

## INCAPACIDADE DE EVOLUÇÃO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* NA HEMOCELE DE TRIATOMÍNEOS

NELSON J. ALVARENGA  
ELIZABETH BRONFEN

*O exame da hemolinfa de triatomíneos (Triatoma infestans e Dipetalogaster maxima) infectados pelo Trypanosoma cruzi há 10, 15, 20 e 30 dias não revelaram a presença do flagelado. Material colhido e lavado da hemocele de D. maxima infectados, também foi negativo.*

*A inoculação de formas sanguíneas do parasita e daquelas obtidas do conteúdo intestinal de triatomíneos na hemocele revelou que os parasitas não foram capazes de manter na hemolinfa uma infecção por mais de 40 dias e que não puderam penetrar no intestino dos triatomíneos.*

*A inoculação de hemolinfa de insetos naturalmente infectados em camundongos recém-nascidos não induziu infecção.*

Embora Chagas (1909) aventasse a possibilidade do *Trypanosoma cruzi* evoluir também na hemolinfa dos triatomíneos, de onde alcançaria as glândulas salivares, diferentes autores descreveram a evolução do parasita ocorrendo somente ao longo do trato intestinal de seus vetores (Brumpt, 1912; Dias, 1932a e 1934; Brack, 1968; Lapierre, 1972 e Alvarenga, 1974). Dias (1932a, 1934), Naquira (1963) e Tobie (1968) realizaram infecções experimentais pelo *T. cruzi* na hemocele de triatomíneos na tentativa de verificarem a possibilidade da sobrevivência e migração para o intestino e glândulas salivares dos insetos, não concluindo entretanto por uma continuidade no ciclo de vida do parasita. Lacombe (1981) propôs um novo ciclo evolutivo do *T. cruzi* no inseto, onde a passagem do parasita pela hemolinfa antecederia seu aparecimento na ampola retal.

No presente trabalho foi estudada a capacidade de evolução de formas sanguíneas do *T. cruzi*, bem como daquelas obtidas de conteúdo intestinal de insetos naturalmente infectados quando injetadas na hemocele dos triatomíneos.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Triatomíneos:* foram usados *Triatoma infestans* e *Dipetalogaster maxima*, provenientes da criação existente no Centro de Pesquisas René Rachou e da Universidade de Brasília.

---

Trabalho conduzido com auxílio do CNPq no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Caixa Postal 1743 – 30000 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Recebido para publicação em 26 de março e aceito em 24 de maio de 1982

*Cepas de T. cruzi*: Y e CL, isoladas respectivamente por Silva & Nussenzweig (1953) e Brener & Chiari (1962), mantidas em camundongos por passagens periódicas de sangue.

## INFECÇÃO DE TRIATOMÍNEOS:

### 1) Infecção natural da hemolinfa

Quarenta ninfas de 3<sup>o</sup> estágio de *T. infestans* e 40 de 1<sup>o</sup> estágio de *D. maxima* foram alimentadas em camundongos previamente infectados pela cepa CL do *T. cruzi*. Após 10, 15, 20 e 30 dias de alimentação, 10 insetos de cada espécie foram separados, para exame. A hemolinfa foi colhida, deixando-a fluir naturalmente após seccionamento das bases das coxas, das patas e as fezes eram em seguida colhidas por pressão abdominal. Desta forma, o material proveniente de cada inseto foi examinado em microscópio de contraste de fase. Estas técnicas foram repetidas em todos os experimentos que se seguiram.

### 2) Capacidade de evolução de formas sangüíneas na hemolinfa

Quarenta ninfas de 3<sup>o</sup> estágio e 20 ninfas de 4<sup>o</sup> estágio de *D. maxima* foram inoculadas na hemocele por formas sangüíneas da cepa CL do *T. cruzi*, lavadas conforme técnica descrita por Alvarenga & Brener (1978) e suspensas em meio LIT diluído em igual volume de salina. Os insetos eram imobilizados por meio de esparadrapo em placa de Petri, contendo parafina e sob microscópio estereoscópico, inoculando-se o material, com seringa de 0,5ml (1/100) munida de agulha BD-3, introduzida na base inferior do trocanter de uma das patas do 3<sup>o</sup> par, evitando-se assim perfurar o intestino ou um tubo de Malpighi. O inóculo para cada inseto foi de 0,01 a 0,02ml, contendo um mínimo de 200 flagelados, sendo o ponto de inóculo imediatamente cauterizado por agulha aquecida em chama. Vinte ninfas foram mantidas intactas em um mesmo recipiente e as 40 restantes tiveram suas probóscidas cauterizadas.

Ao primeiro grupo foi oferecido repasto em camundongos não infectados no 3<sup>o</sup> dia após o inóculo. No momento do repasto notou-se a ocorrência de canibalismo por parte de 5 insetos, que foram retirados e mantidos em separado. Novo repasto foi oferecido aos 35 dias quando se procedeu à coleta de urina conforme técnica utilizada por Zeledon, Alvarenga & Schosinsky (1977). Posteriormente coletou-se a hemolinfa e em seguida, dissecados os triatomíneos, foram retirados os intestinos para exame de seu conteúdo, após lavagem da hemocele com salina.

Os insetos que tiveram suas probóscidas cauterizadas para prevenir o fenômeno do canibalismo, foram examinados aos 5, 15, 25 e 30 dias após o inóculo, sendo o resultado apresentado na Tabela I.

TABELA I

Exame de *D. maxima* inoculados na hemocele com formas sangüíneas da cepa CL do *T. cruzi*, após terem sua probóscida cauterizada

<i>Dias após inóculo</i>	<i>Hemolinfa (positivo/total)</i>	<i>Conteúdo intestinal (positivo/total)</i>
5	6/6	0/6
15	3/21	0/21
25	0/6	0/6
30	0/5	0/5

3) *Capacidade de evolução, na hemolinfa, de flagelados obtidos de conteúdo intestinal de triatomíneos*

Quarenta ninfas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios de *D. maxima* foram inoculadas na hemocele, com flagelados da cepa Y do *T. cruzi*, provenientes de conteúdo intestinal de triatomíneos previamente infectados. Para a obtenção destes parasitas, os insetos foram dissecados, sendo retirados seus retos e colocados em salina e meio LIT, 1:1. O material foi então macerado em "tissue grinder" e em seguida filtrado sob pressão em seringa, contendo 6 confetes de papel Whatman n<sup>o</sup> 3 de maneira a se reter cristais de urato e maiores detritos. Os inóculos foram realizados conforme descrito anteriormente sendo em seguida cauterizada a probóscida dos insetos.

Os exames da hemolinfa e conteúdo intestinal foram realizados aos 7, 15, 25 e 35 dias após o inóculo (Tabela II).

TABELA II

Exame de *D. maxima* inoculados na hemocele com formas da cepa Y do *T. cruzi*, obtidas no conteúdo intestinal de triatomíneos

<i>Dias após inóculo</i>	<i>Hemolinfa (positivo/total)</i>	<i>Conteúdo intestinal (positivo/total)</i>
7	6/6	0/6
15	0/10	0/10
25	0/7	0/7
35	1/6	0/6

4) *Infecção de camundongos recém-nascidos*

Hemolinfa colhida de 10 exemplares de *D. maxima* de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> estádios, infectados há 30 e 60 dias, respectivamente, com a cepa CL do *T. cruzi*, foi inoculada subcutaneamente em 9 camundongos albinos de 2 dias de nascimento. Cada animal recebeu uma dose de 10 µl. Após 7, 11, 17 e 20 dias foram realizados exames de gota de sangue retirada da cauda de cada um deles; 30 dias após o inóculo, os animais receberam uma dose intraperitoneal de 100.000 tripomastigotas sanguíneos da mesma cepa CL do *T. cruzi*.

## RESULTADOS

1) *Verificação da infecção natural da hemolinfa*

Todos os 40 *T. infestans* e 40 *D. maxima* examinados em grupos de 10 após 10, 15, 20 e 30 dias decorridos da alimentação em camundongos infectados apresentaram parasitas nas fezes, nenhum na hemolinfa.

2) *Capacidade de evolução de formas sanguíneas na hemolinfa*

Do experimento em que os insetos intactos foram mantidos em um mesmo recipiente, exames feitos aos 35 dias revelaram que somente 4 dos 5 insetos que praticaram canibalismo apresentaram flagelados no conteúdo intestinal. Entre os outros 12 sobreviventes, 4 ainda tinham sua hemolinfa positiva e os outros 8 não acusaram parasitas na hemolinfa nem no conteúdo intestinal.

Entre os que tiveram sua probóscida cauterizada, também não se observou aparecimento do parasita no intestino dos insetos, como se verifica na Tabela I, onde se nota um gradativo desaparecimento de flagelados na hemolinfa.

### 3) Capacidade de evolução, na hemolinfa, de flagelados obtidos de conteúdo intestinal de triatomíneos

Quando procurou-se observar a evolução de flagelados provenientes de conteúdo intestinal de triatomíneos inoculados na hemolinfa de outros, verificou-se também um gradativo desaparecimento do parasita e jamais a sua presença no intestino dos insetos (Tabela II).

### 4) Infecção de camundongos recém-nascidos

Foi negativo aos 7, 11, 17 e 20 dias, o exame de sangue caudal de todos os camundongos infectados com a hemolinfa de *D. maxima* os quais haviam sido naturalmente infectados. Quinze dias após o inóculo das formas sangüíneas todos os animais controle haviam morrido.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pelos experimentos feitos acreditamos termos oferecido ao *T. cruzi* condições necessárias para seu desenvolvimento na hemocele dos triatomíneos. O fato de realizarmos inóculos de formas sangüíneas ou provenientes de conteúdo intestinal de triatomíneos teve a finalidade de se saber quais as formas que poderiam dar continuidade ao ciclo evolutivo do parasita. Em nenhum experimento foi possível observar essa continuidade.

Diferentes autores preocuparam-se em verificar a possibilidade da infecção pelo *T. cruzi* através da picada do inseto vetor, uma vez que era negligenciado o fato de que tal evento pudesse ocorrer através das fezes dos triatomíneos. Segundo Pipkin (1969) Torres em 1915, embora tendo conseguido este tipo de infecção, ao dissecar os insetos utilizados nos experimentos não conseguiu detectar parasitas na hemolinfa nem nas glândulas salivares. O fato da regurgitação do triatomíneo no momento da alimentação (Friend & Smith, 1971) e o fato de que formas metacíclicas são encontradas também no "estômago" dos insetos (Alvarenga & Araújo, 1975), nos levam a aceitar a possibilidade da ocorrência eventual da transmissão, por regurgitação, do parasita pela picada do vetor. Jorg & Ngumo-Natula (1979) demonstraram este fato quando observaram 3,6% de infecção em camundongos que serviram de repasto a triatomíneos previamente infectados e mantidos isoladamente, tomando precaução para impedir o contato das fezes emitidas durante o repasto com os animais.

Chagas (1909) foi na realidade o único que se prendeu em defender a tese de que a evolução do *T. cruzi* nos triatomíneos incluía um estágio na hemocele com as formas infectantes indo se instalar nas glândulas salivares. Esses achados baseavam-se em apenas três observações, dos vários insetos dissecados, de formas flageladas na hemolinfa e glândulas salivares. O fato foi contestado por Brumpt (1912) que descreveu a evolução do parasita como ocorrendo somente no intestino e sendo a infecção adquirida pelo vertebrado através das fezes do triatomíneo. Tal como sugerido por Pipkin (1969), acreditamos que talvez Chagas, em suas raras observações de flagelados na hemolinfa e glândulas salivares de triatomíneos, estivesse diante de casos de infecção mista por *T. cruzi* e *T. rangeli* ou mesmo de uma contaminação por material de conteúdo intestinal como aventado por Brumpt (1939).

Dias (1932b, 1934) foi um dos que se preocupou a respeito da possibilidade desta evolução extra-intestinal do *T. cruzi* e parasitismo das glândulas salivares dos insetos. Seus experimentos demonstraram que a evolução natural do parasita ocorre no trato digestivo dos triatomíneos, sendo a infecção de vertebrados ocasionada por contaminação de suas fezes.

Tobie (1968) demonstrou como processo de diferenciação entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, a incapacidade de continuidade de evolução do *T. cruzi* na hemocele do inseto hospedeiro.

Ponce, Trochez & Zeledon (1974), examinando *Rhodnius prolixus*, capturados em área de *T. cruzi* e *T. rangeli*, conseguiram diferenciar entre ambas as espécies de proto-

zoários, através de exames de fezes, de hemolinfa e glândulas salivares, tendo constatado até mesmo infecções mistas. Se constituísse fato comum o *T. cruzi* apresentar normalmente sua evolução também a nível de hemolinfa, certamente os autores seriam alertados, pois todos os insetos parasitados, não importando por qual parasita, teriam flagelados em sua hemocele.

Em nossos experimentos, a demonstração do *T. cruzi* no intestino de insetos que receberam o parasita por inóculo na hemolinfa só foi possível quando foram criadas as condições para que ocorresse o fenômeno do canibalismo. Tal como Phillips (1969) bem demonstrou, um inseto sugando a outro ingere também hemolinfa.

Em caso de evolução do *T. cruzi* na hemolinfa dos triatomíneos natural ou experimentalmente infectados por ingestão do parasita, ela deveria ser evidenciada por exame a fresco do material, tal como ocorre quando se examina a hemolinfa de triatomíneos infectados pelo *T. rangeli*. Exames de triatomíneos, capturados em zonas endêmicas de doença de Chagas do Estado de Minas Gerais, positivos ou não para o *T. cruzi*, nunca revelaram a presença do parasita na hemolinfa.

O fato de camundongos recém-nascidos inoculados com hemolinfa de insetos parasitados não terem sobrevivido ao inóculo de formas sangüíneas, indica não serem eles portadores de infecção anterior.

## CONCLUSÃO

Os experimentos acima expostos nos levam a admitir que:

- Formas sangüíneas do *T. cruzi* e as do conteúdo intestinal de triatomíneos, quando inoculados na hemocele do inseto vetor, gradualmente vão desaparecendo, demonstrando não terem condições suficientes de sobrevivência na hemolinfa.
- As diferentes formas do *T. cruzi* inoculadas na hemocele dos triatomíneos não foram capazes de invadir o intestino dos insetos.
- O *T. cruzi*, quando ingerido por triatomíneos, não é capaz de passar naturalmente para a hemocele restringindo sua evolução ao trato digestivo do vetor.

## SUMMARY

Examination of haemolymph from triatomine-bugs (*Triatoma infestans* and *Dipetalogaster maxima*) harboring *Trypanosoma cruzi* infection for 10, 15, 20 and 30 days did not reveal the presence of flagellates. Material obtained by washing out the haemocoel of infected *D. maximus* was also negative. Inoculation of bloodstream trypomastigotes and triatomine intestinal flagellates into the haemocoel revealed that parasites were not able to maintain a detectable infection in the haemolymph for more than 40 days and that parasites could not enter in the intestine of triatomines. Inoculation of haemolymph of infected bugs in baby-mice has not induced infection.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Philip Marsden da Universidade de Brasília pelo apoio e fornecimento de *D. maxima*, bem como ao Dr. Zigmã Brener pela revisão do texto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, N.J., 1974. Evolução do *Trypanosoma cruzi* no trato digestivo do *Triatoma infestans*. Tese de Mestrado. Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, 55 pp.
- ALVARENGA, N.J. & ARAÚJO, V., 1975. Tripomastigotas metacíclicos do *Trypanosoma cruzi* no "estômago" de *Triatoma infestans*. V Congresso de Medicina Tropical, Belém – Pará.
- ALVARENGA, N.J. & BRENER, Z., 1978. Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector in the absence of blood. *Acta Trop.*, 35 :315-317.
- BRACK, C., 1968. Elektronmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*, *Acta Trop.*, 25 :289-356.
- BRENER, Z. & CHIARI, E., 1962. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5 :220-224.
- BRUMPT, E., 1912. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 5 :360-364.
- BRUMPT, E., 1939. Mode de transmission de la maladie de C. Chagas. *Ann. parasit.*, 17 :320-331.
- CHAGAS, C., 1909. Nova tripanosomiase humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1 :159-218.
- DIAS, E., 1932a. O *Trypanosoma cruzi* pode evoluir na cavidade do *Triatoma megistus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 26 :83-84.
- DIAS, E., 1932b. Experiences sur la transmission du *Trypanosoma cruzi* de l'insecte au vertébré. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, Rio de Janeiro, 111 :490-492.
- DIAS, E., 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28 :1-110.
- FRIEND, W.G. & SMITH, J.J., 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J. Insect Physiol.*, 17 :233-243.
- JORG, M.E. & NGUMO-NATULA, O., 1979. Inoculación de *Trypanosoma cruzi* por picadura de *Triatoma infestans*. V. Cong. Latinoamer. Parasitol. Buenos Aires, Argentina.
- LACOMBE, D., 1981. Ciclo extra-intestinal do *Trypanosoma cruzi* em espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. *Rev. Brasil. Biol.*, 41 :521-528.
- LAPIERRE, J., 1972. Evolution de *Trypanosoma cruzi* chez *Triatoma megista*. *Ann. parasit.*, 47 :17-27.
- NAQUIRA, C., 1963. Estudio preliminar sobre la infección celónica de *Triatoma infestans* por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma* sp. de mono. *Biologica* 35 :3-8.
- PHILLIPS, N.R., 1969. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*. Aspects of the rearing, maintenance and testing of vector material and of the origin and course of infection in the vector. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 54 :397-414.
- PIPKIN, A.C., 1969. *Trypanosoma cruzi*, transmission by arthropod vector. *Intern. Rev. Trop. Med.*, 3 :1-41.
- PONCE, C.; TROCHEZ, H. & ZELEDON, R., 1974. Observaciones sobre enfermedad de Chagas y Tripanosomiasis rangeli en tres ranchos del Departamento Francisco Morazán, Honduras, *Rev. Biol. Trop.*, 22 :289-303.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20 :191-208.
- TOBIE, E.J., 1968. Fate of some culture flagellates in the haemocoel of *Rhodnius prolixus*, *J. Parasitol.*, 5 :1040-1046.
- ZELEDON, R.; ALVARENGA, N.J. & SCHOSINSKY, K., 1977. Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Inter. Symp. Chagas' Disease, New York, PAHO Scientific Publication n.º 347 :59-70.