasião de repetir novamente a mesma experiência, não só com a amostra de *Endotrypanum* denominada de *Endo 1* como com a outra amostra isolada pelo Dr. Emanuel Dias e por nós denominada de *Endo 2*. Nessa ocasião utilizamos dois outros soros aglutinantes, um de *Leishmania visceral americana*, amostra Cão 1, e outro de *Leishmania brasiliensis*, amostra J. A. Ambas essas amostras na ocasião do preparo do soro, tinham sido recentemente isoladas e os resultados foram idêntico ao acima referido, conforme se pôde ver nos quadros que seguem.

SORO ANTI CÃO 1

(Amostra *Leishmania visceral americana* recentemente isolada)

Experiência realizada em 22-10-1941

AMOSTRA	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$ x	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	TEST.
J. A.....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Endo 1.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Endo 2.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

SORO ANTI J. A.

(Amostra de "*Leishmania brasiliensis*" recentemente isolada)

Experiência realizada em 15-10-1941

AMOSTRA	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{1560}$	TEST.
J. A.....	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Endo 1.....	—	—	—	—	—	—	—	—
Endo 2.....	—	—	—	—	—	—	—	—

Tendo um de nós (Cunha) verificado, conforme trabalho já publicado, que as amostras de *Leishmania*, mantidas durante longo tempo em cultura nos meios artificiais, sofrem modificações na sua constituição antigênica, de maneira que um soro aglutinante, preparado com uma amostra velha, absor-

vido por uma amostra recentemente isolada, é ainda capaz de aglutinar a amostra velha, procuramos ver se idêntico fato ocorria em relação às culturas de *Endotrypanum*. Com o *Endotrypanum* 1 que vinha sendo mantido por 3 anos em meios artificiais de cultivo preparamos um soro aglutinante. O soro assim obtido foi absorvido com a amostra de *Endo* 2, que acabava de ser isolada, e verificamos que apesar do soro assim absorvido, não mais aglutinar a amostra do *Endo* 2 que serviu para a absorção, ainda continuava a aglutinar, em título relativamente elevado a amostra *Endo* 1 utilizada no preparo do soro aglutinante conforme pode ser observado no quadro abaixo.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1

(Amostra mantida durante 3 anos em cultura) absorvido pelo *Endotrypanum* 2
(amostra recentemente isolada)

Experiência realizada em 30-10-1944

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	TEST.
Endo 1 amostra antiga..	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
Endo 2 amostra recente.	—	—	—	—	—	—	—

Essa experiência foi repetida várias vezes com idênticos resultados, o que aliás já era esperado, porque o soro preparado com a amostra *Endo* 1, apesar de apresentar um alto teôr de aglutininas para a amostra homóloga, 1/20480, só aglutina a amostra *Endo* 2, no título de 1/320, conforme o quadro abaixo.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1

(Amostra mantida durante três anos em cultura)

Experiência realizada em 7-7-1944

AMOSTRA	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2650}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	$\frac{1}{20480}$	TEST.
Endo 1.....	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—
Endo 2 amostra isol. em 1941	+	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Recentemente, decorridos 3 anos após o isolamento da amostra *Endo* 2, repetimos novamente a prova de aglutinação, utilizando o mesmo soro anti-*Endo* 1 empregado na experiência acima, e verificamos que êle já aglutinava a amostra *Endo* 2, no título de 1/2560 como se pode ver no quadro a seguir.

SORO ANTI ENDOTRYPANUM 1

(Preparado em 1Y4-7-1941)

Experiência realizada em 7-7-44

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	TEST
Endo 2 amostra isolada em 1941	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—

O aumento do título aglutinante observado, só pode ser atribuído a uma modificação na constituição antigênica da amostra Endo 2; com aparecimento de antígenos secundários semelhantes aos existentes na amostra Endo 1 há 3 anos passados, isto é, na ocasião do preparo do soro utilizado nessa experiência.

O comportamento das culturas de *Endotrypanum* em presença de um soro aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi* foi bem diferente do que acabamos de relatar em relação aos sôros aglutinantes para as *Leishmanias*. Nessas experiências, utilizamos um soro aglutinante preparado com uma amostra humana de *Schizotrypanum cruzi*, mantida por passagem em cobaia, e que tinha sido recentemente isolada em cultura (amostra *Elvira* 1943). O soro assim preparado, aglutinou em título relativamente elevado a amostra de *Endo* 1 com que trabalhamos nessa experiência, conforme pode ser visto no quadro que segue.

SORO ANTI SCHIZOTRYPANUM(Amostra *Elvira* 1943, recentemente isolada)*Experiência realizada em 15-1-1944*

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	TEST
Endo 1.....	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	—	—	—
Elvira 1943.....	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—

Reações de fixação de complemento — Por meio desse tipo de reação, procuramos verificar o comportamento dos antígenos e dos soros específicos, preparados com as amostras por nós estudadas de *Endotrypanum schaudinni*, quando em presença de soros específicos e antígenos, preparados com amostras de *Schizotrypanum cruzi*.

O nosso primeiro ensaio foi feito utilizando um antígeno de *Schizotrypanum cruzi* preparado com uma amostra isolada de *Dasipus* sp., que vem sendo mantida, há longos anos, em nosso laboratório, em meios artificiais de cultura.

Os dois sôros específicos empregados nessa reação, foram o sôro anti *Endotrypanum* 1, e um sôro anti-*Schizotrypanum* amostra S. Paulo, os quais foram empregados nas seguintes diluições : 1:2, 1:10, 1:20 e 1:40. A quantidade dessas diversas diluições, utilizadas nos tubos de reação foi de 0,2 cc. O antígeno era representado por uma suspensão da cultura em soro fisiológico e preparada 24 horas antes. A dose da suspensão de antígeno empregada, foi de 0,2 cc., tendo sido prèviamente dosado o poder anti-complementar do mesmo em relação ao complemento do dia. Nos tubos testemunhas dos soros foram empregados 0,2 cc. dos soros em natureza. O esquema abaixo mostra os resultados obtidos.

Amostra tatú (*Dasipus* sp.)
Experiência realizada em 15-8-1943

SORO ANTI- <i>Schizotrypanum cruzi</i> Amostra S. Paulo					SORO ANTI- <i>Endotrypanum</i> Amostra 1					
Título da diluição dos soros	1 — 2	1 — 10	1 — 20	1 — 40	Test. do soro	1 — 2	1 — 10	1 — 20	1 — 40	Test. do soro
	++++	++++	++++	++++	—	++++	+++	++	—	—

Num outro ensaio procuramos verificar o comportamento do antígeno preparado com as duas amostras de *Endotrypanum* 1 e 2 quando em presença dos soros anti-*Endotrypanum* 1 e anti-*Schizotrypanum cruzi* (Amostra S. Paulo).

O esquema abaixo mostra os resultados obtidos.

Reação de fixação de complemento com antígeno de *Endotrypanum* 1 e 2

Experiência realizada em 15-8-1943

SORO ANTI- <i>Schizotrypanum cruzi</i> Amostra S. Paulo					SORO ANTI- <i>Endotrypanum</i> Amostra 1					
Título da diluição dos soros	1 — 2	1 — 10	1 — 20	1 — 40	Test. do soro	1 — 2	1 — 10	1 — 20	1 — 40	Test. do soro
	+++	++	—	—	—	++++	++++	++++	++++	—

As duas experiências acima mencionadas, demonstram que os antígenos de *Endotrypanum* e de *Schizotrypanum cruzi* são capazes de fixar o complemento, quando em presença dos soros específicos anti-*Endotrypanum* e anti-*Schizotrypanum*, embora tenham apresentado variações quanto a intensidade de reação.

TENTATIVAS DE TRANSMISSÃO A OUTROS ANIMAIS

Partindo de material proveniente das culturas fizemos várias tentativas para infetar diversos animais tais como: *Bradypus tridactylus*, *Didelphis azarae*, *Mus musculus* e *Leptodactylus ocellatus*.

As vias por nós utilizadas foram: a subcutânea, a intra-peritonal e a endovenosa, sendo de notar que alguns desses animais tinham sido antes esplenectomizados. Apesar de terem sido inculadas grandes doses de cultura, tôdas as tentativas para transmitir a infecção a esses animais foram negativas.

As pesquisas procedidas em córtex de diversos órgãos provenientes dos animais inoculados bem como de fragmentos de tecido correspondentes ao ponto de inoculação (nos casos de inoculação subcutânea), visando o encontro de possíveis formas de evolução do parasita, resultaram sempre negativas. Nesse último material pôde-se observar somente formas de parasitas em completa desintegração pelos elementos de defesa.

Essas experiências nos levaram a pensar ser o *Endotrypanum* dotado de grande especificidade para o *Choloepus didactylus* (L.), desde que fosse excluída a possibilidade da perda de virulência das culturas. Infelizmente não nos foi possível resolver este ponto, por não termos podido obter até o presente momento, exemplares dessa espécie.

TENTATIVAS DE INFECÇÃO DO RHODNIUS PROLIXUS COM O MATERIAL DAS CULTURAS

Partindo de material das culturas fizemos também tentativas com o fim de verificar si as formas nelas desenvolvidas seriam capazes de sofrer uma adaptação ou mesmo evoluírem no tubo digestivo do *Rhodnius prolixus*. Para isso alimentamos numerosos exemplares desse hematófago, nos vários estádios de evolução, que provinham de culturas feitas em laboratório e livres de qualquer contaminação por flagelados, com uma mistura de sangue de coelho e material obtido das culturas de *Endotrypanum* (amostras 1 e 2). No decorrer de dois meses, procedemos a exames periódicos do conteúdo da última porção do intestino dos exemplares utilizados nas experiências e não podemos constatar a presença de formas evolutivas e nem mesmo de uma simples sobrevivência das formas ingeridas.

DISCUSSÃO

A questão primordial a nosso ver, a ser resolvida, era de saber se as formas que desenvolveram nas culturas semeadas com sangue de dois exemplares de *Choloepus didactylus* (L.), representavam formas de evolução do *Endotrypanum schaudinni*. Somos levados a pensar afirmativamente pelas seguintes razões :

1.º — A evolução por nós observada nas culturas afasta-se das apresentadas em idênticas condições pelos representantes dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Schizotrypanum*, nos quais estão enquadrados a maioria dos hemoflagelados parasitas de vertebrados, pois só tivemos ocasião de observar formas que correspondem aos tipos morfológicos de *leishmania*, *leptômonas* e *trypansomoma*, com exclusão de formas *critidia*. É sabido que os representantes do gênero *Leishmania* evoluem nas culturas sob a forma de *leptômonas*, e *leishmania*; os do gênero *Trypanosoma*, quando cultiváveis, sob as formas de *critidia* e *trypansomoma* e os do gênero *Schizotrypanum* sob as formas de *leishmânia*, *critidia* e *trypansomoma*.

2.º — Excluída a observação de Mesnil e Brimont, nenhum outro hemoflagelado a não ser o *Endotrypanum schaudinni*, foi até agora assinalado parasitando o sangue de *Choloepus didactylus* (L.), em particular os exemplares oriundos da região amazônica.

Justificando dessa maneira o nosso ponto de vista em relação à questão acima enunciada, achamos, baseados nos estudos das culturas, possuir o *Endotrypanum*, ao lado de outros elementos, características próprias para constituir entre os representantes da família *Trypanosomidae*, um gênero a parte, como propuseram Mesnil e Brimont. As reações de imunidade demonstraram que o parasita em questão apresenta uma maior afinidade antigênica com o *Schizotrypanum cruzi* do que com os representantes do gênero *Leishmania*, embora se mostre dotado de um maior grau de adaptação ao hospedeiro vertebrado que aquele protozoário, como demonstram os seguintes fatos : o parasitismo endoglobular, as tentativas infrutíferas para transmitir experimentalmente a infecção a outros animais; e o fato de até hoje, não ter sido êle encontrado parasitando na natureza animais de outra espécie, principalmente de espécies afins do *Choloepus didactylus* (L.).

CONCLUSÕES

1.º — As formas de leishmânia, leptômonas e tripanosoma observadas por nós nas duas amostras de cultura aqui estudadas, as quais foram obtidas em épocas diferentes pela sementeira de sangue de dois exemplares de *Cho-*

loepus didactylus (L.), originários da região amazônica e parasitados pelo *Endotrypanum schaudinni*, representam as formas evolutivas desse protozoário nos meios artificiais de cultivo.

Êsse tipo de desenvolvimento em culturas não é encontrado entre os representantes dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Schizotrypanum*, nos quais estão incluídos a maioria dos hemoflagelados parasitas dos vertebrados e constitui mais um elemento, ao lado de outros já conhecidos, para justificar o ponto de vista de Mesnil e Brimont quando propuseram a criação de um novo gênero entre os representantes da família *Trypanosomidae* para êsse protozoário.

2.º — Pelas reações de aglutinação e fixação de complemento verificamos possuir o *Endotrypanum schaudinni* uma maior afinidade antigênica com o *Schizotrypanum cruzi* do que com os parasitas do gênero *Leishmania*. Os fatos de não ter sido até hoje encontrado na natureza nenhum outro animal, mesmo as espécies afins do *Choloepus didactylus* parasitado por êsse protozoário, e terem sido infrutíferas tôdas as tentativas de transmissão experimental, levam a pensar ser o *Endotrypanum schaudinni* um protozoário grandemente adaptado ao parasitismo dessa espécie de *Edentata*.

3.º — Foram verificados, em relação as culturas de *Endotrypanum schaudinni*, os mesmos fatos já assinalados por um de nós (Cunha) em relação as culturas dos parasitas do gênero *Leishmania*, isto é, que a conservação em meios artificiais de cultura, trazem com o decorrer do tempo, uma modificação na constituição antigênica desses parasitos pelo aparecimento de antígenos secundários.

CONCLUSIONS

1.º — In the two culture strains, obtained in different occasions, by the amearing of blood from 2 specimens of *Choloepus didactylus* (L.), of the amazonian region and both parasited by *Endotrypanum schaudinni*, we observed forms of leishmania, leptomonas and trypanosoma, which represent evolutive forms of that protozoa in artificial culture media.

The above type of development in cultures was not yet observed in the *Leishmania*, *Trypanosoma* and *Schizotrypanum*, genera including the majority of hemoflagelates of vertebrates, what constitutes an additional element, besides the other known characters, for justifying the point of view of Mesnil and Brimont, when created, for the mentioned parasite, a new genus in the family *Trypanosomidae*.

2.º — By means of reactions of agglutination and fixation of the complement, we verified that *Endotrypanum schaudinni*, has a greater antigenical affinity to *Schizotrypanum cruzi* than of the genus *Leishmania*.

This fact, the absence of any animal infected in nature by *Endotrypanum schaudinni*, the circumstance of having failed all tentatives of experimental transmission of the parasite to closely allied species of *Choloepus didactylus*, lend us to believe that *Endotrypanum Schaudinni* is strictly adapted to the parasitism of that species of *Edentata*.

3.º — The same facts verified by one of us (Cunha) with cultures of parasites of the genus *Leishmania* were also observed with cultures of *Endotrypanum schaudinni*, namely the alteration in the antigenical constitution of parasite by the formation of secondary antigens some time after the cultivation in artificial media.

BIBLIOGRAFIA

MESNIL e BRIMONT,

1908. Sur un hématozoaire nouveau (*Endotrypanum* n. gen) d'un édenté de Guyane — C. R. Soc. Biol., LXV, 581.

DARLING, S. T.,

1914. The *Endotrypanum* of Hoffman's sloth Journ. Med. Res., XXXI, 195.

LABERNADIE, V. G. F., e HUBAC

1923. Sur l'*Endotrypanum schaudinni* de l'unau, édenté de la Guyane (*Choloepus didactylus*). C. R. Soc. Biol., LXXXVIII, 664.

WENYON, C. M., e SCOTT, H. H.,

1925. *Endotrypanum schaudinni* in the two-toed sloth. Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg., XIX, 7.

WENYON, C. M.,

1926. Protozoology.

ESTAMPA 1

Figs. 1, 2, 3 e 4 — Formas endoglobulares encontradas no sangue dos exemplares de *Choloepus didactylus* (L.).

Fig. 5 — Forma de **critídia encontrada** fora da hemátia, no sangue do *Choloepus didactylus* (L.).

Figs. 6 e 7 — Formas de leishmânias encontradas nas culturas, sendo que a representada na fig. 7 se apresenta em divisão.

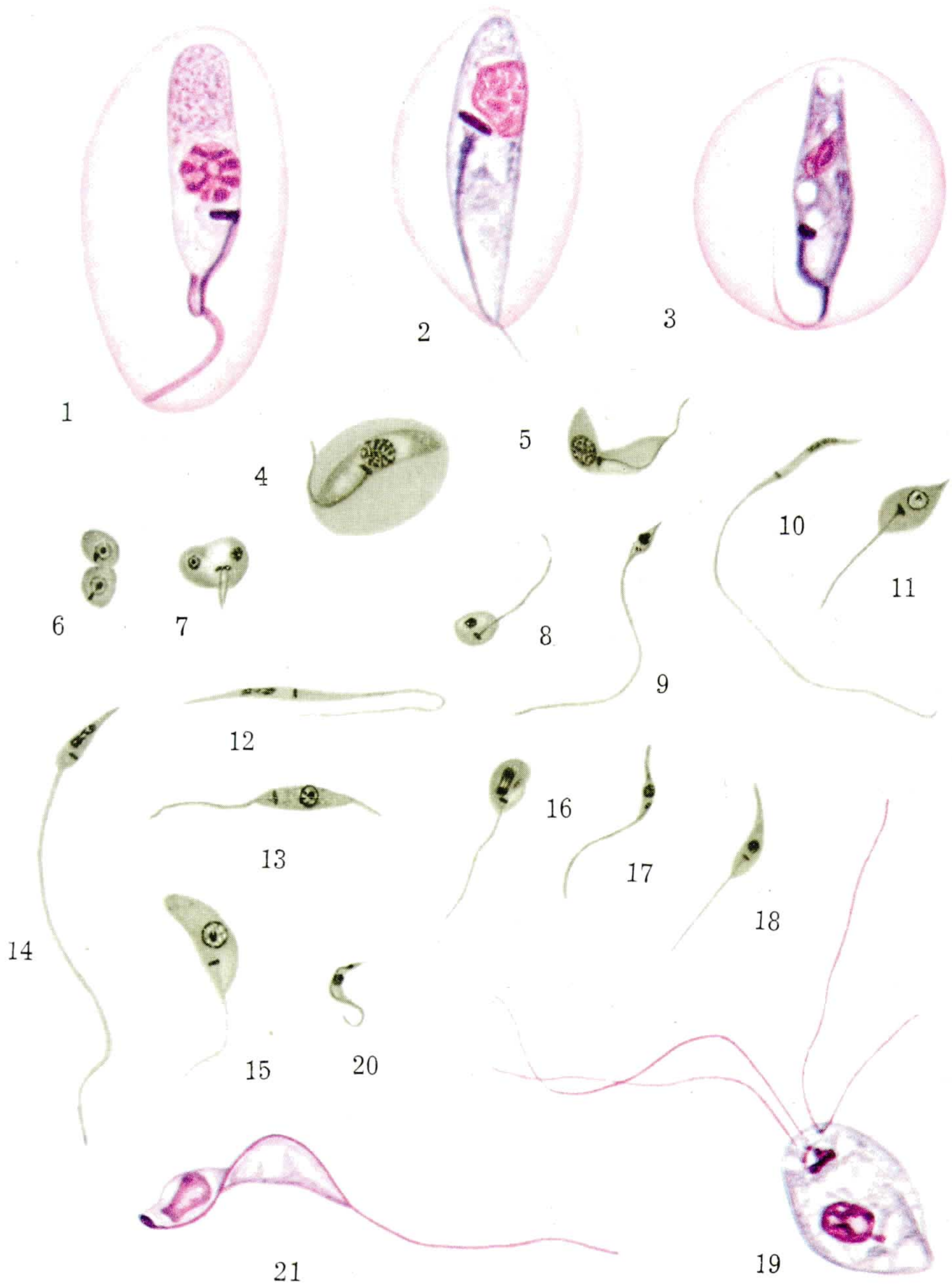
Figs. 8 a 18 — Formas de leptômonas encontradas nas culturas.

Fig. 19 — Forma de leptômona em divisão, apresentando 4. flagelos enquanto o núcleo principal permanece indiviso.

Figs. 20 e 21 — Formas de tripanosomas encontradas nas culturas.

As formas representadas nas figuras 1, 2, 3, 19 e 21 foram desenhadas com Ocular 20 e imm. 100 a altura da mesa, de preparações de cultura fixadas pelo álcool e coradas pelo método de Giemsa.

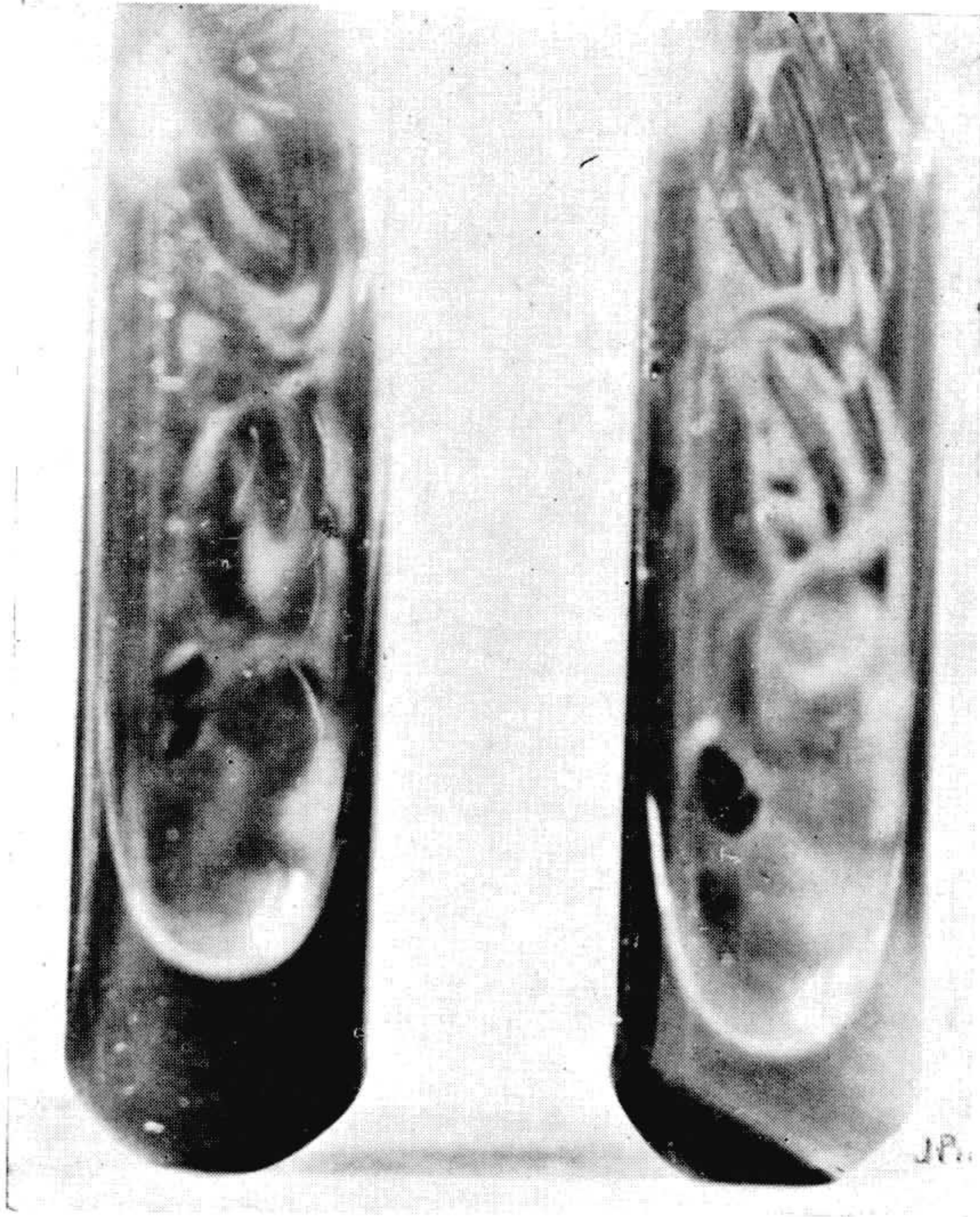
As outras formas representadas nesta estampa, foram desenhadas com Oc. 10 e imm. 100 a altura da mesa, de preparação fixadas a úmido pelo sublimado de Schaudinn, coradas pela hematoxilina de Heidenhein e diferenciadas pela solução de ácido pícrico em álcool a 95.º



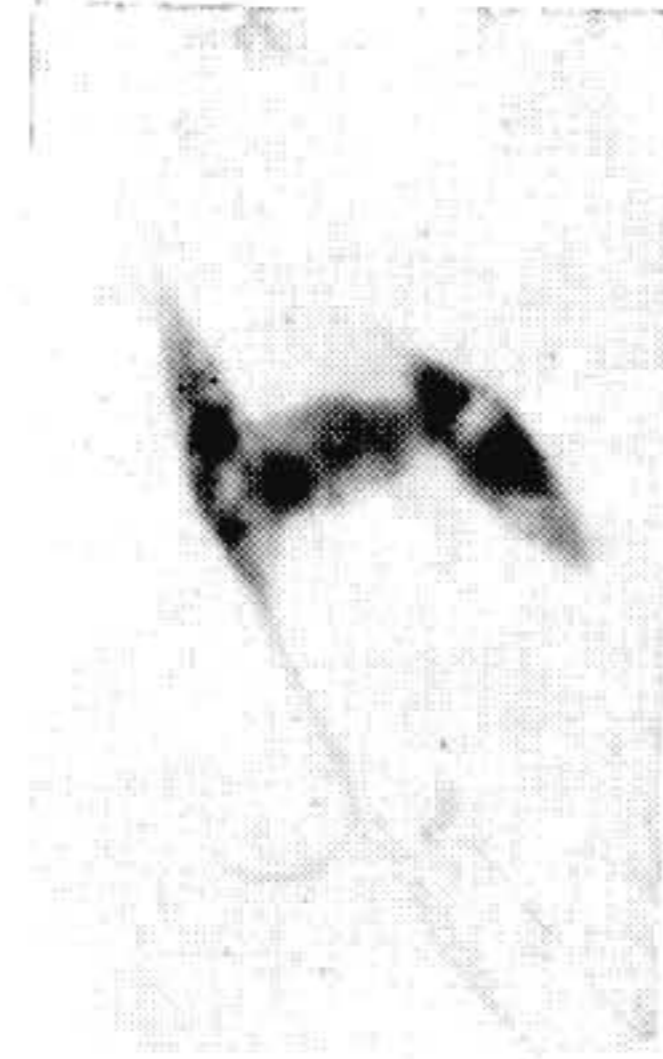
Drs. A. Marques da Cunha e Julio Muniz — Pesquisas sobre o
Endotrypanum schaudinni.

ESTAMPA 2

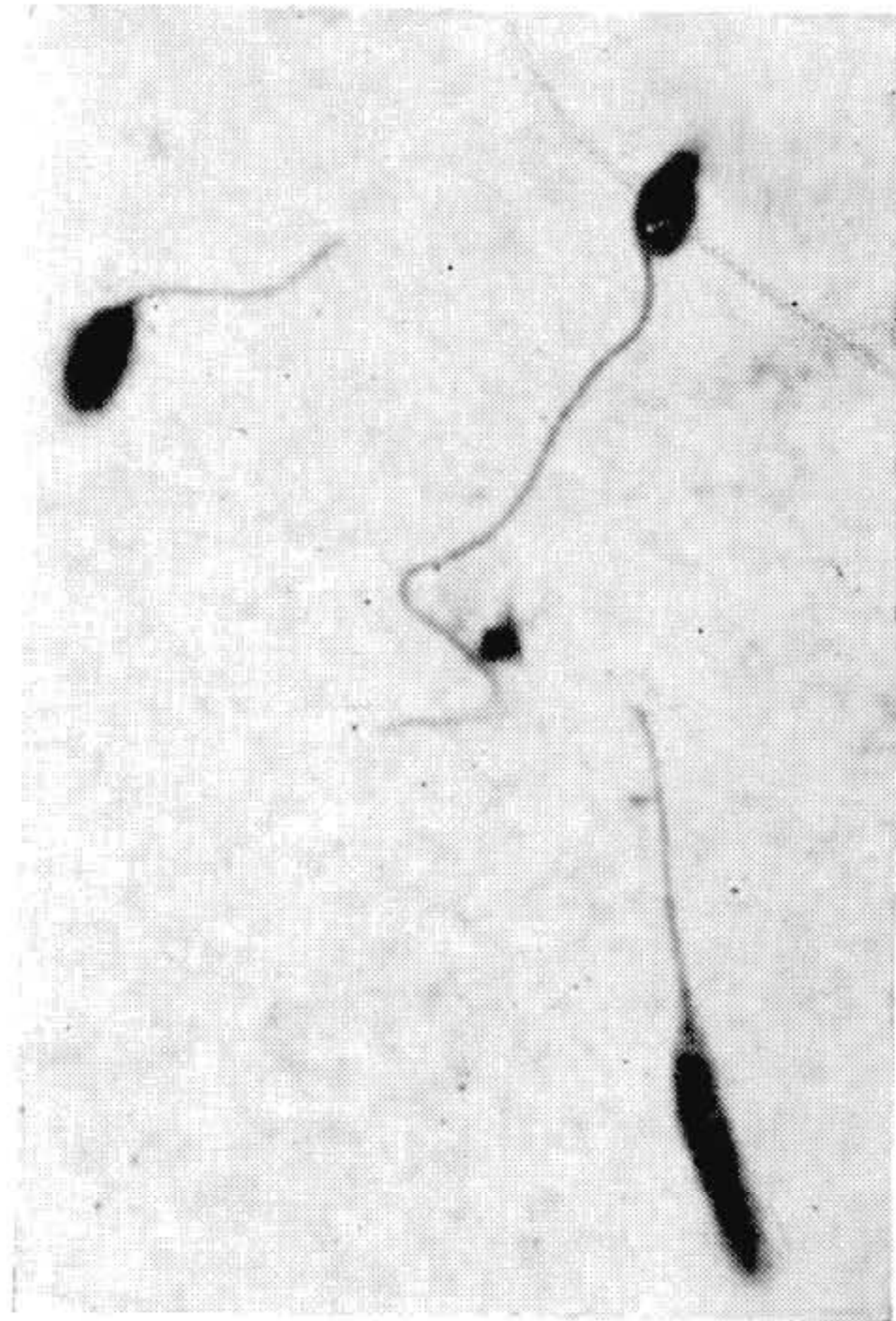
- Fig. 1 — Fotografia mostrando o aspecto das culturas do *Endotrypanum schaudinni* no meio de agar-sangue glicosado a 2%.
- Figs. 2, 3, 4 e 5 — Microfotografias feitas de preparações fixadas a úmido pelo sublimado de Schaudinn e coradas pela hematoxilina de Heidenhein com diferenciação pela solução de ácido pícrico em álcool a 95°. Nessas microfotografias pôde-se ver as formas de *leptômonas* e *leishmanias* que desenvolvem nas culturas de *Endotrypanum schaudinni*.



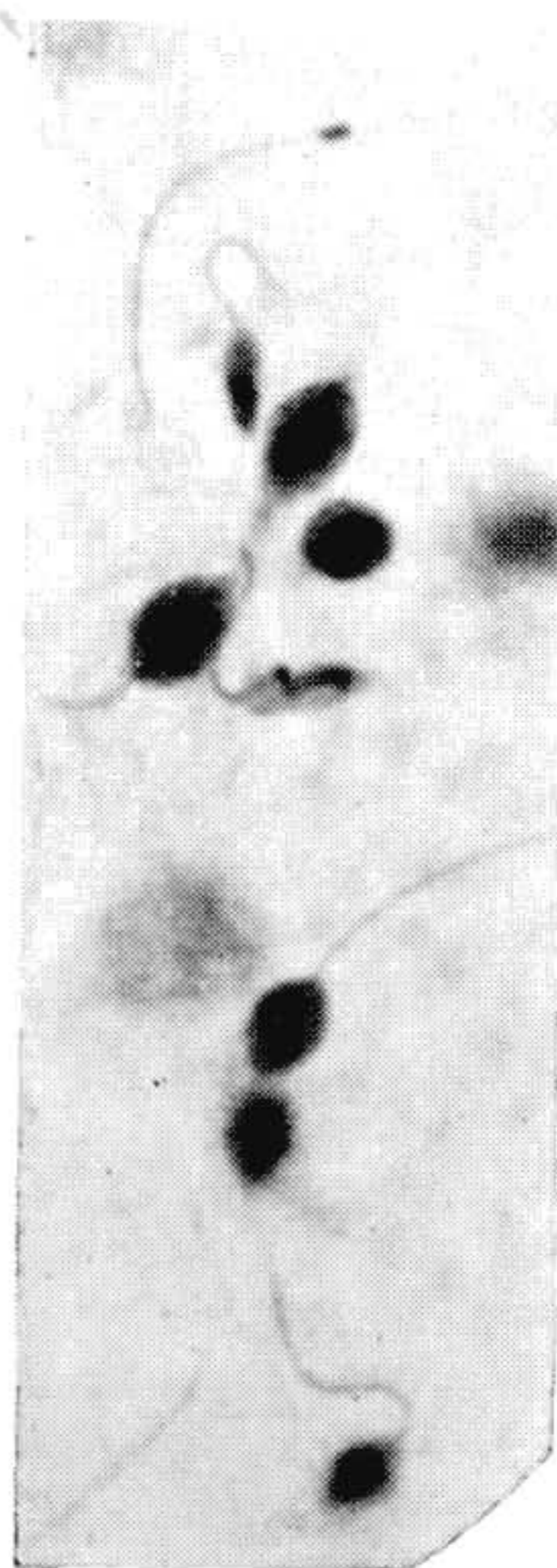
1



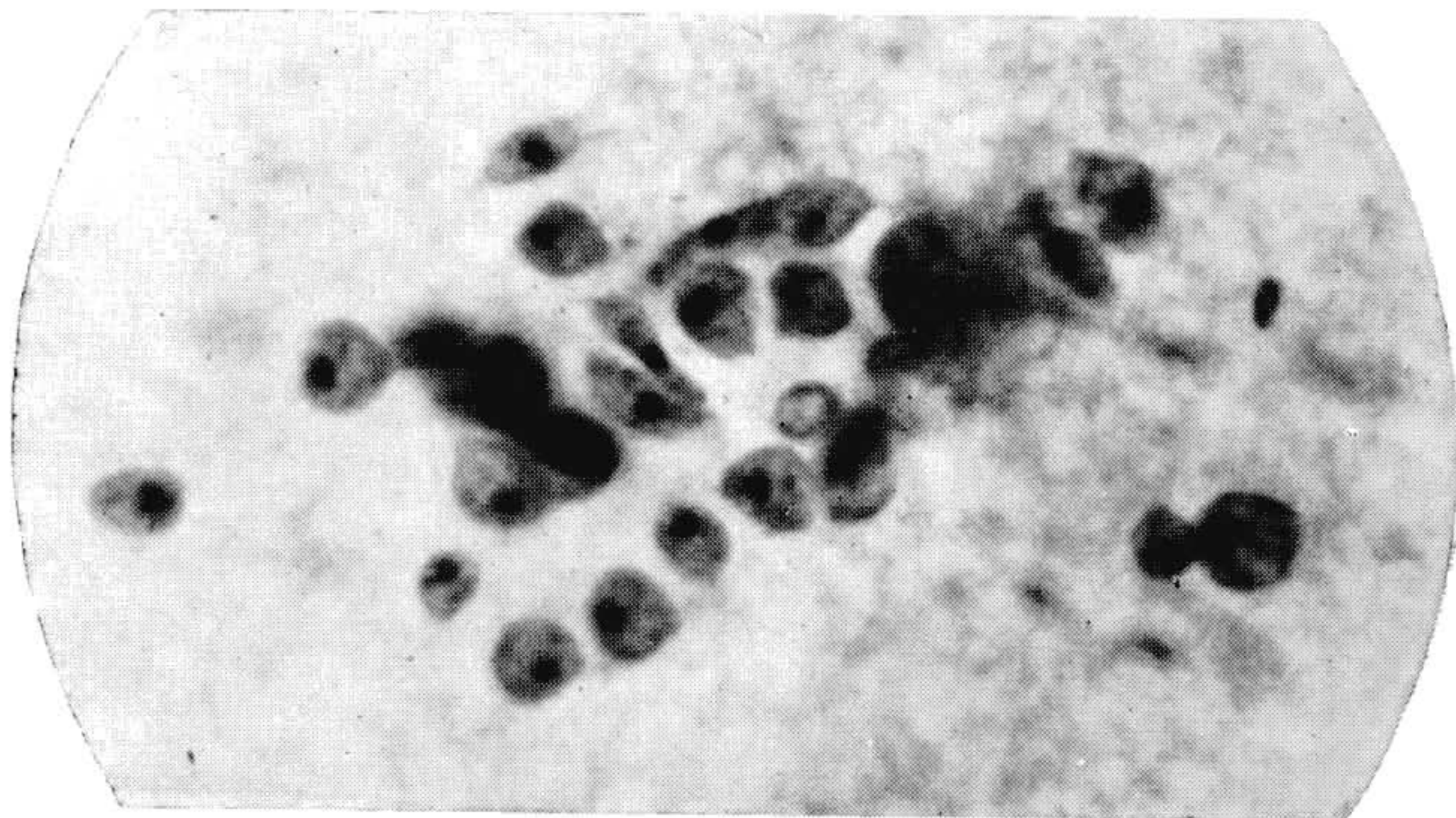
2



3



5



4