

TRIPANOSSOMOS SEMELHANTES AO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM ANIMAIS SILVESTRES E SUA IDENTIFICAÇÃO COM O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Mauro Pereira BARRETTO (1)

RESUMO

O Autor analisa demoradamente o problema da identificação de tripanossomos encontrados em mamíferos, com o *T. cruzi*, e conclui que, pelo menos, os seguintes elementos devam ser tomados em consideração: 1) semelhança morfológica; 2) coincidência dos dados biométricos, particularmente o comprimento total médio e o índice nuclear médio; 3) cultivabilidade em meios contendo ágar-sangue; 4) evolução no tubo digestivo de triatomíneos com desenvolvimento de tripanossomos metacíclicos no intestino posterior; 5) infetividade para animais de laboratório, particularmente para o camundongo e os ratos jovens; 6) multiplicação sob a forma de leishmânias nos tecidos do hospedeiro vertebrado, natural ou experimental; 7) desenvolvimento de imunidade contra amostras virulentas de origem humana.

Mostra a variabilidade de cada um destes caracteres, com a possível exceção da imunidade cruzada, e conclui pela necessidade de se apreciarem todos eles em conjunto para se chegar à identificação de um tripanossomo de mamífero com o agente da doença de Chagas, com razoável margem de segurança.

INTRODUÇÃO

Como se sabe, a doença de Chagas é uma zoonose. Segundo tudo indica, a tripanosomiase americana era, primitivamente, uma enzootia, afetando exclusivamente mamíferos silvestres e sendo transmitida por triatomíneos de hábitos silvestres. Com a invasão dos abrigos de animais domésticos e das habitações humanas por triatomíneos e a adaptação progressiva destes aos ecótipos artificiais, o *T. cruzi* passou a infetar o homem e os animais domésticos suscetíveis, em particular o cão e o gato. Uma vez alcançada a completa domiciliação por parte de algumas espécies de triatomíneos, o parasita passou a ter o ciclo biológico limitado, fundamentalmente, ao homem, animais domésticos

e inseto vector, deixando, então, os mamíferos silvestres de desempenhar papel essencial na cadeia epidemiológica da doença.

Acontece, porém, que, mesmo depois de estabelecido este ciclo doméstico do *T. cruzi*, persiste ainda o ciclo silvestre; este, nas áreas em que o ciclo doméstico é interrompido pela eliminação de triatomíneos mediante expurgo domiciliar e peridomiciliar com inseticidas de poder residual, continua ativo e constitui focos extradomiciliários de onde a infecção pode ser trazida eventualmente para as habitações humanas e anexos. Daí a importância que tem o conhecimento destes focos naturais representados por reservatórios e vectores silvestres.

Trabalho do Departamento de Parasitologia (Diretor: Prof. Dr. Mauro Pereira Barretto), Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, São Paulo, apresentado na XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Belo Horizonte, 7 de julho de 1965.

(1) Professor catedrático

Reconhecido, desde os primeiros trabalhos de Chagas^{14, 15}, o caráter zoonótico da tripanosomíase americana, vários pesquisadores, em diferentes épocas e em diversos países da América, têm procurado a infecção pelo *T. cruzi* em animais domésticos e silvestres. Em consequência destas pesquisas descobriram-se flagelados idênticos ou semelhantes ao agente etiológico da doença de Chagas, em cerca de uma centena de espécies ou subespécies de mamíferos.

Quanto à identificação destes flagelados, poderíamos dizer que, a princípio, houve uma tendência unicista: todos os tripanossomos de tamanho médio, com núcleo central ou subcentral e com cinetoplasto grande e subterminal seriam efetivamente *T. cruzi*. Só fariam exceção alguns parasitas de morcêgos americanos, que, a partir de LAVERAN & MESNIL³⁶, foram identificados como *T. vespertilionis*. Mas, segundo DIAS²³, mesmo estes flagelados não seriam distintos do *T. cruzi*; estribado na semelhança morfológica dos parasitas e em suas observações sobre o comportamento do tripanossomo de *Phyllostomus hastatus*, concluiu que o *T. vespertilionis* e o *T. cruzi* "são uma única espécie, ou podem, quando muito, ser considerados subespécies, raças ou variedades do mesmo parasita". A prevalecer este ponto de vista, o *T. cruzi* cairia em sinonímia do *T. vespertilionis* que lhe tem prioridade.

Mais tarde, porém, o próprio DIAS²⁴, baseado em estudos biométricos e em pesquisas sobre o comportamento biológico de tripanossomos animais, em particular de morcêgos, tornou-se pluralista, passando a admitir a existência do grupo *cruzi* que incluiria, além das duas espécies acima mencionadas, outras formas afins.

Cabem aqui várias questões de grande importância epidemiológica: 1) serão os tripanossomos encontrados nos animais realmente *T. cruzi* ou flagelados semelhantes, mas não idênticos, ao agente etiológico da doença de Chagas? 2) deverão todos os animais infetados pelo verdadeiro *T. cruzi* ser considerados como reservatórios ou, como querem DIAS & col.²⁶, apenas aqueles mamíferos que albergam amostras virulentas do parasita? 3) quais dos animais infetados pelo *T. cruzi* constituirão importantes

fontes de infecção para o homem, em virtude de seus hábitos, de sua freqüência, de seus índices de infecção e de suas relações com triatomíneos que habitualmente entram em contato com o homem? 4) haverá amostras de *T. cruzi* de origem animal que sejam destituídas de virulência e, portanto, de importância?

A despeito de pesquisas que vêm sendo realizadas nestes últimos anos em várias instituições nacionais e estrangeiras, visando resultados que permitem dar respostas adequadas a estas e outras questões sobre o mesmo assunto, estes resultados são ainda muito fragmentários, como assinala DEANE²⁰. Aliás, deixaremos de abordar este aspecto do problema, visto que ele constituiu objeto de análise detalhada em recentes trabalhos de DEANE²⁰ e BARRETTO³. Procuraremos, sim, discutir os critérios de identificação, isto é, os elementos de que podemos atualmente lançar mão para, diante de um tripanossomo encontrado em determinado mamífero, decidirmos se se trata ou não do *T. cruzi*. Cumpre-nos assinalar que este aspecto do problema já foi encarado em trabalhos anteriores de PESSÔA^{48, 49}, DEANE²⁰ e BARRETTO³. Por outro lado, queremos deixar claro que não procuraremos fazer análise crítica detalhada de todos os achados, mas citar apenas alguns casos exemplificativos que corroborem nosso ponto de vista a respeito dos critérios de identificação que iremos, em seguida, abordar.

1) *Morfologia* — O aspecto morfológico dos tripanossomos em esfregaços cuidadosamente confeccionados e corados constitui o primeiro elemento de identificação. Com efeito, o *T. cruzi*, como dissemos, é pequeno e delgado, apresenta-se geralmente com aspecto de *C* ou *S* itálico, tem núcleo central ou subcentral, cinetoplasto arredondado ou ovóide, grande e de situação subterminal, e membrana ondulante delicada e com pequeno número de ondulações.

O simples aspecto morfológico das formas sanguícolas é, todavia, falaz, pois há tripanossomos que têm os caracteres acima apontados e, no entanto, são diferentes do *T. cruzi*. É o que sucede, por exemplo, com o *T. sanmartini*, descrito por GARNHAM & GONZALEZ³¹.

2) *Biometria* — Diante disto e baseado em trabalhos anteriores de PEARSON⁴⁷ e HOARE & BROOM^{34, 35} sobre tripanossomos africanos, DIAS²⁴ e DIAS & FREITAS²⁵ aplicaram métodos biométricos ao estudo dos tripanossomos de morcegos. Além do comprimento do corpo e do flagelo, calcularam a relação PN/NA, que define a posição média do núcleo; é o índice que se obtém tomando a média das distâncias que vão da extremidade posterior ao meio do núcleo, medidas sobre diversos tripanossomos de uma amostra, e dividindo-a pela média das distâncias que vão ao meio do núcleo à extremidade anterior, tomadas sobre os mesmos tripanossomos.

Com base nestes elementos, julga DIAS²⁴ possível distinguir, não apenas o *T. cruzi* do *T. vespertilionis*, mas ainda outros tripanossomos de morcegos, a que chama de “amostra *phyllostomae*” e “amostra *hastatus*”. DEANE²⁰, que trabalhou com amostras semelhantes a estas últimas, não crê que elas possam ser distinguidas biométricamente de amostras humanas do *T. cruzi*. FLOCH & col.³⁰, que denominam “índice nuclear médio” a relação estabelecida por DIAS²⁴, julgam-na de grande importância. Para ZELEDON & VIETO⁶⁷ tal índice, por si só, permite distinguir o *T. cruzi* do *T. vespertilionis*.

Parece-nos inegável que os dados biométricos têm valor quando adequadamente obtidos e analisados estatisticamente. Mas, por si só não são suficientes e veremos porque.

Efetivamente, de um lado há tripanossomos que são biométricamente indistinguíveis do *T. cruzi* e que, entretanto, diferem por outros caracteres. É o que parece acontecer com algumas amostras observadas em morcegos do gênero *Epitesicus* por ROMAÑA & TORANZOS³⁸; embora se possa argumentar que estas amostras não tenham sido tão exaustivamente estudadas como seria de desejar, as experiências realizadas por aqueles Autores mostram que estes tripanossomos não se desenvolvem em triatomíneos, não são inoculáveis em animais de laboratório e se desenvolvem mal em cultura. Mas o caso do *T. sanmartini*, já referido, parece não deixar dúvidas. Com efeito, este flagelado do macaco *Saimiri sciureus*, tem medidas, inclusive índice nuclear médio (aproxima-

damente 1,5), que caem dentro dos limites de variação das amostras de *T. cruzi* de origem humana; no entanto, segundo GARNHAM & GONZALEZ³¹ não se multiplica sob a forma de leishmânias nos tecidos, mesmo em animais de laboratório experimentalmente infetados, não se desenvolve no *T. infestans*, nem confere imunidade contra reinfeção por amostra de procedência humana.

Por outro lado, entre amostras isoladas de uma dada espécie de animal, há variações de medidas, por vezes muito acentuadas. Tal fato, observado por FLOCH & LAJUDIE²⁹ em amostras isoladas de *Didelphis marsupialis*, foi amplamente confirmado por BARRETTO & col.⁶. Trabalhando com amostras de *D. azarae* e *D. aurita* observaram índices nucleares médios variando de 1,15 a 1,63 e de 1,17 a 1,61 respectivamente. Tais índices médios extremos, tomados isoladamente, diferem muito; mas há entre eles toda uma série de valores intermediários, o que pode invalidar qualquer diferença estatisticamente significante acaso existente entre os extremos. Fato semelhante é observado nas amostras isoladas da cúca, *Lutreolina crassicaudata crassicaudata*, segundo observações de BARRETTO & col.⁷.

Aliás, o fato não é de se estranhar porque, de acordo com dados inéditos do Dr. Ferriolli Filho, amostras de *T. cruzi* isoladas por xenodiagnóstico de casos humanos de doença de Chagas e estudadas em camundongos, também variam muito, havendo este nosso colaborador observado índices nucleares médios variáveis de 0,95 a 1,46. Por outro lado, ainda que não existam na literatura trabalhos pormenorizados sobre o assunto, com frequência se encontram referências sobre a variabilidade das dimensões dos tripanossomos observados nas diversas fases da infecção.

3) *Cultivabilidade* — Todas as amostras de tripanossomos morfológicamente idênticos ou semelhantes ao *T. cruzi*, até agora estudadas, cultivam-se bem em meios de ágar-sangue. O isolamento inicial em meios de cultura consegue-se com facilidade, desde que se semeie sangue de um animal com parasitemia moderada ou elevada.

O desenvolvimento em cultura de tecidos tem sido conseguido no caso de várias amos-

tras de origem humana ou animal por ROMAÑA & MEYER⁵⁷ e, mais recentemente, por DEANE²⁰, não havendo êste Autor observado diferenças entre elas, quer quanto à capacidade infetante, quer quanto ao desenvolvimento.

Assim o comportamento, tanto em meios de cultura com base de ágar-sangue, quanto em culturas de tecidos parece caráter comum a tôdas as amostras até agora estudadas.

4) *Desenvolvimento em triatomíneos* — A maioria das amostras de flagelados de origem animal e semelhantes ao *T. cruzi*, desenvolve-se bem em triatomíneos, dando formas em tripanossomos metacíclicos no intestino posterior dos insetos. Nos casos estudados estas formas são semelhantes às das amostras de procedência humana.

Em algumas circunstâncias, tentativas de infecção de triatomíneos, sobretudo com tripanossomos de morcêgos, têm dado resultados negativos ou a infecção obtida é leve e passageira. Concordando com a opinião de DEANE²⁰ neste particular, julgamos que as tentativas de infecção feitas não parecem ter sido levadas a efeito com a extensão adequada e com os cuidados necessários, isto é, empregando triatomíneos de diferentes espécies e em número suficiente, assim como usando para fonte de alimentação um animal com parasitemia aparente.

A existência de diferente suscetibilidade das várias espécies de triatomíneos face a dada amostra de tripanossomo, assim como de uma dada espécie de triatomíneo frente a amostras diversas de tripanossomos, é assunto sujeito a controvérsias, mas parece-nos fato incontestável. Assim, por exemplo, BARRETO & SIQUEIRA⁵ trabalhando com amostras isoladas da *L. crassicaudata crassicaudata*, conseguiram infetar o *T. infestans* e o *T. sordida*, mas não obtiveram resultados positivos nas tentativas feitas com *R. prolixus*. Por outro lado, esta diferença de suscetibilidade ocorre também entre amostras de *T. cruzi* de procedência humana. Assim, a julgar por observações preliminares que temos, a amostra Y, mantida em camundongos por subinoculação de sangue em nosso laboratório, parece não se desenvolver tão bem no *T. infestans* de nossa colônia, como o faz no *T. sordida* e sobre-

tudo no *P. megistus*, no qual produz infecções regulares e intensas. Aliás, tal variação de suscetibilidade ocorre também com outros tripanossomos, semelhantes mas especificamente diferentes do *T. cruzi*. É o que ocorre com o *T. sanmartini* que, segundo GARNHAM & GONZALEZ³¹, infeta regularmente o *R. prolixus*, não infeta o *T. infestans* e produz infecções leves no *T. phyllosoma*.

Por outro lado, se a capacidade de infetar triatomíneos é caráter marcante do *T. cruzi*, êste elemento, por si só, não é suficiente, porque nem todos os tripanossomos que se multiplicam no tubo digestivo dêstes insetos, produzindo formas metacíclicas no intestino posterior, pertencem à espécie em questão. É o caso do *T. sanmartini*, acima citado, como é também o do *T. diasi* descrito por DEANE & MARTINS²².

5) *Patogenicidade para animais de laboratório* — De modo geral se afirma que os animais silvestres naturalmente infetados não mostram sinais e sintomas de infecção, tal afirmativa dando a impressão de que os tripanossomos em jôgo não são patogênicos para os respectivos hospedeiros. Parece-nos que isto se deva ao fato de os animais, via de regra, serem examinados na fase crônica da infecção, quando os sintomas são discretos ou inexistentes e as lesões difíceis de observar, ainda que cuidadosamente procuradas. É o que se depreende, por exemplo, dos resultados das investigações sobre tripanossomos de gambás levadas à efeito por BARRETO & col.⁶.

Aliás, trabalhando com gambás das espécies *D. azarae* e *D. aurita* experimentalmente infetados com amostras de tripanossomos isolados dêstes marsupiais, BARRETO & FERRIOLLI⁴ verificaram que, nos adultos, a infecção é benigna, praticamente assintomática e não letal, isto acontecendo principalmente quando os animais são inoculados com formas metacíclicas provenientes do intestino posterior de triatomíneos. Já nos gambás jovens a infecção, embora algo variável, é grave, traduzindo-se a gravidade por altas parasitemias, manifestações sintomáticas acentuadas e elevada taxa de mortalidade. Fato semelhante ocorre com a *L. crassicaudata crassicaudata* inoculada com

culada de nôvo no camundongo, segundo verificações de CARVALHEIRO & COLLARES¹².

A distribuição e o aspecto das formas tisulares nos hospedeiros naturais ou em animais experimentalmente infetados com tripanossomos isolados daqueles hospedeiros em geral não diferem dos das amostras humanas, segundo verificações de GUIMARÃES & JANSEN³², DEANE & DEANE²¹, DEANE¹⁹, BARRETTO & SIQUEIRA⁵, ALENCAR & col.^{1, 2}, CORRÊA & BARRETTO¹⁷, BARRETTO & col.⁶ e FERRIOLLI & BARRETTO²⁸.

Todavia, no caso de uma amostra isolada do tatu (*Dasypus novemcinctus*) e estudada por TORRES & AZEVEDO^{62, 63}, as formas em leishmânias, muito numerosas, foram encontradas em células gigantes multinucleadas e com membrana nítida, a que deram o nome gigantócitos císticos; aspecto idêntico foi observado em cães experimentalmente inoculados com esta amostra. Os mesmos gigantócitos císticos foram observados por MAZZA³⁸ e MAZZA & col.⁴⁰ em *Chetophractus vellerosus vellerosus* naturalmente infetado, assim como em animais experimentalmente inoculados. Em camundongos, ao lado destas formas, encontraram no miocárdio formas comuns. Gigantócitos císticos sem membrana foram observados por MAZZA & ROMAÑA³⁹ no diafragma de um exemplar de *L. crassicaudata paranalis* com infecção natural.

Recentemente, DEANE & col. (*in* DEANE²⁰), estudando comparativamente em animais de laboratório o comportamento de tripanossomo de *Eumops auripendulus* (= *E. abrasus*), *Saimiri sciureus*, *Nectomys squamipes* e *Didelphis marsupialis* e *Didelphis azarae*, não observaram diferenças quanto ao histotropismo.

7) *Imunidade cruzada* — Desde os trabalhos de BRUMPT⁹ sabe-se que os animais que se recuperam de uma infecção pelo *T. cruzi* adquirem resistência contra superinfecções, mesmo quando reinoculados com amostras muito virulentas para animais normais. Diversos trabalhos posteriores têm demonstrado êste fato em animais experimentalmente inoculados quer com amostras de virulência normal, quer com amostra com virulência atenuada^{8, 16, 50, 51, 60}. Por outro lado, Autores como DARMAN¹⁸ mostram que

a resistência adquirida é maior contra amostra homóloga de que contra amostra heteróloga. Todavia admite-se não haver imunidade cruzada entre espécies diferentes.

Isto posto, tem-se usado a prova de imunidade cruzada ou de proteção como elemento de identificação de tripanossomos encontrado em animais silvestres^{17, 19, 28}. Por outro lado, o não desenvolvimento de imunidade contra reinoculações posteriores com amostras de origem humana tem sido considerada como prova suficiente de que o tripanossomo em jôgo não é *T. cruzi*; tal é a opinião de GARNHAM & GONZALEZ³¹ quando descrevem o *T. sanmartini*. Aliás, êstes Autores aconselham, como medida de segurança, que, ao se fazer a prova de proteção, se provoque nos animais um refôrço da imunidade mediante reinoculação com a amostra homóloga antes da inoculação da amostra virulenta de origem humana.

8) *Caracteres imunológicos* — Usando como antígeno polissacárides extraídos de tripanossomos provenientes do homem, tatu, gambá e de outros tripanossômidas de mamíferos, em reações de precipitina, MUNIZ & FREITAS⁴¹ não conseguiram observar qualquer especificidade de tipo ou espécie, evidenciando assim que esta reação não serve para a caracterização do *T. cruzi*.

HAUSCHKA & col.³³, confirmando verificações anteriores de PACKCHANIAN⁴⁶ e SENKJIE⁵⁹, não observaram diferenças entre amostras diversas de *T. cruzi* pela reação de aglutinação. Mais tarde, WALTON & col.⁶⁶, usando reações de aglutinação, não conseguiram evidenciar diferenças imunológicas entre amostras de procedência humana e outra isolada de *Procyon lotor*; como o comportamento destas amostras diferisse do de uma de *T. conorhini*, concluíram pela identidade das primeiras.

Mais recentemente, NUSSENZWEIG & col.^{43, 44}, NUSSENZWEIG⁴² e NUSSENZWEIG & col.⁴⁵ estudaram a constituição antigênica de várias amostras de *T. cruzi* de origem humana e animal através da reação de aglutinação com sôro hiperimune adsorvido e da dupla difusão e precipitação em ágar. Mostraram que, além de uma fração antigênica comum de grupo, estas amostras contêm uma fração específica que permite sua se-

paração em três tipos imunológicos diversos: o tipo A, incluindo várias amostras isoladas de casos de doença de Chagas, uma de triatomíneo e duas de morcêgos. *Eumops auripendulus*, de São Paulo, e *Phyllostomus hastatus*, do Pará; o tipo B, compreendendo duas amostras isoladas dos gambás, *Didelphis marsupialis* e *D. azarae*, uma do macaco-de-cheiro, *Saimiri sciureus*, uma do mico, *Callithrix jacchus*, e outra do rato, *Nectomys squamipes*; o tipo C, incluindo uma amostra isolada da irara, *Tayra barbara*.

O real significado destes resultados, se vierem a ser confirmados, é campo aberto a futuras investigações. Segundo DEANE²⁰ estes tipos imunológicos não têm relação com o grau de patogenicidade das amostras. Por outro lado, os testes de proteção feitos com camundongos imunizados com as diversas amostras e depois reinoculados com amostra virulenta de origem humana, não permitem distinguir os tipos A e B, segundo NUSSENZWEIG & col.⁴⁵. Finalmente não existem diferenças quanto ao histotropismo entre as amostras pertencentes a tipos imunológicos diversos, segundo mostram os resultados das investigações de DEANE & col. (in DEANE²⁰).

SUMMARY

Cruzi-like trypanosomes from wild animals and their identification to the etiological agent of Chagas' disease

The problem of the identification of mammalian trypanosomes to *T. cruzi* is fully discussed. From this discussion it is concluded that at least the following criteria must be taken into consideration: 1) morphological similarity; 2) coincidence of biometric data, particularly the mean total length and mean nuclear index; 3) cultivability in blood-agar media; 4) evolution in the digestive tract of triatomines with development of metacyclic trypanosomes in the hind-gut of these insects; 5) infectivity for laboratory animals, specially baby mice and rats; 6) multiplication of *leishmania* in the tissues of the vertebrate host; 7) development of immunity against virulent strains of human origin.

All these characters, with the possible exception of cross-immunity, are subject to a

great deal of variation. Therefore they must be properly evaluated before a conclusion is reached concerning the identification of a mammalian trypanosome to the etiological agent of Chagas' disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENCAR, J. E.; ALMEIDA, J. O.; SHERLOCK, V. R. A.; FRANÇA, A. P. & LEITE, L. — Estudos sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. II — Novos dados. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 15:551-565, 1963.
2. ALENCAR, J. E.; PESSÓA, E. P.; SHERLOCK, V. R. A.; TOMÉ, G. S. & CUNHA, R. V. — Estudos sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. I — Dados preliminares. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 14:201-220, 1962.
3. BARRETTO, M. P. — Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* (Em publicação).
4. BARRETTO, M. P. & FERRIOLLI Filho, F. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VIII — Observações sobre a infecção experimental de gambás por tripanossomos isolados destes animais. *Rev. brasil. biol.* (Em publicação).
5. BARRETTO, M. P. & SIQUEIRA, A. F. — Infecção natural da *Luttreolina crassicaudata* pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 358-365, 1962.
6. 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.
7. BARRETTO, M. P.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI Filho, F. & CARVALHEIRO, J. R. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. X — Investigações sobre a infecção natural e experimental da cuica, *Luttreolina crassicaudata* por tripanossomos semelhantes ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.* (Em publicação).
8. BRENER, Z. — Observações sobre a imunidade a super-infecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:119-123, 1962.

9. BRUMPT, E. — Immunité partielle dans les infections à *T. cruzi*. Transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bull. Soc. path. exot.* 6:172-176, 1913.
10. CAMPOS, E. S. — Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. *An. Fac. med. Univ. São Paulo* 2:197-201, 1927.
11. CARDOSO, F. A. & NAVAJAS, E. — Achados de dois cães naturalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, no município de Itaporanga, Estado de São Paulo. *Rev. clin. São Paulo* 9:179-187, 1941.
12. CARVALHEIRO, J. R. & COLLARES, E. F. — Estudos sobre o comportamento, em camundongos, de uma amostra altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi* (amostra Y) após passagens em triatomíneos, ratos e culturas. *Rev. brasil. biol.* (Em publicação).
13. CHAGAS, C. — Sobre um trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (Nota prévia). *Brasil méd.* 26:305-306, 1912.
14. CHAGAS, C. — Host of the *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Med.-Cir. Brasil.* 26:220, 1918.
15. CLARK, H. C. & DUNN, L. H. — Experimental studies on Chagas' disease in Panama. *Am. J. Trop. Med.* 12:49-77, 1932.
16. COLLIER, W. A. — Ueber Immunität bei der Chagas Krankheit der Weissen Maus. *Ztschr. Hyg.* 112:88-92, 1931.
17. CORRÊA, F. M. A. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. III — Infecção natural do marsupial *Marmosa agilis agilis* por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:157-166, 1964.
18. DARMAN, M. — Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. *Ann. Parasitol. Hum. & Comp.* 18:166-179, 1941.
19. DEANE, L. M. — Sobre um tripanossomo do tipo *cruzi* encontrado num rato silvestre, no Estado do Pará. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 12:87-102, 1960.
20. DEANE, L. M. — Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 16:27-48, 1964.
21. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Notas sobre transmissores e reservatórios do *Trypanosoma cruzi* no norte do Estado do Ceará. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 9:577-595, 1957.
22. DEANE, L. M. & MARTINS, R. — Sobre um tripanosoma encontrado num macaco da Amazônia e que evolui em triatomídeos. *Rev. brasil. malariol. doenças trop.* 4:47-61, 1952.
23. DIAS, E. — Revisão geral dos hemoflagelados dos chiropteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum* de *Phyllostomus hastatus*: identidade com o *Schizotrypanum cruzi*. O grupo *vespertilionis*. 9.ª Reunião Soc. Argent. Patol. Reg. Norte 1:10-88, 1936.
24. DIAS, E. — Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35:399-409, 1940.
25. DIAS, E. & FREITAS Filho, L. — Introdução ao estudo biométrico do gênero *Schizotrypanum*. I — Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 38:427-436, 1943.
26. DIAS, E.; LARANJA, F. S. & NOBREGA, G. — Doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 43:495-582, 1945.
27. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VI — Infecção natural do *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1885) por um tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:72-81, 1965.
28. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. IX — Infecção natural do *Rattus rattus* (Lin., 1758) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:169-179, 1965.
29. FLOCH, H. & LAJUDIE, P. — Schizotrypanosomiase humaine et schizotrypanosomes. *Publ. Inst. Pasteur Guyane*, n.º 67, 6 p., 1943.
30. FLOCH, H.; LAJUDIE, P. & ABONNENC, E. — Schizotrypanose des chiroptères en Guyane française. L'indice nucléaire moyen. *Publ. Inst. Pasteur Guyane*, n.º 51, 7 p., 1942.
31. GARNHAM, P. C. C. & GONZALEZ MUGABURU, L. — A new trypanosome in *Saimiri* monkeys from Colombia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:79-84, 1962.

BARRETO, M. P. — Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:305-315, 1965.

32. GUIMARAES, F. N. & JANSEN, G. — Um foco potencial de tripanosomiase americana na cidade do Rio de Janeiro (Distrito Federal). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 39: 405-417, 1943.
33. HAUSCHKA, T. S.; GOODWIN, M. E.; PALMQUIST, J. & BROWN, E. — Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med.* 30:1-16, 1950.
34. HOARE, C. A. & BROOM, J. C. — Morphological and taxonomic study on mammalian trypanosomes. IV — Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax*. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 31:517-534, 1938.
35. HOARE, C. A. & BROOM, J. C. — Morphological and taxonomic study on mammalian trypanosomes. VII — Differentiation of *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax* in mixed infections. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 32:629-632, 1939.
36. LAVERAN, A. & MESNIL, V. — *Trypanosomes et trypanosomoses*. Paris, Masson, 1912.
37. LEME, M. V. S. & COLLARES, E. F. — Estudos sobre a suscetibilidade do rato branco a uma amostra de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo (amostra "Y"). *Medicina CARL* 1: 109-111, 1962.
38. MAZZA, S. — Acerca de la infección espontánea de la mulita en el Norte por el *Trypanosoma cruzi* (Nota preliminar). *Prensa méd. argent.* 16:1171-1173, 1930.
39. MAZZA, S. & ROMANA, C. — Infección espontánea de la comadreja del Chaco santafecino por el *Trypanosoma cruzi*. 7.ª Reunión Soc. Argent. Patol. Reg. Norte 2:981-989, 1932.
40. MAZZA, S.; SCHÜRMAN, K. & GUT-DEUTSCH, H. — Estudio comparado de la infección natural y experimental del quirquincho de Jujuy por *Trypanosoma cruzi*. 7.ª Reunión Soc. Argent. Patol. Reg. Norte 2:954-968, 1932.
41. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II — Isolamento de polissacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanossomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (sublimado e formol gel). *Rev. brasil. biol.* 4: 421-438, 1944.
42. NUSSENZWEIG, V. — Immunological types of *Trypanosoma cruzi*. Resumos de trabalhos. Sétimos Congressos Internacional de Medicina Tropical e Malária, Rio de Janeiro, p. 131, 1963.
43. NUSSENZWEIG, V. N.; DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. — Diversidade na constituição antigênica de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambás. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:409-410, 1962.
44. NUSSENZWEIG, V. N.; DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. — Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. *Exper. Parasitol.* 14:221-232, 1963.
45. NUSSENZWEIG, V. N.; KLOETZEL, J. & DEANE, L. M. — Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exper. Parasitol.* 14:233-239, 1963.
46. PACKCHANIAN, A. — Experimental production of agglutinins for *Trypanosoma cruzi*. *Pub. Health. Rep.* 55:2116-2124, 1940.
47. PEARSON, K. — On the probability that two independent distributions of frequency are really samples of the same population, with special reference to recent work on the identity of trypanosome strains. *Biometrika* 10:85-143, 1914.
48. PESSÓA, S. B. — Hospedeiros vertebrados (não humanos) do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Goiana Med.* 4:83-100, 1958.
49. PESSÓA, S. B. — Reservatórios animais do *Trypanosoma cruzi*. *An. Cong. Intern. Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, 1959, 4:1155-1180, 1963.
50. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Imunidade a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada (Comunicación preliminar). *Bol. Chileno Parasitol.* 7:20-21, 1952.
51. PIZZI, T.; RUBIO M. & KNIERIM, F. — Immunologia de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chileno Parasitol.* 9:35-47, 1954.
52. REGO, S. F. M. — Sobre o encontro de formas habitualmente tissulares do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, no sangue circulante do camundongo branco (*Mus musculus*). *Folia Clin. & Biol.* 26:17-46, 1956.
53. REGO, S. M. — Estudo das lesões provocadas pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, no baço e no fígado de camundongo branco (*Mus musculus*) com diversos graus de resistência. *J. brasil. Med.* 1:599-674, 1959.

54. REGO, S. M. & GARNHAM, P. C. C. — The "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*; leishmanial development in the spleen of mice. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 50:299-300, 1956.
55. RODRIGUES, B. A. & MELLO, G. B. — Contribuição ao estudo da tripanosomiase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 37: 77-94, 1942.
56. ROMANA, C. — Falta de transmisión hereditaria de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* en *Didelphis paraguayense* y comentarios sobre herencia del parasito en otros mamíferos. *An. Inst. Med. Reg.* 4:149-154, 1955.
57. ROMANA, C. & MEYER, H. — Estudo do ciclo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 37:19-27, 1942.
58. ROMANA, C. & TORANZOS, L. B. — *Schizotrypanum* de murcielagos del genero *Epitesicus*. *An. Inst. Med. Reg.* 2:41-55, 1947.
59. SENEKJIE, H. A. — Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. 2. Slide agglutination and intradermal tests. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 52:56-59, 1943.
60. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. & Biol* 20:191-208, 1953.
61. SIQUEIRA, A. F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XI — Infecção natural do ouriço, *Coendu villosus*, por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*. (Em publicação).
62. TORRES, C. M. & AZEVEDO, A. P. — Cellules géantes kystiques chez l'armadille (*Dasyppus novemcinctus* L.) que presente l'infection spontanée par le *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. *Compt. rend. Soc. biol.* 102:412-414, 1929.
63. TORRES, C. M. & AZEVEDO, A. P. — Cellules géantes chez le chien infecté expérimentalement par *Trypanosoma cruzi*, souche de l'armadille. *Compt. rend. Soc. biol.* 102:416-418, 1929.
64. VILLELA, E. — Variações do poder patogênico do *Trypanosoma cruzi* (raça neotropical). *Sci. Med.* 3:147-148, 1925.
65. VILLELA, E. & TORRES, C. M. — Estudos histopatológicos do sistema nervoso central na paralisia experimental pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 19: 175-198, 1926.
66. WALTON, B. C.; BAUMAN, P. M.; DIAMOND, L. S. & HERMAN, C. M. — The isolation and identification of *Trypanosoma cruzi* from raccoons in Maryland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7:603-610, 1958.
67. ZELEDON, R. & VIETO, P. L. — Comparative studies of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909, and *S. vespertilionis* (Bataglia, 1904) from Costa Rica. *J. Parasit.* 44:499-502, 1958.

Recebido para publicação em 27/7/1965.