

ESTUDOS SÔBRE RESERVATÓRIOS E VECTORES SILVESTRES DO *TRYPANOSOMA CRUZI*. XXXII — INFECÇÃO NATURAL DO SÍMIO, *CALLICEBUS NIGRIFRONS* (SPIX, 1823) PELO *T. CRUZI*

Rosa Domingues Ribeiro ALBUQUERQUE e Mauro Pereira BARRETTO

RESUMO

Uma amostra de *Trypanosoma cruzi* foi isolada, através do xenodiagnóstico, de um exemplar do símio, *Callicebus nigrifrons* (SPIX, 1823), capturado no Município de Uberaba, M.G. Esta amostra mostrou-se patogênica para o camundongo branco, infetando 100% dos animais inoculados por via peritoneal com sangue de doador parasitado ou com tripanossomos metacíclicos de triatomíneos. As formas sanguícolas, nos animais de experiência, medem 20,72 μ de comprimento total médio e têm índice nuclear médio de 1,36. Nos animais inoculados e sacrificados durante a fase aguda da infecção observaram-se raros ninhos de leishmânias no coração. A infecção dos camundongos foi grave, com período prepatente médio de 11,3 dias, com alta parasitemia e relativamente longa duração da fase aguda; mas a taxa de letalidade foi relativamente pequena, isto é, 26,7%. A amostra em estudo confere aos animais que sobrevivem alto grau de resistência contra reinfeção pela amostra Y do *T. cruzi*. Cultiva-se bem em meios NNN e de Warren. Infeta regularmente triatomíneos, dando os seguintes índices de infecção: *P. megistus* — 96,7%, *R. neglectus* — 73,3%, *T. infestans* — 66,7% e *T. sordida* — 60,0%.

INTRODUÇÃO

Em trabalho recente, CARVALHEIRO & BARRETTO³ analisam o problema da infecção natural de símios americanos pelo *T. cruzi*, mostrando que as seguintes espécies e subespécies haviam sido, até aquela data, encontradas naturalmente parasitadas: *Saimiri sciureus sciureus* (Linnaeus, 1758), do Baixo Amazonas, *Saimiri sciureus ? macrondon* Elliot, 1907, da Amazônia Peruana, *Cebus apella apella* (Linnaeus, 1758) da Venezuela e Guiana Francesa, *Alouatta senicola ? straminea* (Humboldt, 1812), da Venezuela e *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1812), do Nordeste do Brasil. Por outro lado, relatam o encontro da infecção natu-

ral do *Cebus apella versutus* Elliot, 1910, da Região Nordeste do Estado de São Paulo.

No mesmo ano MARINKELLE¹⁰, na Colômbia, refere a presença do *T. cruzi* nos seguintes símios: *Cebus capucinus capucinus* (Linnaeus, 1758), *Cebus albifrons unicolor* Spix, 1823, *Cebus apella apella* (Linnaeus, 1758), *Ateles geoffroyi grisescens* Gray, 1665, *Ateles belzebuth hybridus* Geoffroy, 1829 e *Marikina leucopus* (Günther, 1876).

Em nossas investigações sôbre reservatórios silvestres do *T. cruzi* tivemos a oportunidade de examinar cinco exemplares do macaco saá ou sauá, *Callicebus nigrifrons*

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

Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

(Spix, 1823); de um dos exemplares, capturado no Município de Uberaba, M.G., conseguimos isolar, mediante xenodiagnóstico, uma amostra de *T. cruzi*, cujo estudo constitui objeto do presente trabalho.

O *C. nigrifrons* é um símio de tamanho médio, medindo cêrca de 43 cm, e com a cauda ligeiramente mais longa que o comprimento do corpo, isto é, com 45 cm. O macho tem colorido geral cinzento. A cabeça é cinza tendo a frente, as orelhas, a face e o mento negros e a garganta esbranquiçada. O dorso é cinzento escuro na parte anterior ou superior e cinzento claro na parte posterior. O peito, o ventre e a face interna dos membros são cinzentos esbranquiçados e a face externa dos membros é cinzenta escura; as mãos e pés são negros. A cauda é cinzenta clara na base, tornando-se ocrácea na extremidade. A fêmea assemelha-se ao macho, mas é um pouco mais clara.

Este símio ocorre na Região Nordeste do Estado de São Paulo, no Triângulo Mineiro e no Sul de Minas Gerais, onde vive em pequenos bandos em matas e mesmo em capoeiras, fazendo grande algazarra e soltando seus gritos característicos^{9, 12}.

MATERIAL E METODOS

O isolamento da amostra ora em estudo foi feito mediante xenodiagnóstico e inoculação das formas metacíclicas dos triatomíneos em camundongos brancos com 20 dias de idade. Uma vez isolada em camundongos, ela foi mantida nesses animais mediante inoculações intraperitoneais de sangue colhido durante a fase aguda da infecção de doadores; os repiques foram feitos com intervalos de 21 dias. Nos repiques 1, 3 e 5 inoculamos lotes maiores de animais para estudo do comportamento da parasitemia.

Os métodos usados para inoculação, estudo morfológico das formas sanguícolas, seguimento da parasitemia, pesquisa de formas tissulares, verificação da suscetibilidade de triatomíneos, cultivabilidade e existência de imunidade cruzada foram idênticos aos empregados em trabalhos anteriores por ALBUQUERQUE & BARRETTO^{1, 2} e, por isso, deixamos de os descrever.

RESULTADOS E DISCUSSAO

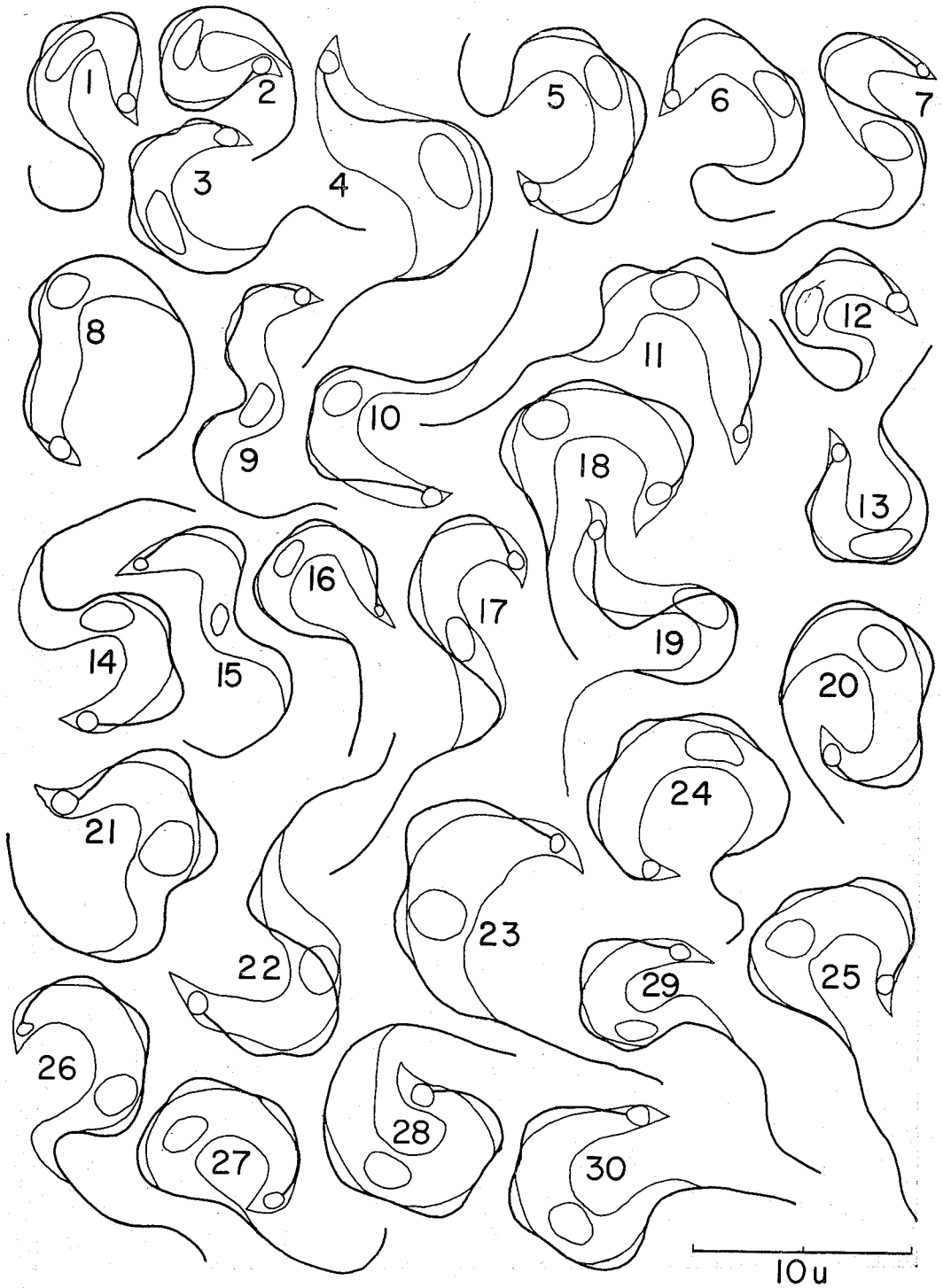
Morfologia das formas sanguícolas — No sangue dos camundongos os tripanossomos apresentam-se com aspecto algo variável, mas com os caracteres fundamentais do *T. cruzi* (Figs. 1-32): núcleo situado no terço médio do corpo, cinetoplasto grande, arredondado e subterminal, membrana ondulante delicada e com pequeno número de ondulações e flagelo livre relativamente curto. A observação, ao acaso, de esfregaços de sangue colhidos em vários camundongos em diferentes fases da infecção revela uma nítida predominância de formas em C ou S de largura e comprimento moderados; raramente são vistas formas mais largas, mas nunca tão largas quanto as observadas por FERRIOLLI & BARRETTO^{5, 6, 7} e por CARVALHEIRO & BARRETTO³ em amostras isoladas do *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1885), do *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758), da *Cavia aperea aperea* Erxleben, 1777 e do *Cebus apella versutus* Elliot, 1910. Nunca foram observadas formas longas e delgadas semelhantes as vistas na amostra Y de origem humana, por FERRIOLLI & col.⁸ ou na amostra isolada da *Marmosa agilis agilis* (Burmeister, 1854) por CORRÊA & BARRETTO⁴.

Nas Figuras 1-30 apresentamos desenhos de tripanossomos sanguícolas, obtidos por decalque de imagens projetadas sôbre papel por um microprojektor Leitz. Os resultados das medidas, tomadas com curvímetero sôbre êsses desenhos, são sumariados no Quadro I.

QUADRO I

Resultados da micrometria realizada sôbre 30 tripanossomos do sangue periférico de camundongos infetados experimentalmente com a amostra do *Callicebus nigrifrons*

Especificação	Medidas em μ		
	Mínima	Máxima	Média
Comprimento do flagelo	4,0	8,0	6,09
Distância NA	5,0	8,5	6,16
Distância PN	6,0	10,0	8,35
Comprimento do corpo	11,5	17,5	14,51
Comprimento total	17,0	23,5	20,72
Largura do corpo	1,2	4,5	2,2
Diâmetro do cinetoplasto	0,3	1,0	0,71
Relação PN/NA	1,0	1,72	1,36

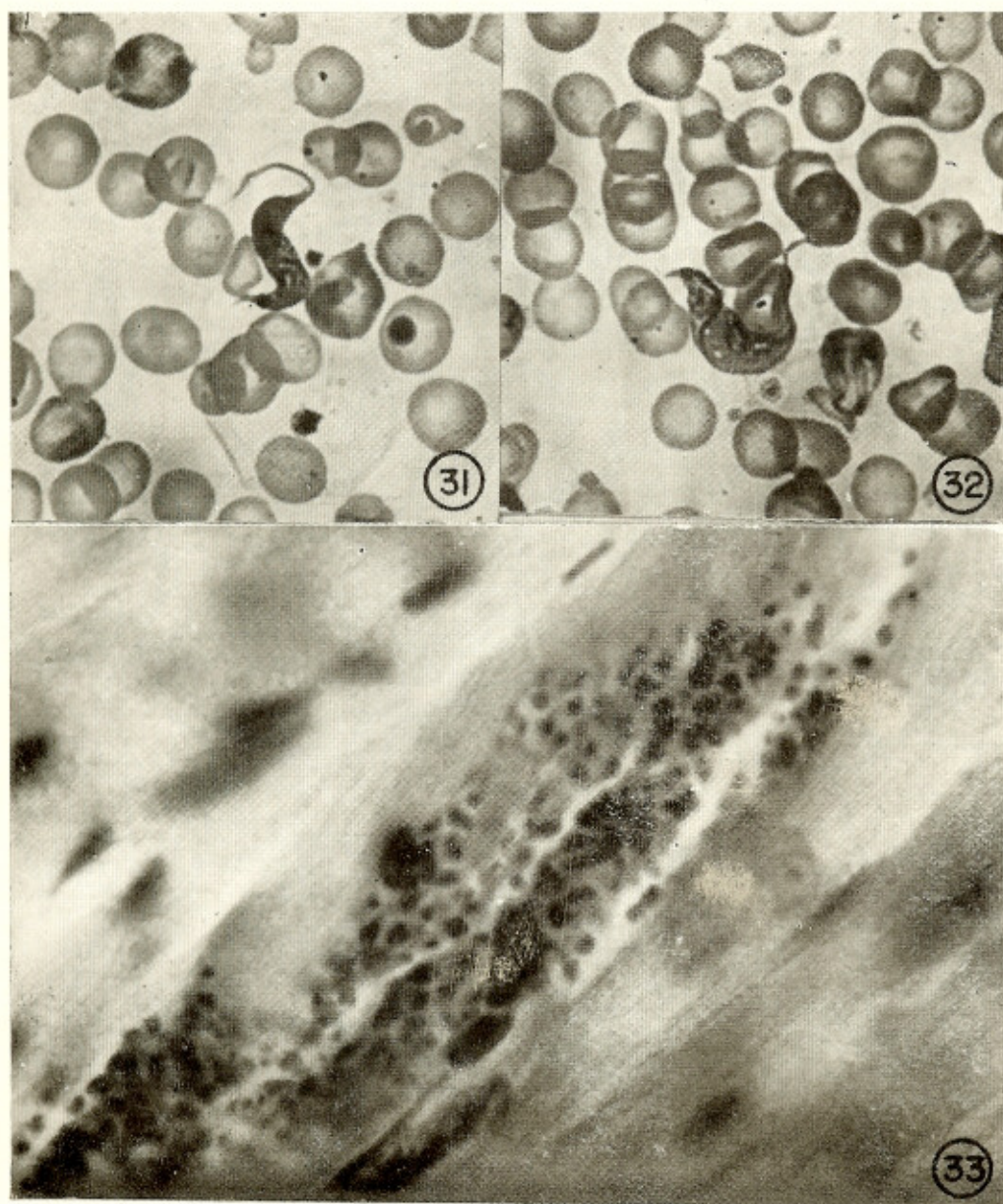


Figs. 1-30 — Desenhos de tripanossomos sanguícolas de camundongos experimentalmente infetados com *T. cruzi* de *Callicebus nigrifrons*

Estes resultados, em particular o comprimento total médio, 20,72 μ , e o índice nuclear médio, 1,36, caem dentro dos limites de variação que têm sido observados para amostras isoladas de animais silvestres e do

homem, como demonstram as observações de FERRIOLLI & col.⁸.

Morfologia das formas tissulares — O exame de cortes de tecidos de camundongos



Figs. 31 e 32 — Microfotografias de tripanossomos sanguícolas de camundongos experimentalmente infetados com *T. cruzi* de *Callicebus nigrifrons* (400 \times). Fig. 33 — Microfotografia de leishmânias em coração de camundongo experimentalmente infetados com *T. cruzi* de *Callicebus nigrifrons* (400 \times)

infetados e sacrificados durante a fase aguda da infecção revelou a presença de alguns ninhos de leishmânias na musculatura cardíaca (Fig. 33). As leishmânias têm as dimensões e a estrutura típicas do *T. cruzi*.

Infecção de animais de laboratório — Três camundongos, inoculados com fezes de triatomíneos usados para xenodiagnóstico, adquiriram a infecção, apresentando tripanossomos no sangue circulante 14 dias após a inoculação.

A partir desses animais mantivemos a infecção em camundongos mediante inoculação intraperitoneal de sangue citratado colhido de doadores com infecção aguda. Todos os animais inoculados adquiriram a infecção.

Nos repiques 1, 3 e 5, usamos maior número de animais de experiência, que foram destinados ao estudo do comportamento da infecção. No Quadro II resumimos os resultados obtidos em 30 camundongos. O exame deste quadro mostra que o período prepatente oscilou entre 8 e 14 dias, com média de 11,3 dias. Este período, um dos mais longos até agora observados em infecção por amostras de *T. cruzi* por nós isoladas de animais silvestres, equivale ao verificado nas infecções pelo tripanossomo isolado do *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) por ALBUQUERQUE & BARRETTO¹.

A parasitemia, ainda que variável de animal para animal dentro do mesmo lote, foi,

QUADRO II

Caracteres gerais da infecção de camundongos pela amostra de tripanossomo do *Callicebus nigrifrons*

N.º do animal	Período prepatente (dias)	Parasitemia máxima		Duração da fase aguda
		N.º/mm ³	Dia após inoculação	
I-1	13	1659	25.º	morreu no 25.º dia
I-2	14	1022	34.º	41 dias
I-3	13	2667	46.º	75 dias
I-4	11	3906	32.º	44 dias
I-5	13	3304	32.º	62 dias
I-6	13	987	34.º	37 dias
I-7	13	2380	29.º	51 dias
I-8	9	4963	27.º	32 dias
I-9	13	7840	34.º	44 dias
I-10	13	7168	36.º	42 dias
III-1	9	2492	35.º	morreu no 35.º dia
III-2	12	12530	40.º	46 dias
III-3	14	1379	49.º	63 dias
III-4	14	266	44.º	44 dias
III-5	14	1869	47.º	47 dias
III-6	12	2828	35.º	56 dias
III-7	14	2037	47.º	47 dias
III-8	12	4480	37.º	42 dias
III-9	14	5418	44.º	44 dias
III-10	12	2191	37.º	42 dias
V-1	8	4620	27.º	38 dias
V-2	8	4802	36.º	56 dias
V-3	8	3199	39.º	40 dias
V-4	8	1372	32.º	morreu no 33.º dia
V-5	8	847	15.º	morreu no 15.º dia
V-6	11	3150	32.º	42 dias
V-7	11	7595	25.º	morreu no 25.º dia
V-8	8	1421	15.º	morreu no 16.º dia
V-9	11	9625	27.º	morreu no 36.º dia
V-10	8	8491	27.º	morreu no 27.º dia

em geral, elevada, superando o nível de 1.000 tripanossomos por mm³ no acme da infecção em todos, exceto três animais. Não se observou tendências para elevação ou decréscimo dos níveis parasitários nos repiques sucessivos. Os níveis parasitêmicos máximos foram atingidos entre o 27.º e 49.º dia após a inoculação, naqueles animais que sobreviveram e que constituem a maioria, como veremos adiante. Com relação a parasitemia, a amostra ora em estudo se comporta de maneira até certo ponto semelhante à da isolada do ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) por SIQUEIRA & col.¹¹; no entanto, a parasitemia foi mais variável no caso desta última amostra.

A duração da fase aguda variou entre 37 e 75 dias e neste particular a amostra em estudo se comportou aproximadamente como a do ouriço acima mencionada.

Dos 30 camundongos estudados 8 morreram, tendo a morte ocorrido em plena fase aguda e coincidindo com a parasitemia máxima atingida até então; a taxa de letalidade é, pois, de 26,7%.

Os tipos de curva parasitêmica variaram muito de animal para animal, mesmo de um único lote. De modo geral elas caem dentro dos quatro tipos descritos por CORRÊA & BARRETTO⁴ em camundongos infetados com a amostra de *Marmosa agilis agilis* (Burmeister, 1854) e por FERRIOLLI & BARRETTO⁶ em ratos infetados com a amostra do *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758). No Gráfico I apresentamos exemplos típicos de curvas parasitêmicas observadas: a) I-4 com ascensão e queda regulares; I-8 com ascensão regular e queda irregular; c) I-9 com ascensão irregular e queda regular; d) completa irregularidade.

Infetividade para triatomíneos — Um total de 120 ninfas em quinto estágio pertencentes às espécies, *P. megistus*, *T. infestans*, *T. sordida* e *R. neglectus*, foi alimentado em camundongos com infecção aguda. O exame do conteúdo intestinal obtido por dissecação desses triatomíneos deu os resultados sumariados no Quadro III.

Tais resultados indicam que o *P. megistus* mostrou-se a espécie mais suscetível, infetando-se em 96,7% dos casos; bem susce-

tível mostrou-se também o *R. neglectus*, que se infetou em 73,3% dos casos. Menor suscetibilidade se verificou no caso do *T. infestans* e *T. sordida* que exibiram índices de infecção respectivamente de 66,7% e 60,0%.

QUADRO III

Suscetibilidade de quatro espécies de triatomíneos à amostra de tripanossomo isolada do *Callicebus nigrifrons*

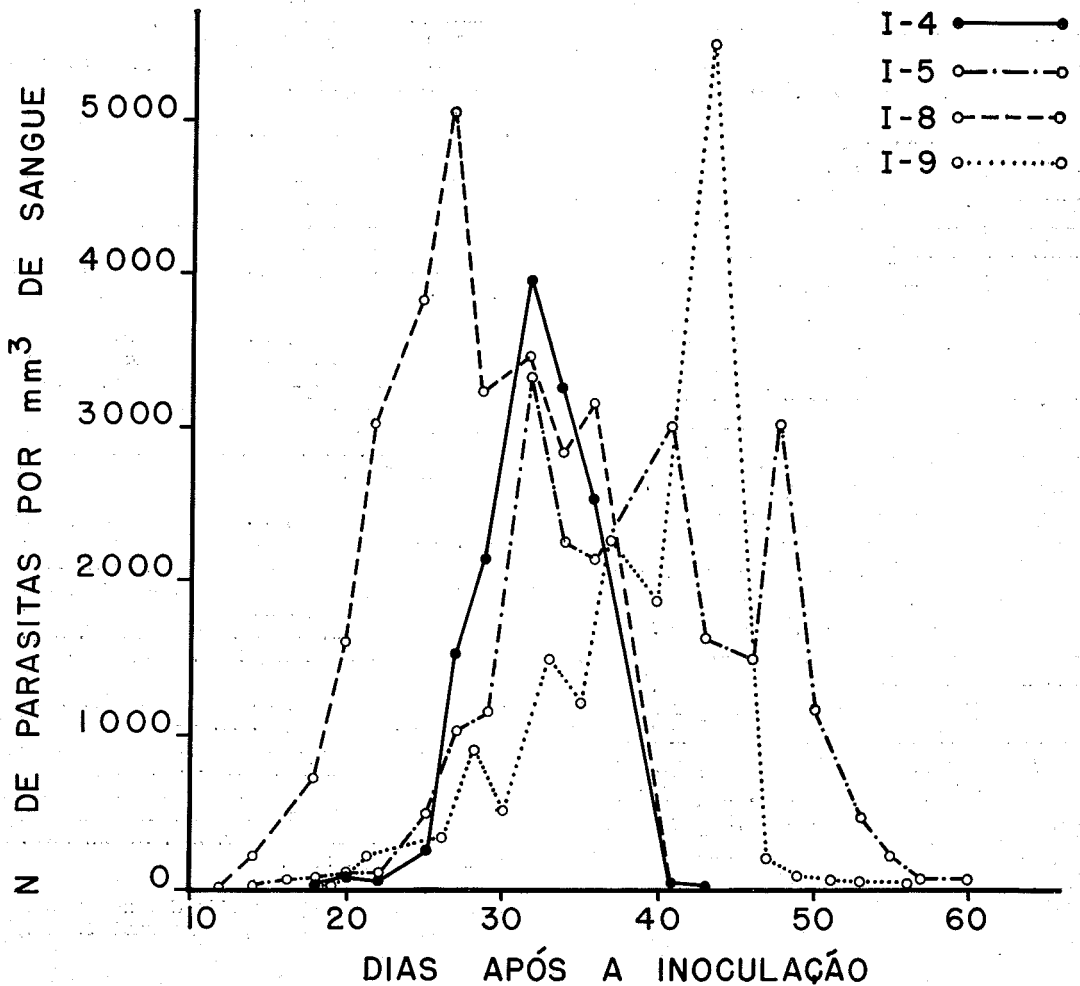
Espécie	Exemplares alimentados	Exemplares positivos	
		N.º	%
<i>P. megistus</i>	30	29	96,7
<i>T. infestans</i>	30	20	66,7
<i>T. sordida</i>	30	18	60,0
<i>R. neglectus</i>	30	22	73,3

Cultivabilidade — Semeando algumas gotas de sangue de camundongo com infecção aguda em meios NNN e de Warren, obtivemos bom crescimento inicial. A amostra foi, depois, facilmente mantida nesses meios mediante repiques quinzenais.

Imunidade cruzada — Procurando verificar se camundongos previamente infetados com a amostra de tripanossomos ora em estudo desenvolvem resistência contra posterior infecção por amostra de *T. cruzi* virulenta, reinoculamos dez camundongos que passaram para a fase crônica, com a amostra Y, usando como inóculo 0,2 ml de sangue citratado, obtido por punção cardíaca de animais com infecção aguda. Como testemunhas inoculamos, na mesma ocasião e com o mesmo inóculo, dez camundongos limpos, com idade e peso equivalentes aos do lote anterior.

Cinco dias após a inoculação todos os animais do lote testemunha já apresentavam parasitemia elevada, vindo a morrer entre o 15.º e o 20.º dia após a inoculação. Dos animais com infecção prévia pelo tripanossomo do sauá, apenas dois tiveram uma pa-

GRÁFICO I



Tipos de curvas parasitêmicas observadas em camundongos experimentalmente infetados com *T. cruzi* de *Callicebus nigrifrons*

rasitemia discretíssima e fugaz; os oito restantes continuaram negativos em repetidos exames de sangue a fresco.

CONCLUSÃO

Os caracteres morfológicos, biológicos e patogênicos, aliados aos resultados das provas de imunidade cruzada levam-nos a identificar o flagelado do sauá, *Callicebus nigrifrons* (Spix, 1823) como *T. cruzi* e a

considerar êsse símio como mais um hospedeiro natural do agente etiológico da doença de Chagas.

Nada podemos adiantar sôbre o papel do sauá na cadeia epidemiológica da tripanossomose americana porque, até agora só conseguimos examinar cinco exemplares do referido símio. Nada podemos também adiantar sôbre os transmissores porque, até agora, não tivemos oportunidade de encontrar triatomíneos convivendo com macacos.

S U M M A R Y

Studies on wild reservoirs and vectors of Trypanosoma cruzi. XXXII — Natural infection of the monkey, Callicebus nigrifrons (Spix, 1823) by T. cruzi

A strain of *T. cruzi* was isolated, through xenodiagnosis, from a specimen of *Callicebus nigrifrons* (Spix, 1823) captured at Uberaba, State of Minas Gerais, Brazil. This strain is pathogenic for baby mice, infecting one hundred per cent of the animals inoculated with parasitized blood or with metacyclic trypanosomes from triatomines. Blood trypanosomes in experimentally infected mice have a mean total length of 20.72 μ and a mean nuclear index of 1.36. Scanty leishmanial forms were seen in heart sections of mice killed during the acute phase of the infection. The infection in mice was severe, with high parasitemia but a low mortality rate of 26.7 per cent. Cross immunity tests showed that mice recovered from infection by the monkey strain had a high resistance against reinfection by the Y strain of *T. cruzi*. The monkey strain was easily cultivated in blood agar medium and in Warren's liquid medium. It infected four species of triatomines tested, giving the following infection rates: *P. megistus* 96.7 per cent, *R. neglectus* — 73.3 per cent, *T. infestans* — 66.7 per cent, and *T. sordida* — 60.0 per cent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. ALBUQUERQUE, R. D. R. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXX — Infecção natural do cachorro-domato, *Cerdocyon thous azarae* (Wied, 1824) pelo *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* (Em publicação).
3. CARVALHEIRO, J. R. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIII — Infecção natural do macaco, *Cebus apella versutus* Elliot, 1910 por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 26:101-114, 1966.
4. CORREIA, F. M. A. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores 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.
5. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VI — Infecção natural do roedor *Akodon arviculoides cursor* (Winge, 1885) por tripanossomo semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:72-81, 1965.
6. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores 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.
7. FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI — Infecção natural da preá, *Cavia aperea aperea* Erxleben, 1777 por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:267-276, 1966.
8. 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 do *T. cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 2:1-8, 1968.
9. IHERING, R. — *Da vida dos nossos animais*. São Leopoldo, Rotermond & Co., 1934.
10. MARINKELLE, C. J. — Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:109-116, 1966.
11. SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI Filho, F. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI — Infecção natural do ouriço, *Coendou insidiosus insidiosus* (Kuhl, 1820) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:155-162, 1967.
12. VIEIRA, C. C. — Os símios do Estado de São Paulo. Papéis Avulsos. São Paulo, Dept.º Zoologia 4:1-31, 1944.

Recebido para publicação em 30/10/1968.