

PRIMEIRO ENCONTRO DO *TRITOMA COSTALIMAI*
NATURALMENTE INFECTADO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:
ESTUDO DE ASPECTOS BIOLÓGICOS DA AMOSTRA ISOLADA

DALVA A. MELLO
MONAMARIS M. BORGES

Uma amostra de T. cruzi foi isolada pela primeira vez de um exemplar do Triatoma costalimai, capturado no município de Mambai, Goiás. Estudos experimentais sobre infectividade e virulência foram conduzidos em triatomíneos, Calomys callosus (Rodentia) e comundongos albinos. Cultivo "In Vitro" da amostra isolada foi obtido com sucesso utilizando-se o meio LIT. As mensurações realizadas em tripomastigotas sanguíneas deram os seguintes resultados (mcg): comprimento total - 16,4 ($\pm 1,1$); flagelo livre - 4,9 ($\pm 1,1$); largura - 2,8 ($\pm 0,6$); distância NA - 4,8 ($\pm 0,6$); distância NP - 6,0 ($\pm 0,5$) e Índice nuclear 1,3.

Cerca de 100 espécies de triatomíneos, já foram encontradas infectadas em condições naturais pelo *Trypanosoma cruzi* (Zeledon, 1976).

Com relação à espécie *Triatoma costalimai*, nada se sabe sobre o seu papel na epidemiologia da Doença de Chagas. Descrito por Verano & Galvão (1959), este reduviídeo foi originalmente encontrado em 1958 no município de Taguatinga, estado de Goiás, vivendo sobre rochas calcárias.

Durante as pesquisas sobre o ciclo silvestre de *Trypanosoma cruzi* no município de Mambai, Goiás, algumas ninfas de *T. costalimai* foram coletadas nesta região em ambiente natural, entre as quais uma encontrava-se infectada com um flagelado suspeito de ser *T. cruzi*.

O estudo aqui apresentado, teve por objetivo identificar, assim como investigar alguns aspectos biológicos deste flagelado, isolado pela primeira vez deste reduviídeo.

Trabalho realizado no Depto. de Medicina Complementar - Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição, Universidade de Brasília, 70910 - Brasília - DF.

Trabalho conduzido com o auxílio do CNPq - PDE/02-1-06.

Recebido para publicação em 9 de setembro de 1980.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Procedimento de Isolamento da Amostra

A amostra foi isolada a partir de um triturado em salina da ampola retal de um exemplar (ninha de IV estágio) do *T. costalimai* com formas epimastigotas e tripomastigotas. Este material foi inoculado em dois exemplares de *Calomys callosus* (Rodentia) nascidos em laboratório e dois *Mus musculus* albinos cepa "swiss". Estes roedores tinham cerca de 30 dias de idade, e foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 ml do triturado. Uma vez contados tripomastigotas no sangue circulante dos animais, procedeu-se o repique do material positivo para outros indivíduos suscetíveis (2 *C. callosus* e 2 *M. musculus*). Estas novas inoculações foram feitas por via intraperitoneal a partir de sangue do coração dos roedores anteriormente infectados. Destes, aquele que apresentou parasitemia mais alta, foi anestesiado com éter em condições assépticas e dele retirado sangue para semeadura em dois tubos de cultura com meio LIT.

O material semeado foi mantido em estufa a 28°C. Os tubos foram examinados pela primeira vez sete dias após a semeadura. Os outros animais inoculados, com exames de sangue também positivos, foram submetidos ao xenodiagnóstico com ninfas de II e IV estágio de *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus* e ninfas I estágio de *Dipetalogaster maximus*.

2. Estudo do Comportamento da Amostra "In Vivo"

Estudos sobre sensibilidade, evolução da parasitemia, determinação de período prepatente e aspectos histopatológicos, foram conduzidos em cinco *C. callosus* e cinco *M. musculus* albinos, cepa "swiss". Estes animais foram inoculados por via intraperitoneal com 10^4 tripomastigotas metacíclicos, obtidos no meio LIT e contados da maneira que está descrita em Camargo (1964), com auxílio da câmara de Neubauer.

Exames diários do sangue da cauda destes animais foram realizados, para determinação do período prepatente. A evolução da parasitemia foi acompanhada após a prepatência, em dias alternados. As contagens foram realizadas durante trinta dias, após as inoculações de acordo com a técnica de Brener (1965). Os animais que sobreviviam à infecção eram submetidos a xenodiagnósticos como está descrito no item 1, e então sacrificados.

Destes indivíduos foram retirados fragmentos dos seguintes órgãos: fígado, baço, esôfago, intestinos delgado e grosso, pulmão, cérebro e músculo da coxa. O coração e o rim foram retirados inteiros. Este material foi fixado em formol a 10% para estudos de alterações histológicas e pesquisa de ninhos de amastigotas. Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em secções de 5 mcg de espessura e corados com hematoxilina-eosina.

Testes de imunidade cruzada, utilizando-se a cepa Berenice (de origem humana e virulenta) foram realizadas em quatro *C. callosus* e quatro camundongos, como recomenda Barretto (1970).

3. Estudo de Suscetibilidade de Triatomíneos

Para testar a capacidade de *R. neglectus*, *P. megistus* e *D. maximus* se infectarem com a amostra em estudo, foram utilizados 54, 71 e 54 ninfas, respectivamente como citadas no item 2. Os triatomíneos em jejum prolongado eram colocados para se alimentar nos animais comprovadamente infectados sendo suas fezes examinadas trinta dias depois. Os que estavam negativos eram submetidos a novos exames no 60º dia, ocasião em que era também dissecado seu tubo digestivo.

4. Estudo de Crescimento e Diferenciação "In Vitro"

Os estudos de crescimento de diferenciação foram acompanhados durante 264 horas, em intervalos de 24 horas. As contagens eram feitas em câmara de Neubauer (Carmargo, 1964), separando-se cuidadosamente cada forma.

Após o primeiro isolamento da amostra no meio LIT, como está referido no item 1, foram realizados sucessivamente um segundo e terceiro repiques, obtendo-se então neste último crescimento abundante de parasitos. A partir do terceiro repique, cinco tubos contendo 8 ml do meio LIT, foram semeados cada um com aproximadamente 99.600 formas do tripanossoma, distribuídas como se segue: 48.000 amastigotas, 30.000 epimastigotas e 21.600 tripomastigotas. A população final de parasitas/ml diluída por tubo ficou sendo 6.000 amastigotas, 3.750 epimastigotas e 2.700 tripomastigotas, perfazendo um total de 12.450 indivíduos em cada ml.

5. Estudos Morfológicos

Os estudos morfológicos de tripomastigotas sanguícolas foram realizados como recomenda Barretto (1970). Observações morfológicas de outras formas foram realizadas em lâminas com material de cultura e fezes positivas de barbeiros. Todo material foi corado pelo Giemsa-May Grünwald. Desenhos em câmara clara (x 800) e fotografias (x 1200) foram feitas de várias formas. As mensurações dos tripomastigotas sanguícolas foram tomadas em 20 formas com o auxílio de um curvímetro.

RESULTADOS

1. Isolamento de Amostra

A amostra em estudo pode ser isolada facilmente do sangue dos *C. callosus* (total = 4) e *M. musculus* (total = 4) inoculados com o material da ampola retal do *T. costalimai*. Os resultados dos triatomíneos alimentados nestes animais foram positivos. A cultura no LIT, a partir o sangue contendo as formas tripomastigotas, foi também positiva 7 dias após o inóculo.

2. Estudo do Comportamento da Amostra "In Vivo"

Os resultados obtidos sobre a evolução da prepatência e parasitemia dos *C. callosus* e *M. musculus*, estão apresentados nas Tabelas I e II.

TABELA I

Prepatência da cepa de *T. cruzi* isolada no *Triatoma costalimai* em *Calomys callosus* e *Mus musculus*

<i>Animais Inoculados</i>	<i>Período prepatente Média</i>	<i>(dias) amplitude</i>
<i>C. callosus</i>	4,8	4-5
<i>M. musculus</i>	9,4	11-12

O período prepatente (Tabela I) foi significativamente mais curto em *C. callosus* do que em camundongos.

TABELA II

Evolução da Parasitemia do *T. cruzi* isolado de *Triatoma costalimai*, em *Calomys callosus* e *Mus musculus* albinos

Número de dias após a inoculação	Número médio de parasitas/5mm ³ *	
	<i>C. callosus</i>	<i>M. musculus</i>
4	10	0
5	620	0
7	272	0
10	400	0
12	3.750	33,3
14	1.140	116,6
16	2.172	12,5
18	1.210	366,6
20	1.090	233,3
23	760	33,3
25	630	50,0
27	430	12,5
29	410	50,0

*Em 5 roedores de cada espécie.

Como mostra a Tabela II os níveis de parasitos no sangue circulante de *C. callosus*, foi significativamente mais alto do que em *M. musculus*. Ressalte-se que entre cinco camundongos inoculados, apenas em três foi possível acompanhar a evolução da parasitemia. Destes, o quarto animal veio a falecer no 16º dia após o inóculo. Este camundongo desenvolveu parasitemias entre 50-450 parasitas/5mm³. Sendo encontrado morto em avançado estado de putrefação não foi possível retirar deste animal material para estudos histopatológicos. O quinto camundongo não apresentou parasitemia patente, no entanto o xenodiagnóstico foi positivo.

Os picos de população dos tripomastigotas após as inoculações ocorreram nos *C. callosus*, entre o 12º e o 20º dia, e nos camundongos entre o 18º e 20º dia.

As alterações histopatológicas foram discretas no *C. callosus*. Os resultados obtidos foram os seguintes: um animal tinha pseudocistos no coração, intactos e sem reações inflamatórias (Fig. 1); três apresentavam no coração discreto infiltrado inflamatório de células mononucleares; e no último não foi encontrada qualquer reação inflamatória nem pseudocistos.

As observações realizadas nos camundongos indicaram que estes animais sofreram maior agressividade da cepa de *T. cruzi* em estudo, do que os *C. callosus*. Quatro camundongos apresentaram intensa reação inflamatória na musculatura dos intestinos delgado e grosso, coração (Fig. 1) e coxa; o pulmão também apresentou infiltrado inflamatório. A presença de pseudocistos foi registrada na musculatura do intestino delgado, coração e coxa (Fig. 3).

Os *C. callosus* e camundongos submetidos à reinoculações com a cepa Berenice, para testar a imunidade cruzada, sobreviveram às reinfecções. Os testemunhos do *C. callosus* também sobreviveram mas, os camundongos morreram 7 dias após as inoculações.

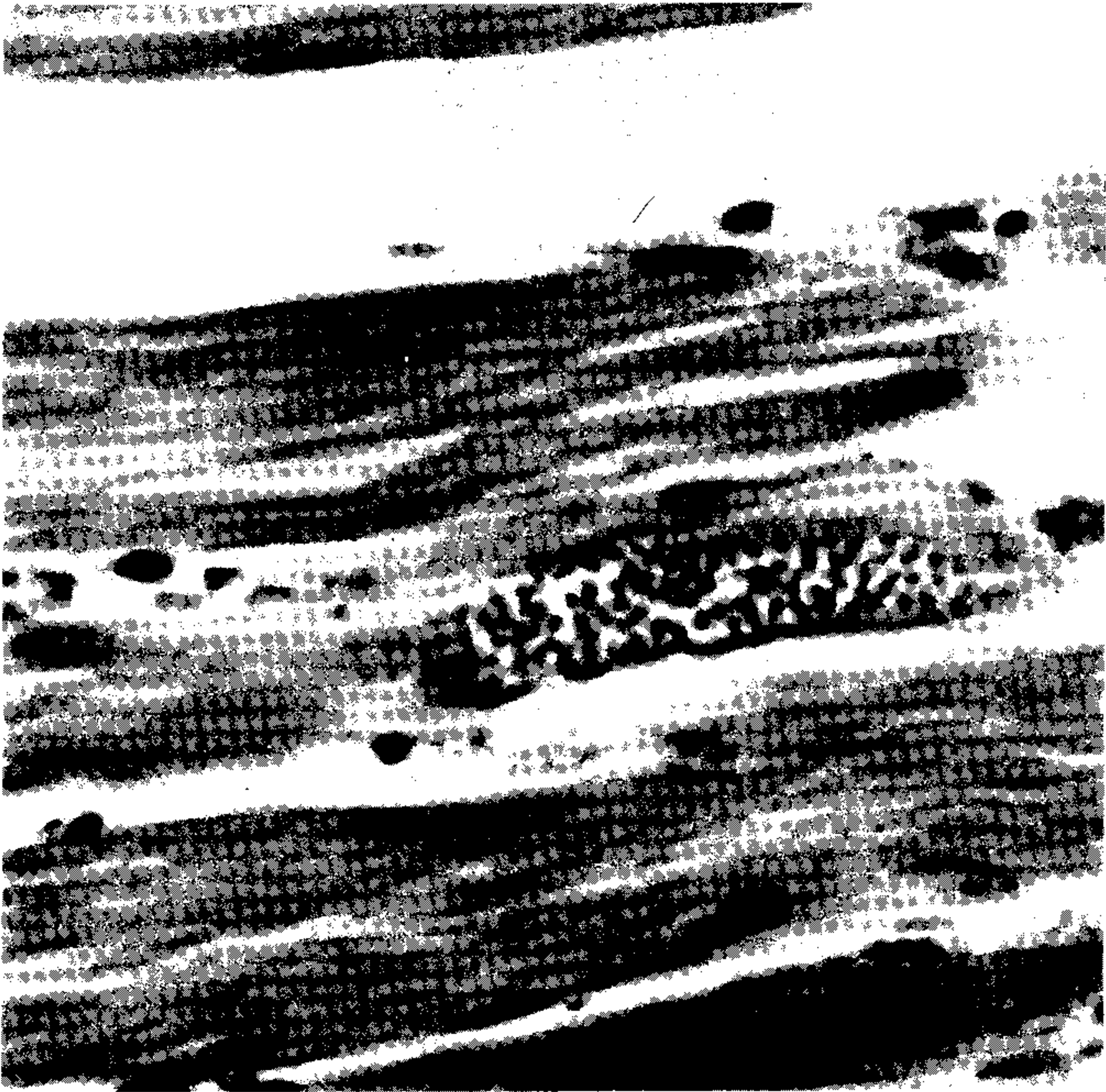


Fig. 1 – Pseudocisto na fibra muscular do coração de *C. callosus* infectado com a amostra de *T. cruzi* isolada do *T. costalimai*. Notar a ausência de reação inflamatória.

3. Estudo da Suscetibilidade de Triatomíneos

Na Tabela III estão os resultados obtidos sobre a suscetibilidade dos triatomíneos à amostra de *T. cruzi* investigada. Como pode ser visto as três espécies de barbeiros testados apresentaram percentuais semelhantes de positividade, variando entre 46,3% e 57,4%.

4. Estudo "In Vitro"

A amostra de *T. cruzi* estudada cresceu bem no LIT apresentando nos repiques iniciais abundantes aglomerados de formas amastigotas. Tais formas, entretanto, desapareceram após repiques sucessivos. O pico máximo de população das formas ocorreu como segue: amastigotas às 168 horas; epimastigotas às 144 horas e tripomastigotas às 120 horas.

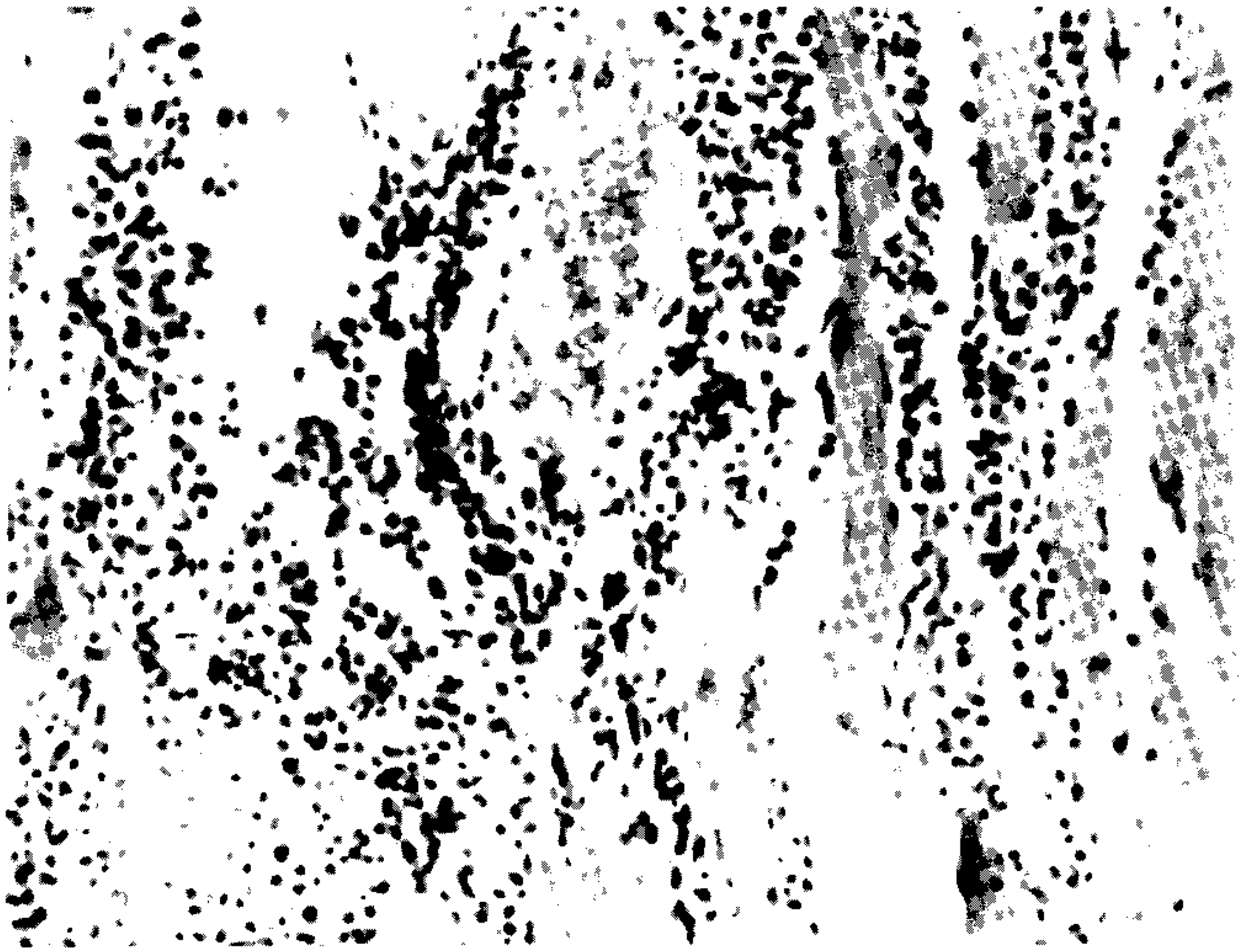


Fig. 2 – Corte do coração de camundongo infectado com a amostra de *T. cruzi* isolada do *T. costalimai*. Observar o intenso infiltrado inflamatório e ausência de pseudocistos.

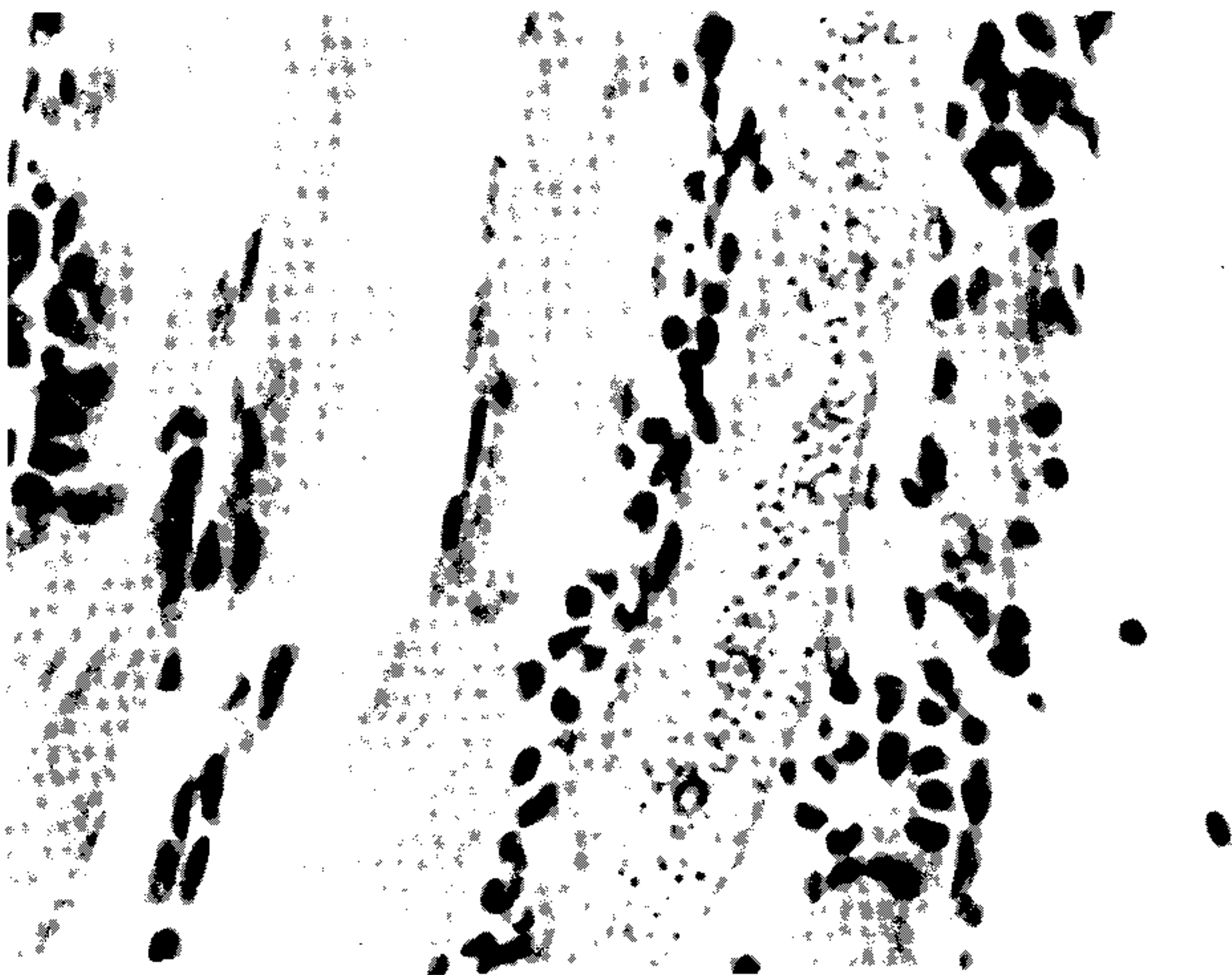


Fig. 3 – Pseudocisto com reação inflamatória encontrado na musculatura da côxa de camundongo inoculado com a amostra de *T. cruzi*, isolada do *T. costalimai*.

TABELA III

Suscetibilidade de três espécies de Triatomíneos à cepa silvestre de *T. cruzi* isolada de *Triatoma costalimai*

<i>Espécies de triatomíneos</i>	<i>Total de Alimentados</i>	<i>Total de positivos</i>	<i>% de positivos</i>
<i>R. neglectus</i>	54	31	57,4
<i>P. megistus</i>	71	33	46,5
<i>D. maximus</i>	54	25	46,3

5. Estudos Morfológicos

Os resultados das mensurações (mcg) realizadas nas tripomastigotas sanguícolas foram os seguintes:

Comprimento total	—	16,4 (± 1,1)
Flagelo Livre	—	4,9 (± 1,1)
Largura	—	2,8 (± 0,6)
Distância NA	—	4,8 (± 0,6)
Distância NP	—	6,0 (± 0,5)
Índice Nuclear	—	1,3

A Fig. 4 mostra a microfotografia de tais formas, enquanto na Fig. 5 estão os desenhos das formas sanguícolas, de cultura e fezes de triatomíneos. Nas lâminas coradas as tripomastigotas sanguícolas se apresentavam em forma de "C" com o citoplasma bastante granuloso, corado de azul violeta. A morfologia se assemelha mais às formas largas descritas por Brener & Chiari (1963).

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

A amostra de tripanossoma isolada de *T. costalimai* mostrou-se infectante para os *C. callosus*, camundongos e triatomíneos utilizados nos experimentos.

O encontro de lesões, compatíveis aos achados em infecções experimentais com cepas de *T. cruzi* de origens diversas, assim como a presença de pseudocistos de amastigotas em células musculares, comprovam os aspectos agressivos, embora tênues, da amostra estudada. A evolução da infecção seguiu padrão semelhante ao das amostras silvestres, estudadas por Mello et al. (1979).

Quanto à morfologia das formas sanguícolas, de cultura e das fezes dos triatomíneos alimentados nos animais infectados, verifica-se que se apresenta semelhante às do *T. cruzi* (Hoare, 1972). Particularmente com relação às formas sanguícolas, como pode ser visto na figura, elas se assemelham mais ao tipo larga e intermediária, descritas por Brener & Chiari (1963). As mensurações estão compatíveis com aquelas encontradas para *T. cruzi* (Barretto, 1970 e Hoare, 1972).

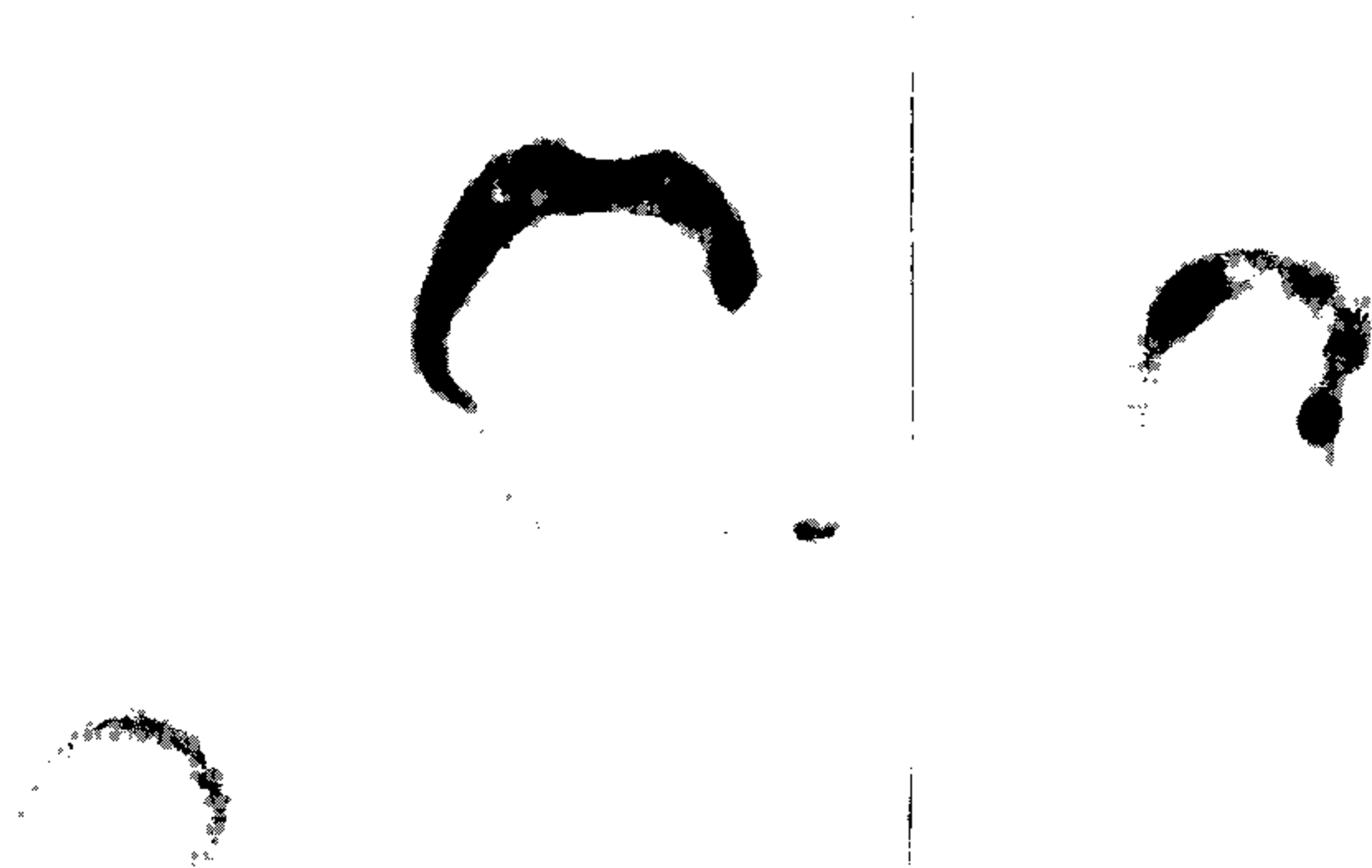


Fig. 4 - Microfotografia dos tripanossomas sanguícolos, encontrados no sangue circulante de *C. callosus* infectado, com a amostra de *T. cruzi* isolada do *T. costalimai*.

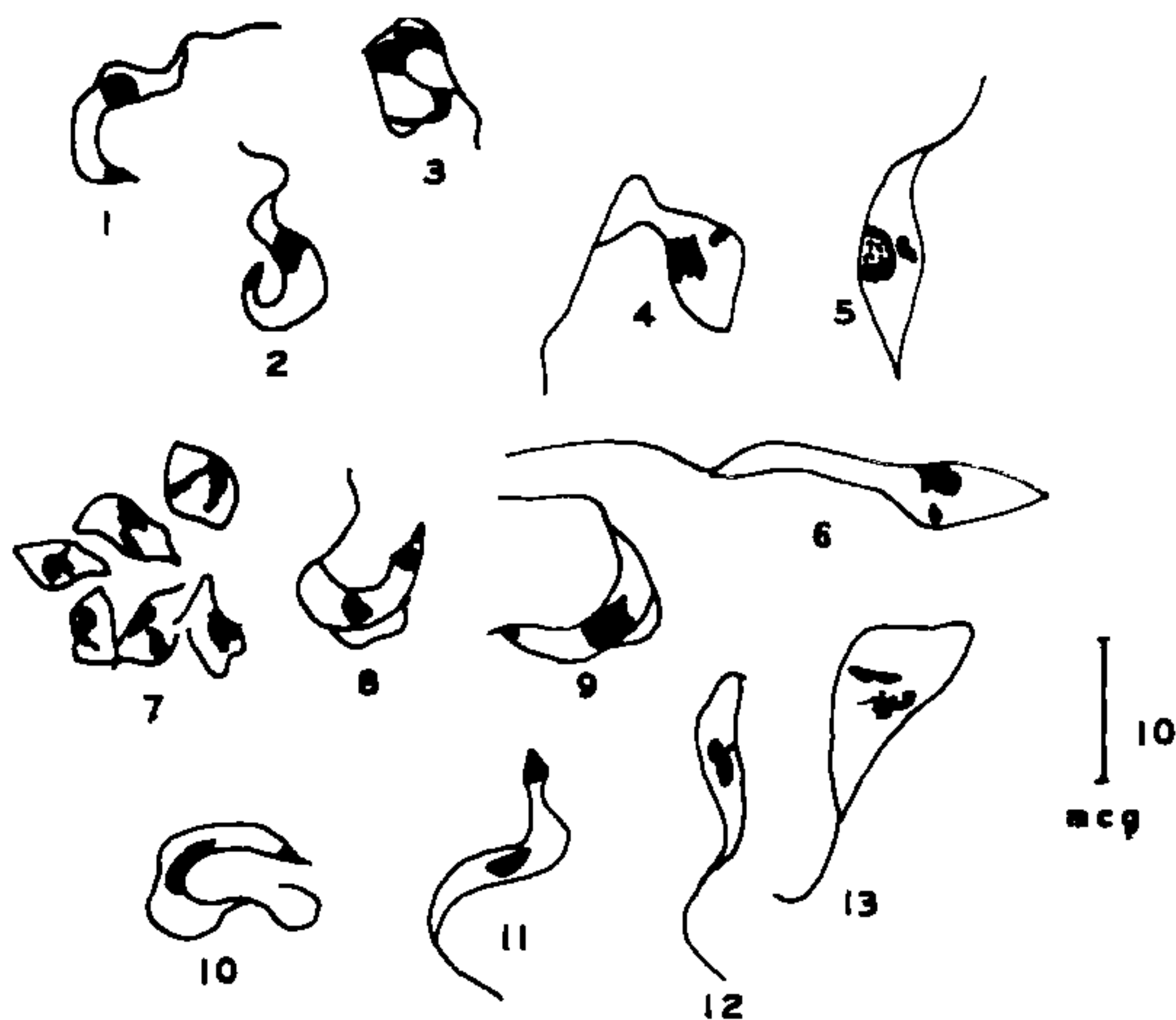


Fig. 5 - Desenhos dos tripanosomas (x 800), da amostra de *T. cruzi*, isolada do *T. costalimai*: 1 - 3 sangue circulante; 4 - 9 meio LIT; 10 - 13 fezes de triatomíneos.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi is for the first time recorded infecting *Triatoma costalimai* captured in Mambaí county, state of Goiás, Brasil.

The isolated strain is easily cultivated on LIT medium.

The above *T. cruzi* strain was inoculated in mice and in *Calomys callosus* (Rodentia). The infection can be considered mild in those animals. The prepatent period was 9,4 days for mice and 4,8 days for *C. callosus*. No lethality for *C. callosus* was observed during the period of observations. The maxima observed parasitemia was: 366.6/5mm³ for mice and 3,750/5mm³ for *C. callosus*. Pseudocysts were found in muscles cells of both infected rodent species. Cross-immunity tests showed that a previous infection gives resistance against reinoculation with a virulent *T. cruzi* strain.

Nymphs of *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius neglectus* and *T. infestans* fed on infected animals acquired the infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETTO, M.P., 1970. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLIII, sobre a validade das espécies americanas incluídas no subgênero *Schizotrypanum* Chagas, 1909 do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1943. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 13 :272-280.
- BRENER, Z. & CHIARI, E., 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 5 :220-224.
- BRENER, Z., 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 59 :19-26.
- CAMARGO, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 6 :9-100.
- HOARE, C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 749 p.
- MELLO, D.A.; VALIN, E. & TEIXEIRA, M.L., 1972. Alguns aspectos dos comportamentos de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus* (Rodentia). *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*, 13 :314-325.
- VERANO, O.T. & GALVÃO, A.B., 1959. I. *Triatoma costalimai* n. sp. *Rev. Bras. Mal. D. Trop.* 10 :199-205.
- ZELEDON, R., 1976. Effects of Triatominae behavior on Trypanosome Transmission. *Pan. Am. Hlth. Org. Sc. Publ.* 318 :326-329.