

## ESTUDOS SÓBRE RESERVATÓRIOS E VECTORES SILVESTRES DO *TRYPANOSOMA CRUZI*. XLIX — SINONÍMIA DO *TRYPANOSOMA* *AKODONI* CARINI E MACIEL, 1915 EM *T. CRUZI* CHAGAS, 1909

Rosa Domingues RIBEIRO e Mauro Pereira BARRETTO (1)

### RESUMO

Amostra de *Trypanosoma cruzi* foi isolada, mediante xenodiagnóstico e subseqüente inoculação em ratos brancos jovens, a partir de um exemplar do rato *Akodon nigrinus nigrinus* (Lichtenstein, 1829), capturado em Ipanema, SP. Camundongos jovens inicialmente inoculados com formas metacíclicas provenientes de triatomíneos usados no xenodiagnóstico, mostraram-se negativos; mas inoculados com sangue de ratos infetados experimentalmente, contraíram a infecção em 100% dos casos. Os tripanossomos no sangue de camundongos medem em média 23,65  $\mu$  de comprimento e 2,92  $\mu$  de largura máxima e têm índice nuclear médio de 1,34. Nos animais mortos durante a fase aguda da infecção observaram-se ninhos de leishmânias, especialmente no miocárdio. A infecção dos camundongos foi relativamente grave, com período prepatente médio de 6,9 dias, parasitemia relativamente elevada, fase aguda de longa duração e taxa de letalidade de 53,3%. A amostra ora estudada confere aos animais que sobrevivem boa resistência contra reinfeção pela amostra Y de origem humana. Cultiva-se bem em meios líquidos e difásicos e infecta bem triatomíneos, dando os seguintes índices de infecção: *P. megistus* — 93,3%, *T. infestans* — 80,0%, *T. sordida* — 80,0% e *R. neglectus* — 82,1%. A validade específica do *T. akodoni* CARINI & MACIEL, 1915, observado por seus Autores na mesma espécie de rato, é discutida e a sinonímia daquele tripanossomo em *T. cruzi* é proposta.

### INTRODUÇÃO

CARINI & MACIEL<sup>11</sup> encontraram no sangue de um exemplar de *Akodon fuliginosus*, capturado em Apiaí, SP, um tripanossomo que consideraram semelhante ao *T. cruzi* e ao qual deram o nome de *Trypanosoma akodoni*. Segundo CABRERA<sup>10</sup>, o *Akodon fuliginosus* (Wagner, 1845) é sinônimo de *Akodon nigrinus nigrinus* (Lichtenstein, 1829) que seria, assim, o nome específico correto do hospedeiro do referido tripanossomo.

Como assinalou BARRETTO<sup>6</sup>, o aspecto morfológico desse tripanossomo é idêntico ao do agente etiológico da doença de Chagas; por outro lado, os dados biométricos citados por CARINI & MACIEL<sup>11</sup> não permitem a distinção, pois caem dentro dos limites de variação apontados por FERRIOLLI & col.<sup>12</sup> para amostras de *T. cruzi* isoladas do homem e de animais silvestres.

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

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

O *T. akodoni*, segundo seus Autores, não é patogênico para animais de laboratório; CARINI & MACIEL<sup>11</sup> não obtiveram resultados positivos em tentativas de infecção mediante a inoculação de sangue do rato silvestre, em cobaias, ratos e gatos recém-nascidos. Por outro lado, não conseguiram resultados positivos em tentativas de infecção de ninfas de *Triatoma infestans*. Mas êsses resultados negativos não têm o significado que se lhes poderia emprestar, como afirma BARRETTO<sup>6</sup>. De fato, a inoculação de sangue de animais silvestres com infecção crônica, em animais de laboratório, particularmente ratos e camundongos jovens, muitas vezes dá resultados negativos, como assinala BARRETTO<sup>4, 5</sup>. O mesmo se diga a respeito do xenodiagnóstico; como demonstrou ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, alimentando-se triatomíneos de diferentes espécies em animais de laboratório com infecção crônica produzida por várias amostras de *T. cruzi*, muitas vezes se obtêm resultados negativos; aliás resultados negativos se obtêm, às vezes, mesmo em xenodiagnósticos de animais de laboratório com infecção aguda. Por essas razões, BARRETTO<sup>6</sup> sugeriu a sinonímia de *T. akodoni* em *T. cruzi*.

No curso de nossas investigações sobre reservatórios silvestres do *T. cruzi*, tivemos a oportunidade de isolar, mediante xenodiagnóstico, uma amostra de tripanossomo de um exemplar de *Akodon nigritus nigritus* capturado no Município de Ipanema, SP. Em trabalho anterior de um de nós (RIBEIRO<sup>16</sup>) êsse exemplar foi, por engano, identificado como *Akodon nigritus subterraneus* (Hensel, 1873), subespécie que, segundo CABRERA<sup>10</sup>, só ocorre no extremo sul do Brasil. O estudo dos caracteres da referida amostra constituiu objeto do presente trabalho.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A amostra do rato, que recebeu o número R1523, foi isolada por xenodiagnóstico e, em seguida, inoculada em ratos Wistar e camundongos brancos jovens. Ao exame de sangue, os ratos inoculados mostraram-se positivos, enquanto os camundongos permaneceram negativos.

Paritido de ratos positivos inoculamos cinco camundongos jovens e desta vez con-

seguimos infetá-los. Subseqüentemente, a amostra foi mantida em camundongos mediante subinoculações feitas com intervalos de 15 a 25 dias.

Os métodos usados para inoculação, controle da parasitemia, estudo morfológico das formas sanguícolas e tissulares, verificação da suscetibilidade de triatomíneos, desenvolvimento em meios artificiais de cultura e existência de imunidade cruzada foram aqueles descritos por ALBUQUERQUE & BARRETTO<sup>2, 3</sup> e, por isso, deixamos de entrar em maiores detalhes a respeito.

#### RESULTADOS

*Morfologia das formas sanguícolas* — Os tripanossomos observados em esfregaços de sangue de camundongos apresentam os caracteres gerais do *T. cruzi*, isto é, tamanho moderado, cinetoplasto volumoso e situado nas proximidades da extremidade posterior, núcleo situado no terço médio, membrana ondulante com poucas (três ou quatro) ondulações e flagelo curto (Figs. 1-33).

Nas diversas preparações observadas ao acaso há nítida predominância de formas em C ou S itálico, de largura e comprimento moderados. Mais raramente se observam formas delgadas (Figs. 5 e 10) ou largas (Fig. 27), mas não tão delgadas como as encontradas por FUNAYAMA & BARRETTO<sup>13, 14</sup> nas amostras isoladas dos morcegos *Desmodus rotundus rotundus* e *Tadarida laticaudata*, ou tão largas como as observadas por FUNAYAMA & BARRETTO<sup>15</sup> na amostra isolada do bugio *Alouatta caraya*. De fato, nas Figs. 1-30 apresentamos desenhos de tripanossomos observados ao acaso no sangue de vários camundongos, desenhos êsses obtidos por decalque de imagens projetadas com auxílio de um microprojektor Leitz; os resultados da micrometria, efetuada com curvímeter sobre tais desenhos, deu os resultados sumariados no Quadro I.

O exame dêsse quadro mostra que as medidas obtidas, em particular o comprimento total médio (23,65  $\mu$ ), a largura média (2,92  $\mu$ ) e o índice nuclear médio (1,34), caem dentro dos limites de variação observadas por FERRIOLLI & col.<sup>12</sup> em amostras de *T. cruzi* isoladas do homem e de diversos animais silvestres.



Figs. 1-30 — Desenhos de tripanossomos sanguícolas observados em camundongos infetados com a amostra de *T. cruzi* isolada do *Akodon nigritus nigritus*.

QUADRO I

Resultados da micrometria realizada sobre tripanossomos do sangue periférico de camundongos experimentalmente infetados com a amostra do *Akodon nigrinus nigrinus*

Especificação	Medidas em $\mu$		
	Mínima	Máxima	Média
Comprimento do flagelo	4,0	14,0	7,88
Distância NA	4,0	10,0	6,72
Distância PN	6,0	12,0	9,04
Comprimento do corpo	13,0	20,5	15,77
Comprimento total	19,0	28,2	23,65
Largura do corpo	1,1	4,6	2,92
Diâmetro do cinetoplasto	0,5	1,5	0,97
Relação PN/NA	0,7	3,0	1,34

*Morfologia das formas tissulares* — O exame de cortes de tecidos e vários órgãos de camundongos sacrificados durante a fase aguda da infecção mostrou a presença de ninhos de leishmânias principalmente em fibras cardíacas (Fig. 33). Essas leishmânias são idênticas às do *T. cruzi*. Não se observaram elementos aflagelados em impressões de órgãos.

*Infecção de Animais de laboratório* — A amostra ora em estudos depois de isolada em camundongos, mostrou-se patogênica em 100% dos casos tanto para camundongos como para ratos jovens, inoculados por via peritoneal com sangue de doadores com infecção aguda.

Para estudo do comportamento da infecção destinamos 30 camundongos dentre os inoculados no terceiro, sexto e oitavo repiques. Os caracteres gerais da infecção são sumariados no Quadro II.

A análise desse quadro mostra que o período prepatente variou entre cinco e nove dias, com média de 6,9 dias.

A parasitemia, embora variável, mesmo entre animais de um dado lote, mostrou-se em geral elevada, superando o nível de 1.000 parasitas por  $\text{mm}^3$  de sangue, no acme da infecção; em 60% dos casos a parasitemia superou o nível de 5.000 flagelados por  $\text{mm}^3$  de sangue.

A duração da fase aguda, nos animais que sobreviveram, variou entre 31 e 52 dias. A taxa de letalidade foi relativamente alta, isto é, de 53,3%, vindo os camundongos a falecer entre o 11.º e o 44.º dia após a inoculação. Todos os animais morreram durante a fase aguda. Releva acentuar que a data da morte, na maioria dos casos, coincidiu com o da parasitemia máxima, em plena fase ascensional da infecção. Em outros animais a morte sobreveio quando a parasitemia já se achava em declínio. Finalmente outros camundongos morreram durante um segundo ou terceiro surto parasitêmico.

Como se depreende do que ficou dito acima, os tipos de curvas parasitêmicas variaram. De modo geral observamos cinco padrões: ascensão e queda regulares (raro), ascensão regular e queda irregular, ascensão irregular e queda regular, ascensão e queda irregulares e completa irregularidade com três ou quatro picos.

*Infetividade para triatomíneos* — Para verificar a infetividade da amostra de tripanossomos em estudos, empregamos 119 ninfas em quinto estágio que se alimentaram em camundongos com infecção aguda. Os resultados do exame do conteúdo intestinal desses triatomíneos são sumariados no Quadro III.

A análise desses resultados mostra que todas as quatro espécies se infetaram bem, sendo, porém, a suscetibilidade do *P. megistus* maior que a das outras.

*Cultivabilidade* — O isolamento da amostra *Akodon* em meio de Novy-MacNeal e de Warren foi conseguido através de semeadura de algumas gotas de sangue de camundongos com infecção aguda. Nos repiques sucessivos, feitos com intervalos de 30 dias, observamos sempre bom crescimento em todos os tubos de cultura.

*Provas de proteção* — Dez camundongos com infecção crônica pelo tripanossomo do

QUADRO II

Caracteres gerais da infecção de camundongos pela amostra de tripanossomo do *Akodon nigrinus nigrinus*

N.º do animal	Período prepatente (dias)	Parasitemia máxima		Fase aguda (dias)	Observações
		N.º/mm <sup>3</sup>	Dia		
CIII — 1	7	4935	31.º	43	Sobreviveu
CIII — 2	8	8260	31.º	33	Sobreviveu
CIII — 3	7	9975	34.º	48	Sobreviveu
CIII — 4	7	3920	31.º	31	Sobreviveu
CIII — 5	8	11830	34.º	47	Sobreviveu
CIII — 6	7	6055	36.º	34	Sobreviveu
CIII — 7	7	7714	34.º	43	Sobreviveu
CIII — 8	8	1925	29.º	33	Sobreviveu
CIII — 9	7	2786	34.º	43	Sobreviveu
CVI — 1	8	2380	27.º	40	Sobreviveu
CVI — 2	7	12915	25.º	—	Morreu no 30.º dia
CVI — 3	9	13615	36.º	46	Sobreviveu
CVI — 4	7	18247	25.º	—	Morreu no 26.º dia
CVI — 5	8	8687	39.º	—	Morreu no 44.º dia
CVI — 6	8	23527	34.º	—	Morreu no 37.º dia
CVI — 7	7	3990	22.º	—	Morreu no 23.º dia
CVI — 8	9	4067	39.º	48	Sobreviveu
CVI — 9	8	5110	36.º	52	Sobreviveu
CVI — 10	6	10710	25.º	44	Sobreviveu
CVI — 11	7	30247	25.º	—	Morreu no 26.º dia
CVIII — 1	6	8190	29.º	—	Morreu no 31.º dia
CVIII — 2	6	11305	13.º	—	Morreu no 14.º dia
CVIII — 3	6	6797	22.º	—	Morreu no 23.º dia
CVIII — 4	5	3395	13.º	—	Morreu no 14.º dia
CVIII — 5	6	3598	27.º	—	Morreu no 28.º dia
CVIII — 6	6	6937	24.º	—	Morreu no 25.º dia
CVIII — 7	6	7980	24.º	—	Morreu no 25.º dia
CVIII — 8	5	3689	13.º	—	Morreu no 14.º dia
CVIII — 9	6	2940	13.º	—	Morreu no 14.º dia
CVIII — 10	6	1606	10.º	—	Morreu no 11.º dia

*Akodon* foram inoculados por via peritoneal, cada um com 0,3 ml de sangue citratado obtido por punção cardíaca de animais com infecção aguda pela amostra Y. Como testemunhas foram inoculados, com o mesmo inóculo e pela mesma via, 10 camundongos normais com idade equivalente à dos do lote anterior.

O exame desses animais mostrou que, dos 10 camundongos com infecção crônica, dois mantiveram-se negativos e oito apresentaram parasitemias muito baixas. Todos os animais do lote testemunha contraíram infecção grave e vieram a morrer 15 a 20 dias após a inoculação.

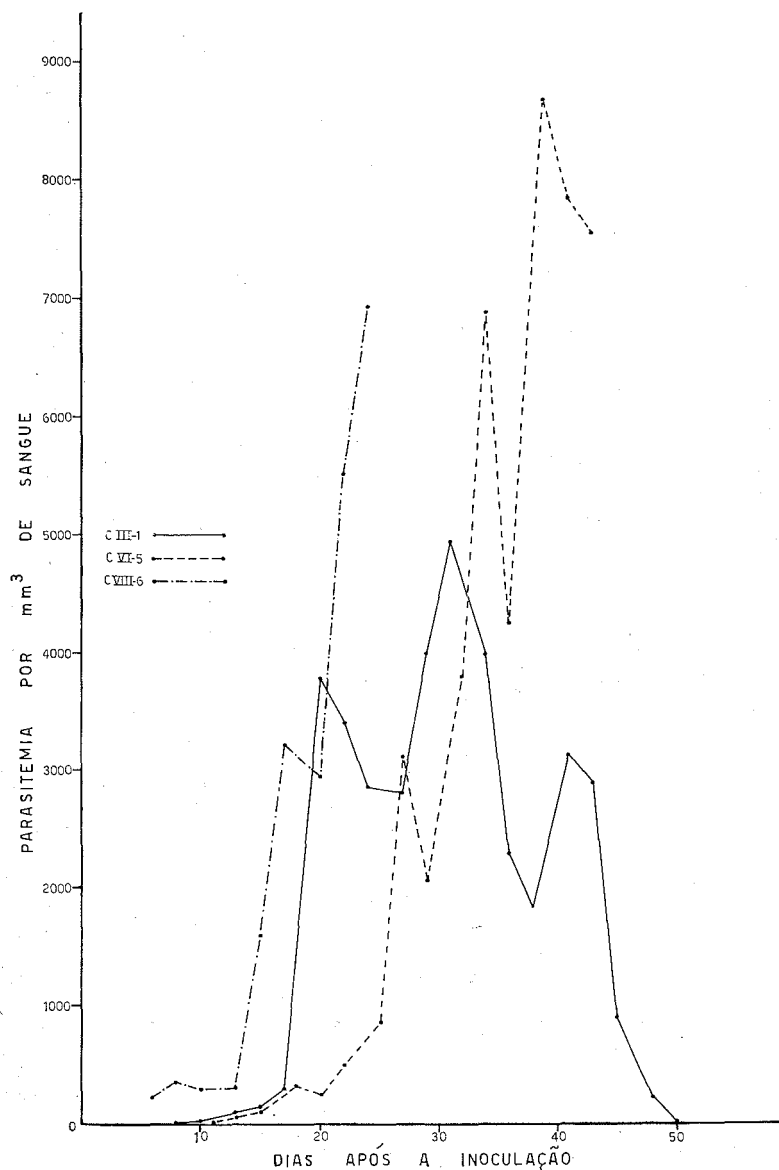


Gráfico I — Tipos de curvas parasitêmicas observadas em camundongos infectados com a amostra de *T. cruzi* isolada do *Akodon nigrítus nigrítus*.

QUADRO III

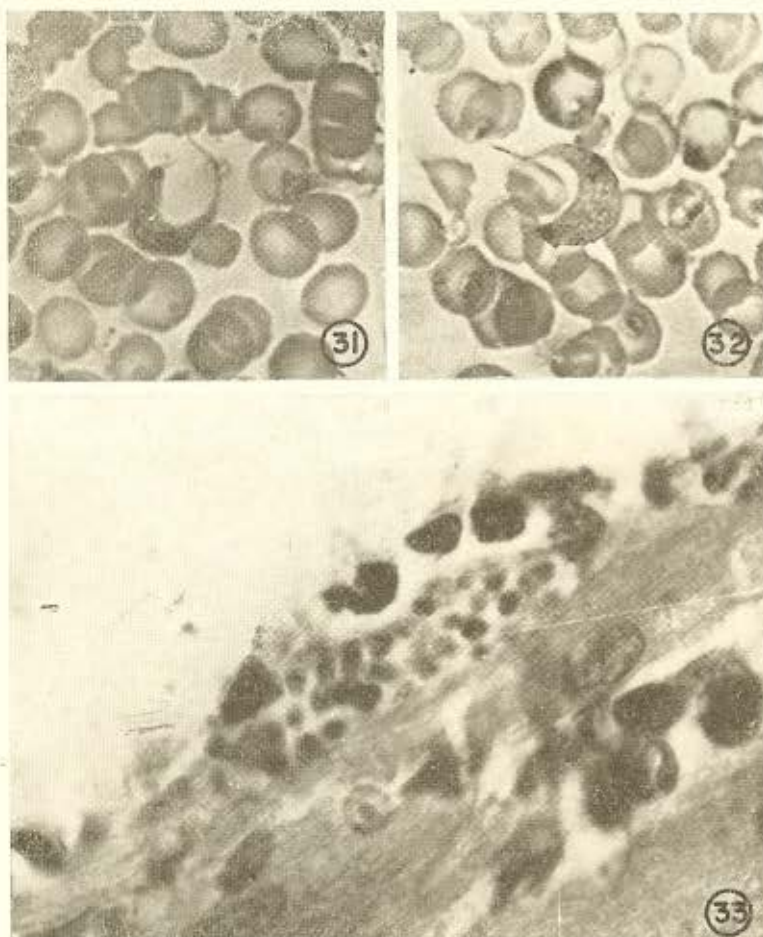
Suscetibilidade de triatomíneos à amostra de tripanossomo isolada do *Akodon nigrinus nigrinus*

Triatomíneo	Exemplares alimentados	Exemplares positivos	
		N.º	%
<i>Panstrongylus megistus</i>	30	38	93,3
<i>Triatoma infestans</i>	30	24	80,0
<i>Triatoma sordida</i>	30	24	80,0
<i>Rhodnius neglectus</i>	29	23	82,1

COMENTARIOS FINAIS

Os caracteres morfológicos, biológicos e patogênicos atrás analisados, aliados aos resultados da prova de proteção, permitem-nos identificar com *T. cruzi* o flagelado do *Akodon nigrinus nigrinus* (Lichtenstein, 1829), e a considerar esse roedor como hospedeiro natural do agente etiológico da tripanossomose americana.

Os dados biométricos do *T. akodoni*, apresentados por CARINI & MACIEL<sup>13</sup>, em particular o comprimento total (19-22  $\mu$ ), a largura máxima (2-2,5  $\mu$ ) e o índice nuclear por nós calculado (0,94-1,17) parecem dife-



Figs. 31-33 — Microfotografias de formas de *T. cruzi* observadas em camundongos infetados com a amostra isolada do *Akodon nigrinus nigrinus* (1200  $\times$ ); Figs. 31-32 — Tripanossomos sanguíneos; Fig. 33 — Leishmânias em fibra cardíaca.

rir um pouco dos que obtivemos para a amostra ora em estudos. Mas variações ocorrem entre populações de tripanossomos observados em exemplares diferentes de uma mesma espécie de mamífero, como demonstram os dados sobre amostras humanas, estudadas por FERRIOLLI & col.<sup>12</sup>, ou sobre amostras de gambás, cuícas e ratos, estudadas respectivamente por BARRETTO & col.<sup>7</sup>, BARRETTO & col.<sup>8</sup> e BARRETTO & col.<sup>9</sup>. Assim sendo, não vemos razão para considerar o *T. akodoni* como espécie distinta do *T. cruzi*.

Quanto à alegada falta de patogenicidade do *T. akodoni* para animais de laboratório e à sua não infetividade para triatomíneos, já discutimos na introdução deste trabalho a relatividade desses dados negativos de CARINI & MACIEL<sup>11</sup>. Assim, pois, consideramos o *T. akodoni* como sinônimo de *T. cruzi*.

#### SUMMARY

*Studies on wild reservoirs and vectors of Trypanosoma cruzi*. XLIX — *Synonymy of Trypanosoma akodoni* Carini and Maciel, 1915 in *T. cruzi* Chagas, 1909.

A strain of *T. cruzi* was isolated, through xenodiagnosis, from a wild rat, *Akodon nigrurus nigrurus* (Lichtenstein, 1829), trapped at Ipanema, SP, Brazil. This strain is pathogenic for baby white rats and mice, infecting one hundred per cent of the animals inoculated with blood from acutely infected donors.

Blood trypanosomes in experimentally infected mice have a mean total length of 23.65  $\mu$ , a mean width of 2.92  $\mu$  and a mean nuclear index of 1.34. Leishmanial forms were seen in tissue sections, specially in the heart. The infection in mice was relatively severe, with a mean prepatent period of 6.9 days, high parasitemia, acute phase of long duration and letality rate of 53.3 per cent. Protection tests show that a previous infection by the *Akodon* strain produces a high resistance against the infection by the Y strain of *T. cruzi*. The rat trypanosome is easily cultivated in liquid and diphasic media and infects regularly various species of triatomines.

The specific validity of *Trypanosoma akodoni* Carini and Maciel, 1915, described from the same host, *Akodon nigrurus nigrurus*, (= *Akodon fuliginosus*), is discussed and rejected, *T. akodoni* being considered synonymous of *T. cruzi*.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R. — *Estudo comparativo entre o valor dos xenodiagnósticos seriados e o das culturas de sangue e de triturados de órgãos para o diagnóstico da tripanossomose experimental na fase crônica*. Tese. Fac. Farm. Odontol., Ribeirão Preto, 47 pgs., 1968 (mimiofotografada).
2. ALBUQUERQUE, R. D. R. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVI — Infecção natural do rato d'água, *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:229-237, 1968.
3. 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 azarae* (Wied, 1824) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 28:457-468, 1968.
4. BARRETTO, M. P. — Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 16:527-552, 1964.
5. BARRETTO, M. P. — Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação como o agente etiológico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:305-315, 1965.
6. BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLIII — Sobre a validade das espécies americanas de flagelados incluídos no subgênero *Schizotrypanum* Chagas, 1909 do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:272-278, 1970.
7. BARRETTO, M. P.; SIQUEIRA, A. F.; CORRÊA, F. M. A.; FERRIOLLI FILHO, F. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VII — Investigações sobre a infecção natural de gambás por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 24:289-300, 1964.
8. BARRETTO, M. P.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI FILHO, F. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. X — Obser-



- vações sobre a infecção natural e experimental da cuica, *Lutreolina crassicaudata crassicaudata* (Desm., 1904) por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 25:237-248, 1965.
9. BARRETTO, M. P.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI FILHO, F. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XX — Infecção natural de ratos comensais, capturados em biótopos naturais e artificiais, por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 27:145-156, 1967.
  10. CABRERA, A. — *Catalogos de los mamiferos de America del Sur*. *Rev. Mus. Argent. Ci. Nat. Bernardino Rivadavia* 4:1-307, 1957; 4:309-752, 1960.
  11. CARINI, A. & MACIEL, J. — Sur une hémodogrégarine et un trypanosome d'un muridé (*Akodon fuliginosus*). *Bull. Soc. Path. Exot.* 8:165-169, 1915.
  12. FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETTO, M. P. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVI — Variação dos dados biométricos obtidos em amostras do *T. cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. trop.* 2:1-8, 1968.
  13. FUNAYAMA, G. K. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII — Infecção natural do morcêgo, *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 30:13-19, 1970.
  14. FUNAYAMA, G. K. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLI — Infecção natural do morcêgo, *Tadarida laticaudata* (Geoffroy, 1805) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 30:439-445, 1970.
  15. FUNAYAMA, G. K. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLII — Infecção natural do símio, *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:257-265, 1970.
  16. RIBEIRO, R. D. — *Contribuição para o estudo da infecção natural de roedores brasileiros pelo Trypanosoma cruzi*. Tese. Fac. Farm. Odontol., Ribeirão Preto, 97 pgs., 1971 (mimiografada).

Recebido para publicação em 22/10/1971.