

ESTUDOS SOBRE RESERVATÓRIOS E VECTORES SILVESTRES DO *TRYPANOSOMA CRUZI*. LV — INFECÇÃO NATURAL DO RATO, *HOLOCHILUS BRASILIENSIS LEUCOGASTER* (BRANDT, 1835) PELO *T. CRUZI*

Mauro Pereira BARRETTO e Rosa Domingues RIBEIRO (1)

RESUMO

Amostra de *T. cruzi*, através de xenodiagnóstico e subsequente inoculação em camundongos brancos jovens, foi isolada de um exemplar de *Holochilus brasiliensis leucogaster* (Brandt, 1835), capturado no Município de Itapira, São Paulo, Brasil. Essa amostra mostrou-se patogênica para animais de laboratório, infectando 100% dos camundongos inoculados com sangue de doadores com infecção aguda. As formas sanguíneas, em camundongos, medem 19,54 μ de comprimento total médio e 2,24 μ de largura média e têm índice nuclear médio de 1,37. Nos animais mortos durante a fase aguda observaram-se pequenos ninhos de leishmânias, principalmente no coração. A infecção dos camundongos foi, via de regra, moderada, com período prepatente longo, parasitemia moderada, longa duração da fase aguda e taxa de letalidade de 13,3%. A amostra confere aos camundongos que sobrevivem, alto grau de resistência contra reinfecções pela amostra Y; cultivava-se em meio NNN e infecta bem várias espécies de triatomíneos.

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro achado de CLARK & DUNN⁵ que, no Panamá, encontraram o *Sciurus granatensis morulus* Bangs, 1900, naturalmente infectado, várias espécies de roedores têm sido assinaladas como reservatórios do *T. cruzi*.

Em trabalhos recentes, RIBEIRO^{9,10} e BARRETTO³ alistam os seguintes roedores encontrados naturalmente infectados no Brasil: Família *SCIURIDAE*: *Sciurus aestuans ingrami* (Thomas, 1901); Família *CRICETIDAE*: *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1887), *Akodon nigritus nigritus* (Lichtenstein, 1829), *Calomys tener* (Winge, 1888), *Nectomys squamipes amazonicus* Hershkovitz, 1944, *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827), *Oryzomys capito lati-*

ceps (Lund, 1841), *Oryzomys nigripes* (Desmarest, 1819), *Oryzomys subflavus subflavus* (Wagner, 1842), *Oxymycterus hispidus quaestor* Thomas, 1903, *Thomasomys dorsalis* (Thomas, 1917), *Zygodontomys lasiurus lasiurus* (Lund, 1841) e *Zygodontomys lasiurus pixuna* Moogen, 1943; Família *ECHIMYIDAE*: *Cercomys cunicularius* Cuvier, 1829 e *Cercomys cunicularius laurentius* (Thomas, 1903); Família *CAVIIDAE*: *Cavia aperea aperea* Erxleben, 1777, *Cavia porcellus porcellus* (Lin., 1758) e *Galea spixii spixii* (Wagner, 1831); Família *DASYPROCTIDAE*: *Dasyprocta azarae azarae* Lichtenstein, 1823; Família *ERETHIZONTIDAE*: *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820); Família *MURIDAE*: *Mus musculus brevirostris* Waterhouse, 1837, *Rattus norvegicus norvegicus*

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

(1) Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

(Berkenhout, 1769) e *Rattus rattus rattus* (Lin., 1758).

No decurso de nossos estudos sobre reservatórios silvestres do *T. cruzi* encontramos um exemplar do rato silvestre, *Holochilus brasiliensis leucogaster* (Brandt, 1835), capturado em Itapira, São Paulo, Brasil, naturalmente infectado. O estudo da amostra isolada desse animal constitui objeto do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de *T. cruzi* ora em estudos foi isolada mediante xenodiagnóstico e subsequente inoculação em camundongos brancos com 20 dias de idade. Uma vez isolada em camundongos, foi mantida nesses animais mediante inoculação intraperitoneal de sangue de doadores com infecção aguda, sendo os repiques feitos com intervalos de 25 a 30 dias.

Os métodos usados para o estudo da morfologia, da biologia e da patogenicidade da amostra isolada do *Holochilus brasiliensis leucogaster* foram aqueles descritos por ALBUQUERQUE & BARRETTO^{1,2} e, por isso, deixamos de entrar em detalhes a esse respeito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia das formas sanguícolas — A observação dos caracteres morfológicos e a obtenção de dados biométricos foram realizadas em esfregaços de sangue colhido de camundongos experimentalmente infectados, em plena fase aguda da infecção.

A despeito de certo polimorfismo observamos nessas preparações uma predominância grande de formas em C com comprimento e largura moderados. Raramente encontramos formas longas e delgadas ou forma largas, mas nunca tão delgadas quanto as observadas por FUNAYAMA & BARRETTO⁷ na amostra isolada do morcego, *Desmodus rotundus rotundus*, nem tão largas quanto as vistas por FUNAYAMA & BARRETTO⁸ na amostra isolada do símio, *Alouatta caraya*.

Nas Figuras 1-30 apresentamos desenhos obtidos por decalque de imagens de 30 tripanossomos observados ao acaso, e projetadas

com auxílio de um microprojektor Leitz. Os resultados da micrometria, efetuada com curvímeter sobre esses desenhos, são sumariados no Quadro I.

A análise desse quadro indica que as medidas obtidas, em particular o comprimento total médio, a largura média e o índice nuclear médio, caem dentro dos limites de variação obtidos por FERRIOLLI, BARRETTO & CARVALHEIRO⁶ e por BELDA NETO⁴ para amostras de *T. cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas.

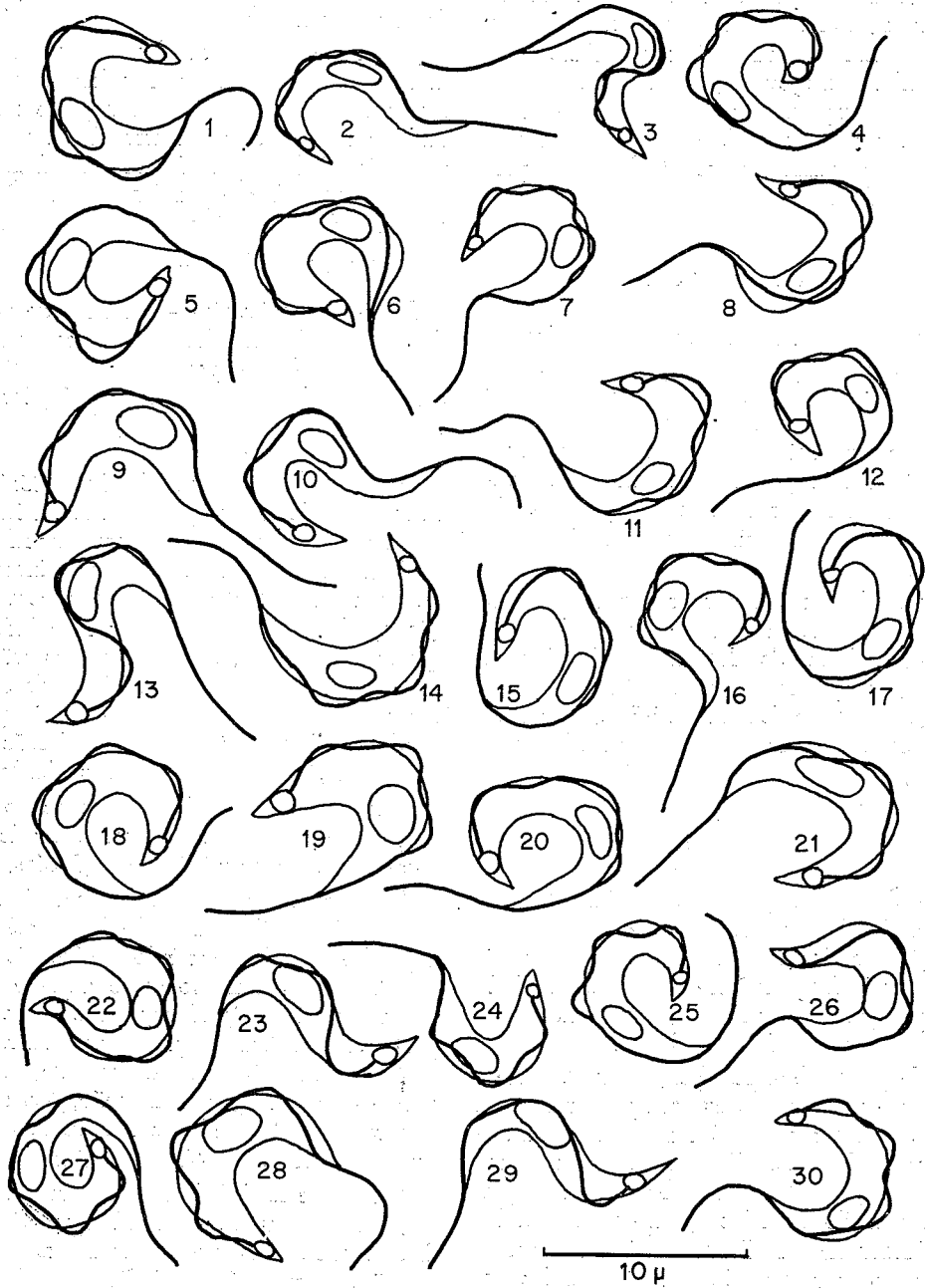
Elementos teciduais — O exame de camundongos sacrificados durante a fase aguda da infecção revelou a presença de discretos ninhos de leishmânias em alguns órgãos e tecidos, especialmente no coração.

Infecção de animais de laboratório — Para o estudo do comportamento da infecção fizemos passagens seriadas em camundongos com 20 dias de idade, mediante inoculação de 0,2 ml de sangue de doadores com infecção aguda. Todos os animais inoculados adquiriram a infecção. Nos repiques três, seis e nove, empregamos lotes maiores de camundongos, deles separando 30 animais para a verificação dos caracteres da infecção. No Quadro II, resumimos os dados obtidos.

O exame desse quadro mostra que o período prepatente foi bem longo, variando entre 8 e 14 dias, com média de 10,9 dias.

A parasitemia, embora variável mesmo entre animais de um dado lote, mostrou-se algo elevada, ultrapassando o nível de 1.000 flagelados por mm³ no acme da fase aguda, em todos os camundongos inoculados. A parasitemia máxima, que variou entre 1022 e 9625, foi atingida tardiamente, entre o 29.º e 48.º dia após a infecção, nos animais que sobreviveram. Nestes a duração da fase aguda variou entre 41 e 72 dias.

A taxa de letalidade foi relativamente baixa; apenas quatro camundongos vieram a falecer entre o 26.º e o 41.º dia após a inoculação, o que dá um índice de 13,3%. A morte sobreveio, via de regra, em plena fase aguda. Não houve correlação entre gravidade da infecção, traduzida pela parasitemia, e a mortalidade, pois o animal que apresentou a maior parasitemia (CIX-7) sobreviveu, enquanto outro com parasitemia máxima me-



Figs. 1-30 — Desenhos de tripanossomos sanguícolas de camundongos infectados experimentalmente com a amostra de *T. cruzi* isolada de *Holochilus brasiliensis leucogaster*.

BARRETTO, M. P. & RIBEIRO, R. D. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LV — Infecção natural do rato, *Holochilus brasiliensis leucogaster* (Brandt, 1835) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16:270-275, 1974.

QUADRO I

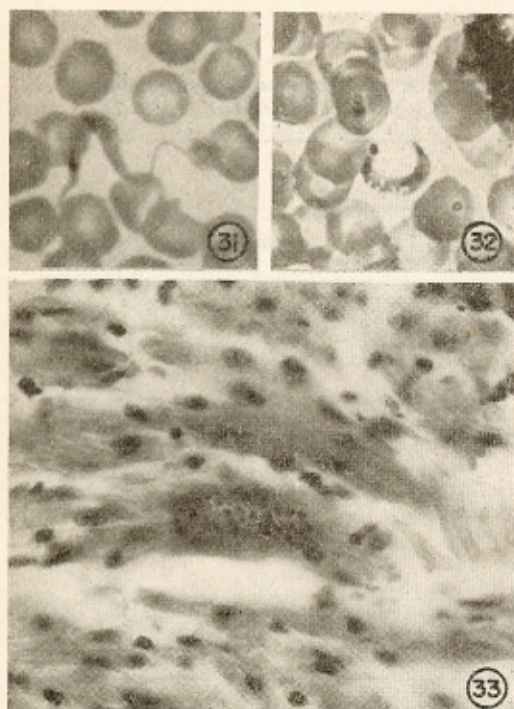
Resultados da micrometria em tripanossomos sanguícolas de camundongos experimentalmente inoculados com a amostra de *T. cruzi* isolada de *Holochilus brasiliensis leucogaster*

Especificação	Medidas em μ		
	mínima	máxima	média
Comprimento do flagelo	4,29	7,86	5,79
Distância NA	4,29	8,58	5,80
Distância PN	6,43	10,01	7,95
Comprimento do corpo	11,44	17,16	13,75
Comprimento total	17,16	23,30	19,54
Largura do corpo	1,57	3,57	2,24
Diâmetro do cinetoplasto	0,57	1,14	0,83
Relação PN/NA	1,00	2,00	1,37

QUADRO II

Caracteres da infecção de camundongos pela amostra de tripanossomo isolada de *Holochilus brasiliensis leucogaster*

N.º do animal inoculado	Período prepatente, em dias	Parasitemia máxima		Duração da fase aguda, em dias	Observações
		N.º/mm ³	Dias após inoculação		
CIII-1	14	7.840	26	—	Morreu no 26.º dia
CIII-2	13	7.168	45	71	Sobreviveu
CIII-3	13	1.659	35	41	"
CIII-4	14	2.667	34	44	"
CIII-5	12	1.022	30	52	"
CIII-6	11	3.304	29	57	"
CIII-7	14	3.906	36	48	"
CIII-8	9	2.380	41	69	"
CIII-9	12	4.963	36	72	"
CIII-10	11	3.906	35	49	"
CVI-1	12	7.168	41	—	Morreu no 42.º dia
CVI-2	9	2.492	39	65	Sobreviveu
CVI-3	13	1.379	41	69	"
CVI-4	13	2.380	37	59	"
CVI-5	11	4.963	29	51	"
CVI-6	12	2.492	38	62	"
CVI-7	10	1.869	36	58	"
CVI-8	9	2.828	41	45	"
CVI-9	11	4.480	37	55	"
CVI-10	9	1.869	29	35	Morreu no 36.º dia
CIX-1	8	5.418	32	60	Sobreviveu
CIX-2	11	2.191	37	51	"
CIX-3	8	4.620	48	70	"
CIX-4	12	3.199	44	66	"
CIX-5	11	1.372	35	65	"
CIX-6	9	8.491	39	—	Morreu no 39.º dia
CIX-7	9	9.625	45	67	Sobreviveu
CIX-8	10	1.421	30	46	"
CIX-9	9	3.159	35	44	"
CIX-10	8	2.191	32	48	"



Figs. 31-33 — Microfotos de *T. cruzi* em camundongos experimentalmente infectados com a amostra isolada de *Holochilus brasiliensis leucogaster*; Figs. 31 e 32 — tripanossomos sanguícolas (1200 X); Fig. 33 — leishmânias em fibra cardíaca (600 X).

nor (CVI-10) morreu. Os tipos de curvas parasitêmicas variaram muito. De modo geral, porém, a parasitemia, após tornar-se apa-

rente, manteve-se em níveis baixos até o 15.º ou o 20.º dia após a inoculação, para, então, se elevar; daí por diante o comportamento das curvas variou, predominando o tipo irregular.

Infectividade para triatomíneos — Examinando um total de 120 ninfas em quinto estágio, pertencentes a quatro espécies diversas de triatomíneos (*T. infestans*, *T. sordida*, *P. megistus* e *R. neglectus*) e alimentadas em camundongos com infecção aguda, obtivemos os resultados apresentados no Quadro III.

Tais resultados indicam que todas as espécies de triatomíneos experimentados se infectam, sendo o índice de infecção do *P. megistus* o maior. Isto é, aliás, o que sucede com a generalidade das amostras que tem sido isoladas de animais silvestres e estudadas em nosso laboratório.

Cultivabilidade — Mediante a semeadura de algumas gotas de sangue de camundongos com infecção aguda, obtivemos o isolamento da amostra em NNN. Subseqüentemente a amostra foi mantida nesse meio, sempre com bom crescimento, com repiques quinzenais ou mensais.

Imunidade cruzada — Dez camundongos cuja infecção pela amostra em estudo evoluiu para a forma crônica, foram reinoculados, cada um com 0,5 ml de sangue de doadores com infecção aguda pela amostra Y,

QUADRO III

Infectividade de triatomíneos pela amostra de *T. cruzi* isolada de *Holochilus brasiliensis leucogaster*

Espécies	Exemplares alimentados	Exemplares infectados	
		N.º	%
<i>P. megistus</i>	30	29	96,7
<i>T. infestans</i>	30	25	83,3
<i>T. sordida</i>	30	18	60,0
<i>R. neglectus</i>	30	20	73,3

usando-se a via peritoneal para a reinoculação. Dez camundongos limpos, com idade e peso equivalentes aos dos do lote anterior receberam o mesmo inóculo pela mesma via.

Cinco dias após a inoculação, todos os camundongos do lote testemunha já apresentavam parasitemia elevada, vindo a morrer entre o 15.º e o 20.º dia. Os camundongos com infecção prévia pela amostra em estudo, mantiveram-se negativos aos exames a fresco feitos a partir do quinto dia após a reinoculação com a amostra Y.

CONCLUSÃO

Os caracteres morfológicos e biológicos do tripanossomo ora estudado, aliados aos resultados das provas de imunidade cruzada, levam-nos a identificar esse flagela como *T. cruzi* e a considerar o *Holochilus brasiliensis leucogaster* como mais um hospedeiro natural do agente etiológico da tripanossomose americana.

SUMMARY

Studies on wild reservoirs and vectors of Trypanosoma cruzi. LV — Natural infection of the rat, Holochilus brasiliensis leucogaster (Brandt, 1835) by T. cruzi.

A strain of *T. cruzi* was isolated, through xenodiagnosis and subsequent inoculation into baby mice, from a specimen of *Holochilus brasiliensis leucogaster* (Brandt, 1835) trapped at Itapira, State of São Paulo, Brazil.

This strain is pathogenic for mice, infecting one hundred per cent of the animals inoculated with blood from donors with acute infections. Blood trypanosomes in mice have a mean total length of 19.54 μ , a mean width of 2.24 μ and a mean nuclear index of 1.37. Leishmanial forms are seen in tissue sections, specially in the heart of mice killed during the acute phase of the infection. The infection of mice is moderate, with large prepatent period, moderate parasitemia, long duration of the acute phase and low mortality rate (13.3%). Mice recovered from the infection show a good resistance against reinfection by the Y-strain of *T. cruzi*. The *Holochilus* strain is easily cultivated in NNN medium and infects regularly various species of triatomines.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R.D.R. & BARRETTO, M.P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXX — Infecção natural do cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous azaras* (Wied, 1824) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 28:457-468, 1968.
2. ALBUQUERQUE, R.D.R. & BARRETTO, M.P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLIV — Infecção natural da raposa-do-campo, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lund, 1824) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:375-382, 1970.
3. BARRETTO, M.P. — Reservatórios do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. An. I Congr. Argent. Parasitol. (em publicação).
4. BELDA Neto, F.M. — Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Soc. Brasil. Med. trop.* (em publicação).
5. CLARK, H.C. & DUNN, L.H. — Experimental studies on Chagas' disease in Panama. *Amer. J. Trop. Med.* 12:49-77, 1932.
6. FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETTO, M.P. & CARVALHEIRO, J.R. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXIV — Variação dos dados biométricos obtidos em amostras de *T. cruzi*, isoladas de casos humanos da doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 2:1-8, 1968.
7. FUNAYAMA, G.K. & BARRETTO, M.P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII — Infecção natural do morcego, *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 30:13-19, 1970.
8. FUNAYAMA, G.K. & BARRETTO, M.P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLII — Infecção natural do simio, *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:257-265, 1970.
9. RIBEIRO, R.D. — Contribuição para o estudo da infecção natural de roedores brasileiros pelo *Trypanosoma cruzi*. Tese Concurso Docência-Livre. Faculdade de Farmácia e Odontologia, Ribeirão Preto, 1971, 101 pp. (mimeografado).
10. RIBEIRO, R.D. — Novos reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* (em publicação).