

## INFECÇÃO NATURAL DA *LUTREOLINA CRASSICAUDATA CRASSICAUDATA* PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Mauro Pereira BARRETTO <sup>(1)</sup> e Astolpho Ferraz de SIQUEIRA <sup>(2)</sup>

### RESUMO

Examinando alguns exemplares de *Lutreolina crassicaudata crassicaudata*, os autores encontraram, no sangue periférico de um dêstes marsupiais, tripanossomos morfológicamente idênticos ao *Trypanosoma cruzi*. O exame de cortes de fragmentos de músculos estriados e de vários órgãos revelou a presença de ninhos esparsos de leishmânias no coração, baço, fígado e músculos peitorais.

Este tripanossomo mostrou-se infectante para o *Triatoma infestans* e para o *Triatoma sordida*, mas a infecção experimental do *Rhodnius prolixus* não foi conseguida.

Camundongos jovens inoculados, tanto com o sangue do marsupial quanto com fezes de triatomíneos, contraíram a infecção, que foi mantida por subinoculações naqueles animais de laboratório. A maioria dos camundongos, após períodos prepatentes que variaram de 8 a 18 dias, apresentou infecção leve, com parasitemia pequena ou moderada; alguns animais morreram da infecção entre o 12.º e 19.º dia após a inoculação. O exame dos órgãos de alguns camundongos mortos da infecção ou sacrificados revelou ninhos de leishmânias no coração e, mais raramente, no baço e fígado.

Culturas em meio de MacNeal-Novy, a partir de sangue de camundongos infectados, deram resultados positivos.

Alguns cistos de *Sarcocystis* sp. foram observados no coração e em músculos estriados.

### INTRODUÇÃO

A infecção natural de diversos marsupiais, pelo *Trypanosoma cruzi*, tem sido assinalada no Brasil: a do *Didelphis marsupialis* por RODRIGUES & MELLO <sup>9</sup>, GUIMARÃES & JANSEN <sup>6</sup> e DEANE <sup>2</sup>; a do *Didelphis aurita* por FREITAS <sup>5</sup> e SIQUEIRA, MAGALHÃES & RÊGO <sup>10</sup>; a do *Didelphis azarae azarae* por LEAL, FERREIRA & MARTINS <sup>7</sup>; a do *Didelphis paraguayensis* por DEANE & DEANE <sup>3</sup>; a do *Metachirus nudicaudatus* por GUIMARÃES & JANSEN <sup>6</sup>; a do *Metachirops opossum opossum* por DEANE <sup>1</sup> e a da *Marmosa cinerea* por DEANE & JANSEN <sup>4</sup> e DEANE <sup>2</sup>.

Na Argentina, MAZZA & ROMANA <sup>7</sup> constataram a infecção de *Lutreolina crassicaudata paranalis*, mas até agora este animal ou outra subespécie não havia sido encontrada naturalmente parasitada entre nós.

Examinando exemplares de *Lutreolina crassicaudata crassicaudata*, capturados no "campus" da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde este animal é conhecido como "cuíca", encontramos um em cujo sangue periférico foram observados, ao exame a fresco e em esfregaços corados pelo Mäy-Grunwald Giemsa, tripanossomos com mor-

Trabalho do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Diretor: Prof. M. P. Barretto).

(1) Professor.  
(2) Assistente.

fologia semelhante à do *Trypanosoma cruzi*. No presente trabalho relatamos nossas observações sobre este tripanossomo.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Depois de submetido ao xenodiagnóstico e após a colheita de sangue, por punção cardíaca, para inoculações em camundongos jovens e sementeiras em meio de MacNeal-Novy, o animal foi sacrificado. Confeccionamos, além de esfregaços de sangue e impressões de coração, baço, fígado e rim, cortes destes órgãos e também de diversos músculos esqueléticos, após fixação em líquido de Zenker e em formol.

Para xenodiagnóstico usamos cinco ninfas de *Triatoma infestans* e cinco de *Rhodnius prolixus*, criadas em laboratório, ninfas estas que foram examinadas 30 dias depois. Com o conteúdo do intestino posterior daquelas que se mostraram infectadas, inoculamos camundongos jovens, com cerca de 20 dias de idade.

Os camundongos inoculados, por via peritoneal, com 0,2 ml de sangue da "cuíca", ou, por via subcutânea, com fezes de triatomíneos, foram examinados (sangue da cauda) diariamente a partir do 4.º dia após a inoculação. Subinoculações de camundongos jovens, também por via intraperitoneal, com sangue de camundongos previamente infec-

tados, foram feitas com a finalidade de observar a parasitemia, e, após necropsia, o parasitismo dos tecidos.

Lotes de ninfas de *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* e *Rhodnius prolixus* foram alimentados em camundongos infectados a fim de se verificar o comportamento do tripanossomo nestes triatomíneos.

Finalmente, sementeiras em meio de MacNeal-Novy foram realizadas com sangue não apenas da "cuíca", como também de camundongos parasitados.

#### RESULTADOS

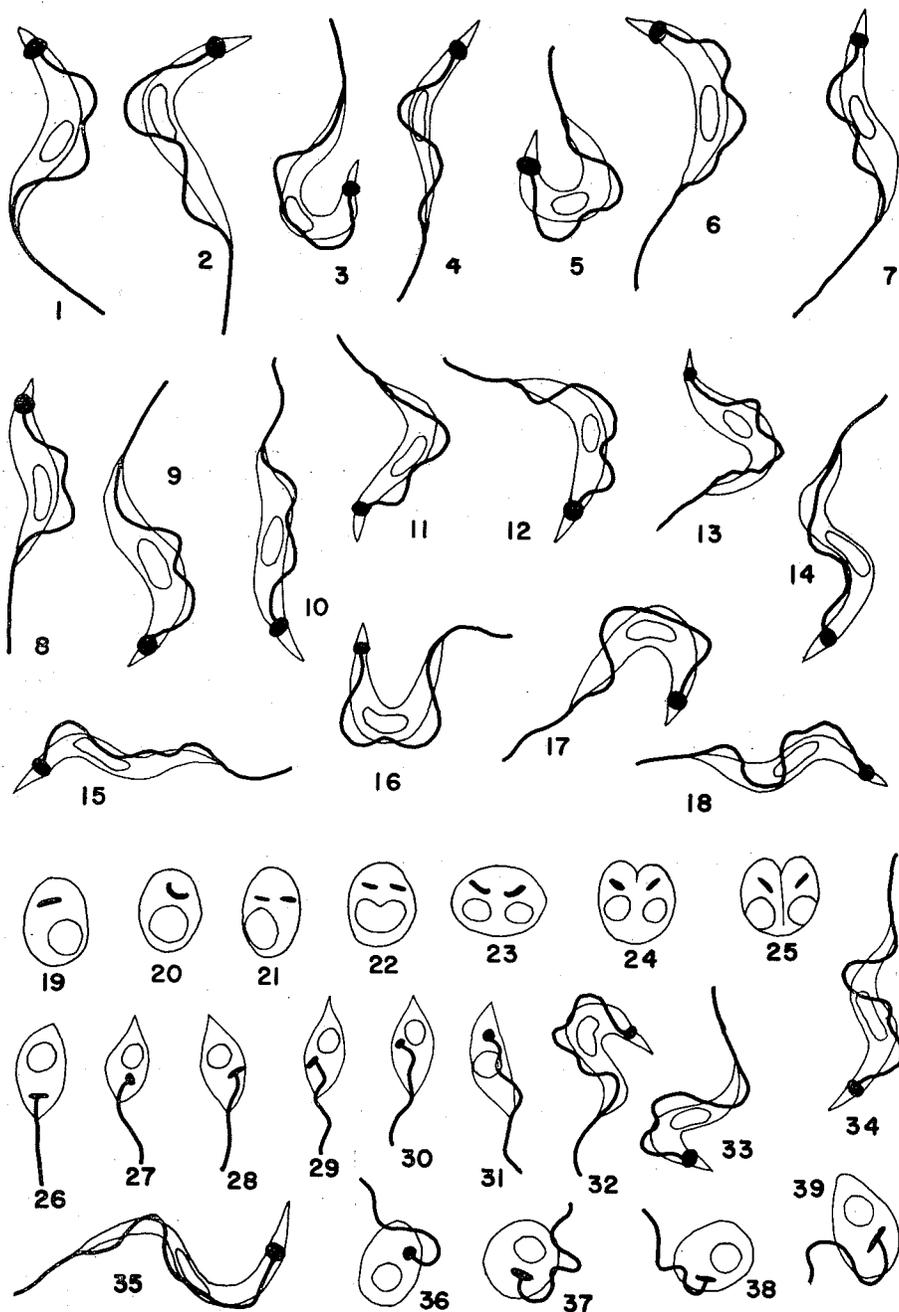
*Morfologia dos elementos sangüícolas* — No sangue do marsupial, assim como no dos camundongos, os tripanossomos apresentaram-se com aspecto algo variável, mas semelhantes ao do *T. cruzi* (Fig. 1-18, 40 e 41): extremidade posterior geralmente curta e pontiaguda; cinetoplasto arredondado e volumoso, com diâmetro superior à largura do flagelado ao nível da estrutura em questão; núcleo ovóide alongado, situado aproximadamente no meio do corpo, e membrana ondulante nítida, estreita e com pequeno número de ondulações.

As mensurações efetuadas com curvímeter sobre desenhos de tripanossomos ampliados em microprojecção, deram os resultados apresentados no quadro I.

#### QUADRO I

Resultados de mensurações feitas sobre 30 tripanossomos do sangue periférico da *Lutrolelina crassicaudata crassicaudata*.

	Medidas em $\mu$		
	Mínima	Máxima	Média
Comprimento do flagelo .....	4,0	7,3	5,19
Distância NA .....	6,0	11,0	8,12
Distância NP .....	6,0	11,3	8,09
Comprimento do corpo .....	13,3	21,7	16,21
Comprimento total (inclusive flagelo) .....	17,6	25,7	21,32
Largura do corpo .....	0,8	3,1	1,72
Diâmetro do cinetoplasto .....	0,6	2,9	1,62
Relação NP/NA .....	0,75	1,22	1,01



Figs. 1 a 39

1-18: Trypanossomos presentes no sangue circulante da *Lutreolina crassicaudata crassicaudata*;

19-39: Flagelados observados em impressões de órgãos de camundongos experimentalmente infectados.

Nos esfregaços de sangue do marsupial, assim como nos esfregaços de sangue e impressões de órgãos de camundongos, observamos formas curtas e largas, formas longas e delgadas e formas intermediárias, em proporções variáveis. As formas curtas e largas mais típicas (Figs. 1-3, 5-13, 15-18) apresentam-se com aspecto de C ou S, têm cinetoplasto muito próximo da extremidade posterior, núcleo elipsóide e membrana ondulante bem nítida e geralmente com três pregas; o flagelo livre é, via de regra longo, medindo cerca de um terço de comprimento do corpo. As formas longas e delgadas mais típicas (Figs. 14, 35) são mais sinuosas, têm cinetoplasto mais afastado da extremidade posterior, núcleo alongado e flagelo livre relativamente curto.

*Morfologia dos elementos tissulares* — O exame de fragmentos de tecidos e órgãos do marsupial mostrou a presença de ninhos de leishmânias em fibras cardíacas (Figs. 42 e 43) e de músculos peitorais, assim como em macrófagos do fígado (Fig. 44) e do baço (Fig. 45). Este parasitismo foi pequeno, observando-se apenas uma ou outra fibra ou célula parasitada.

Em camundongos inoculados tanto com sangue da cuíca, como com fezes de triatomíneos, como ainda com sangue de outros camundongos previamente infectados, observamos ninhos de leishmânias e critídias mais numerosos no coração, baço e fígado, menos numerosos no rim e no encéfalo. A intensidade do parasitismo tissular, sempre moderada, variou de animal para animal.

Nas impressões de órgãos da cuíca o número de formas observado foi muito pequeno. Para estudo destes elementos baseamos, por isto, em impressões de órgãos de camundongos inoculados. Nelas encontramos, em maior ou menor proporção, leishmânias e critídias.

As leishmânias que se apresentam intracelulares ou livres, via de regra, são ovóides ou elipsóides (Figs. 19, 20), medindo 3-6  $\mu$  de comprimento por 2,5-5,0  $\mu$  de largura; às vezes mostram-se arredondadas. Estas leishmânias apresentam cinetoplasto grande, com a forma de bastonete reto ou encurvado e núcleo arredondado. Todas as etapas da divisão binária foram observadas (Figs. 21-

25). Alguns elementos arredondados ou ovóides, dotados de flagelo curto (Figs. 36-39) foram também vistos. Encontramos ainda alguns elementos fusiformes, curtos ou longos, com aspecto de leptomonas, assim como todas as formas de transição entre critídias e tripanossomos (Figs. 26-31). Ainda nas impressões de órgão encontramos tripanossomos largos ou delgados, semelhantes às formas sanguícolas (Figs. 32-35).

*Morfologia dos elementos encontrados nos triatomíneos* — Em esfregaços de fezes de triatomíneos ou de conteúdo do tubo digestivo destes corados pela hematoxilina férrica ou pelo Mäy-Grunwald Giemsa, observamos tripanossomos metacíclicos e critídias.

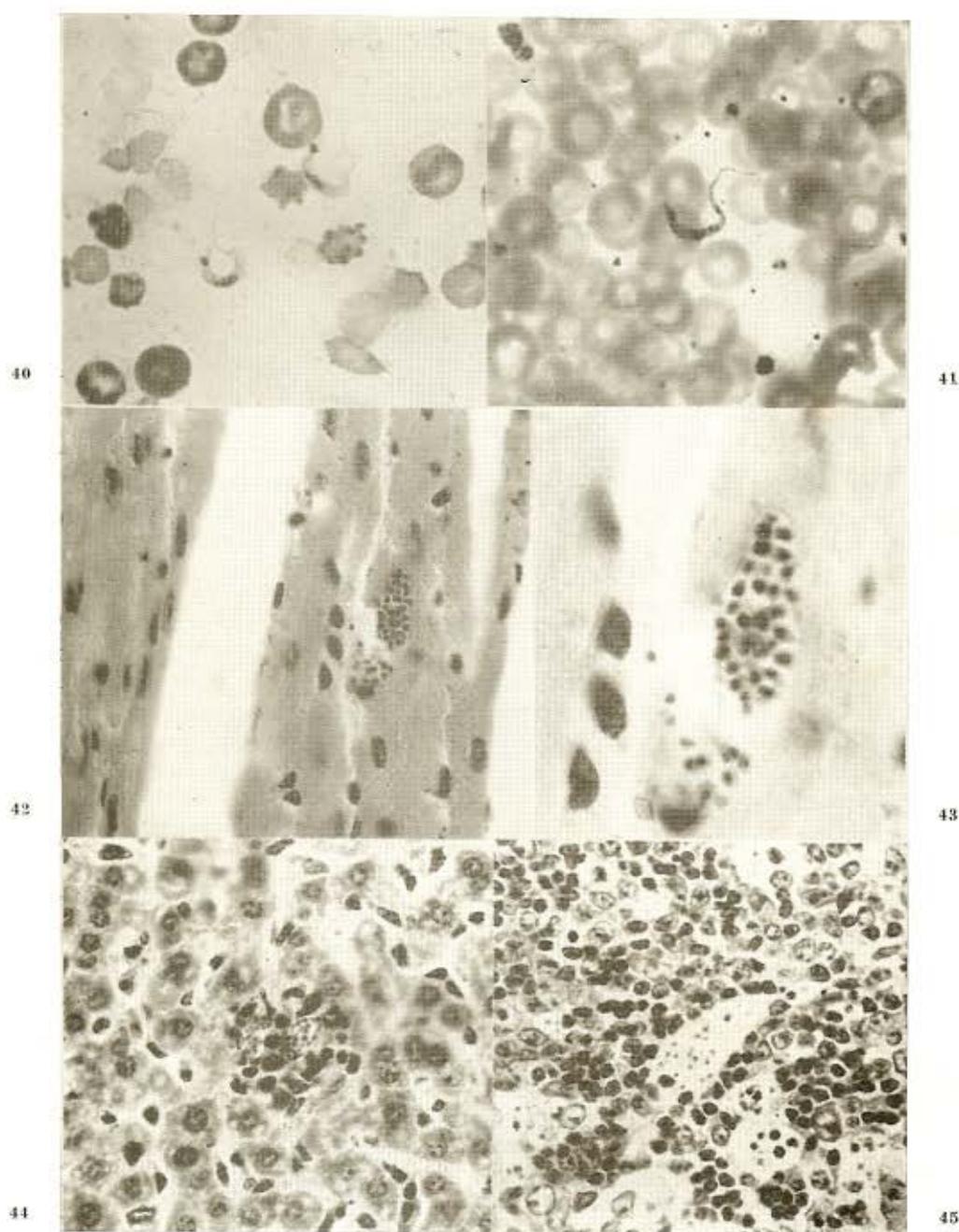
Os tripanossomos são geralmente largos e curtos, medem cerca de 20  $\mu$  de comprimento, têm cinetoplasto grande e situado ora próximo da extremidade posterior, ora afastado dela, membrana ondulante delgada e com pequeno número (geralmente três) de ondulações, e flagelo livre curto ou praticamente ausente.

As critídias são grandes, medindo 25-50  $\mu$  de comprimento, têm núcleo arredondado ou ovóide, cinetoplasto arredondado ou bastonetiforme e membrana ondulante delgada e pouco evidente. A forma geral do corpo e a posição das estruturas internas são variáveis. Muitas formas em divisão são encontradas.

Além de critídias e tripanossomos, observamos alguns elementos arredondados, aflage-lados ou com flagelo curto.

Elementos flagelados ou não nunca foram encontrados na hemolinfa, nem na porção anterior do tubo digestivo ou nas glândulas salivares.

*Infecção de camundongos* — A infecção de camundongos foi inicialmente obtida por inoculação de sangue do marsupial e de fezes de triatomíneos que haviam sugado este animal. Um entre cinco camundongos inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de sangue contraiu a infecção. Dois entre cinco camundongos inoculados subcutaneamente com fezes de *T. infestans* também adquiriram a infecção. Todos os três camundongos tiveram parasitemia muito pequena com



Figs. 40 a 45

- 40-41: Tripanossomos presentes no sangue;
- 42-43: Ninhos de leishmânias em fibra cardíaca;
- 44: Idem no fígado;
- 45: Idem no baço.



Figs. 46 a 49

46: *Lutreolina crassicaudata crassicaudata*;

47: Cistos de *Sarcocystis* sp. no coração do marsupial;

48 a 49: Idem em fibra muscular estriada.

o máximo de 6 tripanossomos por 10 campos (ocular 6X, objetiva 45) e não exibiram manifestações da doença. Depois de sangrados por punção cardíaca, todos os três

camundongos sacrificados mostraram alguns ninhos de leishmânias no coração.

A amostra assim isolada foi mantida através de cinco repiques, usando-se para cada

## DISCUSSÃO

repique cinco camundongos. Dos 25 animais inoculados, 22 se infectaram; os três restantes, examinados até o 30.º dia após a inoculação, não mostraram tripanossomos no sangue periférico, nem ninhos de leishmânias nos órgãos.

Nos 22 camundongos que se infectaram, o período prepatente variou de 8 a 18 dias. A parasitemia, na maioria dos animais, foi pequena; apenas em quatro animais subinoculados observamos mais de um tripanossomo por campo. Dez camundongos morreram da infecção entre o 12.º e o 19.º dia; cinco foram sacrificados entre o 10.º e o 15.º dia para exame das vísceras; nos sete restantes a infecção evoluiu para a cronicidade. Em todos os camundongos sacrificados, assim como naqueles que morreram e que foram necropsiados por se acharem em boas condições, num total de 11 animais, encontramos leishmânias no coração, ora mais, ora menos abundantes. A maioria dos animais examinados também mostrou formas tissulares, sempre em pequeno número, no baço, e, às vêzes, no fígado.

*Infecção de triatomíneos* — Três entre cinco ninfas de *Triatoma infestans* usadas para o xenodiagnóstico mostraram-se positivas ao exame feito 30 dias após a alimentação; as outras, que foram realimentadas em galinha, conservaram-se negativas a exames feitos no 45.º e no 60.º dia após o repasto sanguíneo. As cinco ninfas de *Rhodnius prolixus*, também usadas para o xenodiagnóstico, mostraram-se negativas até o 60.º dia após a alimentação.

A fim de verificar a suscetibilidade de triatomíneos, lotes de ninfas de *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* e *Rhodnius prolixus* foram alimentados em camundongos infectados em diferentes ocasiões.

De 15 exemplares de *T. infestans*, 13 se infectaram; 9 entre 10 ninfas de *T. sordida* também se infectaram; 5 ninfas de *R. prolixus* mantiveram-se negativas até o 60.º dia após a alimentação.

*Cultivo* — Em duas tentativas, culturas a partir de sangue de cuíca deram resultados negativos. Semeando, porém, sangue de camundongos infectados em meio de MacNeal-Novy, obtivemos culturas que se mostraram ricas nos repiques subseqüentes.

A morfologia dos tripanossomos sangüícolas, assim como das formas tissulares por nós estudadas é idêntica à do *T. cruzi*. É verdade que, dada a variabilidade de aspectos observados, não apenas entre diferentes amostras de procedência humana, como em períodos diversos da infecção por determinada amostra, o critério morfológico é precário como elemento de distinção entre possíveis subespécies ou mesmo espécies de tripanossomos do tipo *cruzi*, parasitos de diferentes animais.

Todavia os caracteres morfológicos, aliados ao parasitismo tissular, à patogenicidade para camundongos e à infectividade para triatomíneos, levam-nos a identificar, provisoriamente, o tripanossomo, por nós estudado, como *T. cruzi*, e a considerar a *Luttreolina crassicaudata crassicaudata* (Fig. 46) como um reservatório do parasito.

Nossas observações confirmam e ampliam as verificações de MAZZA & ROMAÑA<sup>8</sup>. Ao contrário, porém, do que observaram êsses autores, o tripanossomo por nós estudado mostrou-se virulento para camundongos. Cumpre-nos assinalar, no entanto, que MAZZA & ROMAÑA<sup>8</sup> inocularam um só animal de idade não mencionada. Por outro lado, não encontramos, tanto no marsupial como nos camundongos, ninhos de leishmânias atípicos observados pelos referidos autores no diafragma. Se as diferenças de agressividade para o camundongo e de morfologia dos cistos parasitários correm ou não por conta da diversidade subespecífica dos hospedeiros ou das amostras do parasito é questão aberta a futuras investigações.

Resta-nos mencionar ainda que, em cortes de coração e de músculos estriados, encontramos alguns cistos de *Sarcocystis* sp., cujas dimensões variam muito (Figs. 47-49).

## SUMMARY

*Natural infection of Luttreolina crassicaudata crassicaudata by Trypanosoma cruzi.*

The examination of some specimens of *Luttreolina crassicaudata crassicaudata* revealed the presence of a trypanosome morphologically identical to *Trypanosoma cruzi*

in the peripheral blood of one marsupial. Leishmaniae and crithidia were seen in sections of heart, spleen, liver, and muscles.

Infection of nymphs of *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* was obtained, but nymphs of *Rhodnius prolixus* fed on the marsupial and on experimentally infected mice were consistently negative.

Infection of young white mice was obtained through inoculation of blood or feces of triatomids. Most of the mice exhibited a low or moderate parasitemia after a prepatent period varying from 8 to 18 days; some animals died from the infection from 12 to 19 days after inoculation. A variable number of tissue forms were seen in imprints and sections of heart, spleen, and liver of mice.

Cultures in McNeal-Novy's medium were obtained from blood of infected mice.

Cysts of *Sarcocystis* sp. were seen in sections of heart and muscles.

#### REFERÊNCIAS

1. DEANE, L. M. — Novo hospedeiro de tripanossomos dos tipos *cruzi* e *rangeli* encontrado no Estado do Pará: o marsupial *Metachirops opossum opossum*. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 10:531-541, 1958.
2. DEANE, L. M. — Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:15-28, 1961.
3. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Notas sobre transmissores e reservatórios do *Trypanosoma cruzi* no noroeste do Estado do Ceará. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 9:577-595, 1957.
4. DEANE, L. M. & JANSEN, G. — Encontro de *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909) em marsupiais da espécie *Marmosa cinerea* Demarest. Brasil-méd. 53:265-266, 1939.
5. FREITAS, J. L. P. — Observações sobre xenodiagnósticos em reservatórios domésticos e silvestres do *Trypanosoma cruzi* em uma localidade endêmica da Moléstia de Chagas, no Estado de São Paulo. Hospital, Rio de Janeiro 38:521-529, 1950.
6. GUIMARAES, F. N. & JANSEN, G. — Um foco potencial de trypanosomiase americana na Cidade do Rio de Janeiro (Distrito Federal). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 39:405-417, 1943.
7. LEAL, H.; FERREIRA neto, J. A. & MARTINS, C. M. — Dados ecológicos sobre os triatomíneos silvestres na Ilha de Santa Catarina (Brasil). Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3:213-220, 1961.
8. MAZZA, S. & ROMANA, C. — Infección espontánea de la comdreja del Chaco Santafecino por el *Trypanosoma cruzi*. 7ª Reun. Soc. Argent. Patol. Reg. 2:981-989, 1932.
9. RODRIGUES, B. A. & MELLO, G. B. — Contribuição ao estudo da tripanosomiase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37:77-94, 1942.
10. SIQUEIRA, A. F.; MAGALHÃES, A. E. A. & REGO, S. M. — Inquérito preliminar sobre a moléstia de Chagas em uma fazenda do Município de Ribeirão Preto. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 9:271-276, 1957.

Recebido para publicação em 22 agosto 1962.

