

ESTUDO DE UMA CEPA PERUANA DE *TRYPANOSOMA RANGELI* I — VERIFICAÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL DE GLÂNDULAS SALIVARES EM *RHODNIUS ECUADORIENSIS*

César A. CUBA CUBA (1)

RESUMO

O Autor verifica a infecção natural de glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León 1958, por *Trypanosoma rangeli* através de experiências de transmissão por picada a camundongos albinos e por dissecação dos triatomíneos pesquisados. São feitas algumas considerações sobre a morfologia do flagelado nas glândulas salivares estudadas assim como o achado de tripomastigotas metacíclicos que sugerem divisão.

INTRODUÇÃO

A infecção natural por *Trypanosoma rangeli* em glândulas salivares de triatomíneos tem sido relatada por PIFANO & MAYER²¹ em *Rhodnius prolixus* da Venezuela, por GROOT¹³ em *R. prolixus* da Colômbia, por ZELEDÓN²⁶ em *R. prolixus* de El Salvador, pelo Gorgas Memorial Laboratory (1966) e ZELEDÓN²⁷ em *R. pallescens* do Panamá, por MARINKELLE²⁰ em *Triatoma dimidiata capitata* e por D'ALESSANDRO⁹ em *Rhodnius brethesi*, ambos da Colômbia.

No Perú, HERRER & WYGODZINSKI¹⁵ assinalam pela primeira vez o encontro de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León 1958, naturalmente infectado pelo *T. rangeli* e posteriormente HERRER¹⁶ descreve aspectos evolutivos de amastigotas no interior das células de glândulas salivares da espécie de triatomíneo mencionada, experimentalmente infectada.

CUBA & col.^{3,4}, referem o achado no Departamento de Cajamarca, Província de Contumazá, Perú, de 9 *R. ecuadoriensis* naturalmente infectados por tripanosomas semelhantes ao *T. rangeli*, entre 128 exemplares capturados (7%); entre os insetos parasitados, 8 apresentavam infecção intestinal (6,2%)

e 4 invasão da hemolinfa (3,1%). Os Autores caracterizaram essa cepa do parasita através da descrição das formas do tracto digestivo e hemolinfa, demonstração da presença de tripomastigotas metacíclicos na hemolinfa e obtenção de tripomastigotas sanguíneos com típica morfologia e biometria de *T. rangeli*.

HERRER¹⁷ verificou, em observações efetuadas em 1964 e através de inoculações de uma cepa peruana de *T. rangeli* na cavidade celomática de *R. ecuadoriensis*, que 14 entre 21 triatomíneos (67%) conseguiram transmitir o parasita por picada. Entretanto dados que demonstrem que a espécie peruana *R. ecuadoriensis*, apresenta-se naturalmente infectada por uma cepa de *T. rangeli* que completa o ciclo no inseto, o qual é capaz, por sua vez, de transmitir o flagelado por picada, não se encontram registrados na literatura. Foi com essa finalidade que realizamos o presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Em janeiro de 1972 foram coletados 45 exemplares de *R. ecuadoriensis* presentes em domicílios do Caserio de La Cienega, Dis-

(1) Trabalho realizado no Centro de Pesquisas "René Rachou", Caixa Postal 1743, 30.000 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

trito de Cascas, Província de Contumazá, Cajamarca, Perú, localidade situada a 1.080 metros sobre o nível do mar, na vertente ocidental dos Andes peruanos.

Os exemplares coletados eram constituídos por ninfas de 3.º, 4.º e 5.º estádios assim como adultos machos e fêmeas; foram trazidos ao Brasil e conservados no insetário do Laboratório de Epidemiologia do Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte, sendo mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70-75%. Antes do início do presente trabalho os triatomíneos foram alimentados em pombo.

Foram usados camundongos albinos, de ambos os sexos, pesando 13-15 gramas provenientes do Biotério do referido Centro de Pesquisas. Esfregaços e gotas espessas de sangue, preparações de fezes, hemolinfa e conteúdo de glândulas salivares de triatomíneos foram coradas pelo Giemsa comum assim como após hidrólise ácida (IKITAWA & OCURA¹⁹). Desenhos em câmara clara de microscópio Wild M 11 foram realizados.

Para a verificação da presença de parasitas em animais picados pelos triatomíneos as seguintes técnicas foram usadas:

Exame de sangue a fresco: Gotas de sangue colhidas da cauda dos camundongos eram examinadas entre lâmina e lamínula com objetiva 40 x e ocular 10 x; para a contagem dos tripomastigotas era empregada a técnica descrita por BRENER¹, procedendo-se ao exame de 50 campos microscópicos em preparações contendo 5 mm³ de sangue.

Xenodiagnóstico: Os animais eram anestesiados com tionembutal, sendo usadas, para cada exame, três ninfas de 3.º e 4.º estádios. Os insetos eram mantidos no insetário nas condições já descritas, até o exame.

Hemocultura: A técnica utilizada foi a descrita por BRENER & CHIARI² sendo o sangue de cada animal sacrificado semeado em dois tubos com ágar-sangue (N.N.N.), os quais eram mantidos a 28°C e examinados aos 10 e 20 dias após a semeadura.

Verificação da infecção de glândulas salivares:

Através de transmissão por picada.

Vinte exemplares de *R. ecuadoriensis* foram separados e colocados para alimentar individualmente em camundongos albinos previamente anestesiados com tionembutal colocados no interior de "beakers" de 250 ml com base forrada de papel filtro. As experiências eram realizadas à vista do observador e aqueles insetos que evidentemente picavam o animal eram retirados e guardados em caixinhas separadamente; no caso em que a picada do inseto não ficava claramente evidenciada, a experiência era repetida. A cada inseto foram oferecidas três oportunidades para transmissão por picada.

Os camundongos eram examinados, por exame de sangue a fresco após 24 a 48 horas, prolongando-se o controle da parasitemia por 25 a 30 dias. Foram realizados xenodiagnósticos e hemoculturas de todos os animais picados e que apresentavam exames de sangue a fresco negativos.

Por dissecação das glândulas salivares

Fez-se de acordo com a técnica descrita por GROOT¹⁴. Retiradas as glândulas eram as mesmas lavadas por 2 a 3 vezes em solução fisiológica sendo então feitos esfregaços de seus conteúdos.

Verificação de infecções intestinais e hemolinfáticas

Gotas de hemolinfa eram obtidas por punção efetuada entre a 1.ª e 2.ª coxas dos insetos; em algumas oportunidades se seccionava uma pata para a obtenção de amostras de hemolinfa de acordo com a técnica de D'ALESSANDRO⁶. Posteriormente os insetos eram cuidadosamente dissecados isolando-se o intestino médio (estômago e duodeno) e intestino posterior (ampola retal), evitando-se contaminar a hemolinfa com o conteúdo do tubo digestivo.

RESULTADOS

Observações sobre a infecção natural de *R. ecuadoriensis*.

Verificação da infecção das glândulas salivares

Transmissão por picada: Como pode ser visto na Tabela I, 5 entre 20 exemplares de

R. ecuadoriensis transmitiram *T. rangeli* a camundongos albinos por picada, após três experiências consecutivas. Cerca de 24 a 48 horas após serem picados os camundongos apresentavam tripomastigotas no sangue, os quais persistiam aproximadamente por 30 dias nos animais. A parasitemia observada caracterizou-se por ser de baixa intensidade (5 a 7 parasitas por 5 mm³ de sangue).

TABELA I

Infecção de glândulas salivares de *R. ecuadoriensis*, coletados em habitações humanas da localidade de La Cienega, Província de Contumazá, Cajamarca, Perú, 1972, naturalmente infectados por *T. rangeli*, verificada pela transmissão a camundongos através de picadas sucessivas

N.º do Triatomíneo	Resultado das picadas		
	1. ^a picada	2. ^a picada	3. ^a picada
1	—	—	m
2	—	+	...
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	m
7	—	—	—
8	—	—	+
9	—	+	m
10	—	—	—
11	—	—	—
12	—	—	—
13	—	—	m
14	+
15	—	—	—
16	—	—	—
17	—	+	...
18	—	—	—
19	—	—	—
20	—	—	—
Total de triatomíneos usados	20	17	12
Triatomíneos com picada infectante	1	3	1

m = morto no decurso da experiência

Hemoculturas praticadas aos 18, 30 e 50 dias após o início da experiência foram po-

sitivas, sendo observada a presença de grandes massas de amastigotas. Xenodiagnósticos realizados na mesma época resultaram positivos, com a presença do parasita no tubo digestivo dos insetos. Em nenhum dos triatomíneos empregados foram encontrados flagelados na hemolinfa.

Dissecção dos triatomíneos: Dos 5 triatomíneos que transmitiram *T. rangeli* por picada, 4 puderam ser dissecados no final das experiências. Todos eles apresentavam a parede externa das glândulas salivares revestidas de uma grande quantidade de flagelados. Ao serem rompidas observava-se que o conteúdo liberado estava constituído por um grande número de tripomastigotas metacíclicos. Foi negativo o exame das glândulas salivares dos 12 triatomíneos restantes que não transmitiram pela picada.

Verificação das infecções intestinais e hemolinfáticas

A Tabela II mostra os resultados encontrados após dissecção de 16 *R. ecuadoriensis*. Em 8 exemplares foi demonstrada a presença de infecção pelo flagelado. Não foi possível verificar invasão hemolinfática em 4 triatomíneos, embora apresentassem intenso parasitismo intestinal.

Aspectos morfológicos de T. rangeli no vector

As Pranchas I e II mostram os desenhos das formas mais freqüentes do flagelado presentes na hemolinfa e glândulas salivares de triatomíneos naturalmente infectados, destacando-se, entretanto, a presença, na hemolinfa, de tripomastigotas metacíclicos com morfologia bastante similar àqueles que são encontrados nas glândulas salivares (Prancha I, Figs. 12-21).

Em esfregaços de glândulas salivares encontram-se epimastigotas com formas irregulares, alargadas e arredondadas, providas de flagelo que contorna o parasita (Prancha II, Figs. 4-9) e tripomastigotas metacíclicos em grande número. Um achado interessante foi o de tripomastigotas metacíclicos que su-

TABELA II

Resultados da dissecação dos 16 *R. ecuadoriensis*, coletados em habitações humanas da localidade de La Cienega, Província de Contumazá, Cajamarca, Perú, 1972, sobreviventes das experiências da Tabela anterior e localização verificada para os flagelados (*T. rangeli*).

N.º Triatomíneo	Estádio evolutivo e sexo	Estômago	Duodeno	Intestino posterior	Hemolinfa	Glândulas salivares
2	N IV	—	—	+	+	+
3	N IV	—	—	—	—	—
4	N IV	—	+	+	—	—
5	N III	—	—	—	—	—
7	N V	—	+	+	—	—
8	A F	+	+	+	+	+
10	N V	—	—	—	—	—
11	A M	—	—	—	—	—
12	N IV	+	+	+	—	—
14	N V	+	+	—	+	+
15	N V	—	—	—	—	—
16	N IV	—	—	—	—	—
17	N V	+	—	—	+	+
18	N IV	+	+	+	—	—
19	N IV	—	—	—	—	—
20	NV V	—	—	—	—	—

A = adulto
M = macho

N = ninfa
F = fêmea

gerem formas em divisão (Prancha II, Figs. 23-37). A impressão é de que, em todas as glândulas observadas, as formas descritas se encontrariam no citoplasma das células secretoras glandulares ao passo que no lúmen, aparentemente, a quase totalidade dos flagelados está constituída por tripomastigotas metacíclicos.

DISCUSSÃO

Embora HERRER & WYGODZINSKI¹⁵ tenham assinalado, no Perú, a presença de *T. rangeli* em exemplares de *R. ecuadoriensis*, só recentemente foram obtidas informações sobre a prevalência de infecções naturais do flagelado no tracto intestinal e hemolinfa de triatomíneos dessa espécie coletados em localidades da Província de Contumazá, Cajamarca (CUBA & col.⁴). Não tinham sido, entretanto, até agora estudadas em detalhe, as características da infecção do *R. ecuadoriensis* nas glândulas salivares.

HOARE¹⁸, referindo-se à adaptação mútua entre parasita e hospedeiro invertebrado no ciclo vital do *T. rangeli* afirma que apesar de que o ciclo extraintestinal é um fenômeno inconstante, o êxito do seu estabelecimento depende das diferentes respostas à infecção observadas em diferentes espécies e cepas geográficas de triatomíneos, assim como à variação na capacidade das diferentes cepas do parasita de desenvolver-se na hemocele. De fato, considerando-se os trabalhos efetuados por GROOT¹³, D'ALESSANDRO⁵, GORGAS MEMORIAL LABORATORY^{10, 11}, D'ALESSANDRO & MANDEL⁷ e D'ALESSANDRO & col.⁹, verifica-se que foram assinaladas diferenças de suscetibilidade na infecção natural de hemolinfa e glândulas salivares de *R. prolixus* e *R. pallenscens*. Justifica-se pois, que tenhamos tentado e logrado demonstrar que a espécie peruana, *R. ecuadoriensis*, apresenta-se naturalmente infectada por uma cepa de *T. rangeli* que completa o ciclo no inseto, o qual é capaz, por sua vez, de transmitir o flagelado por picada.

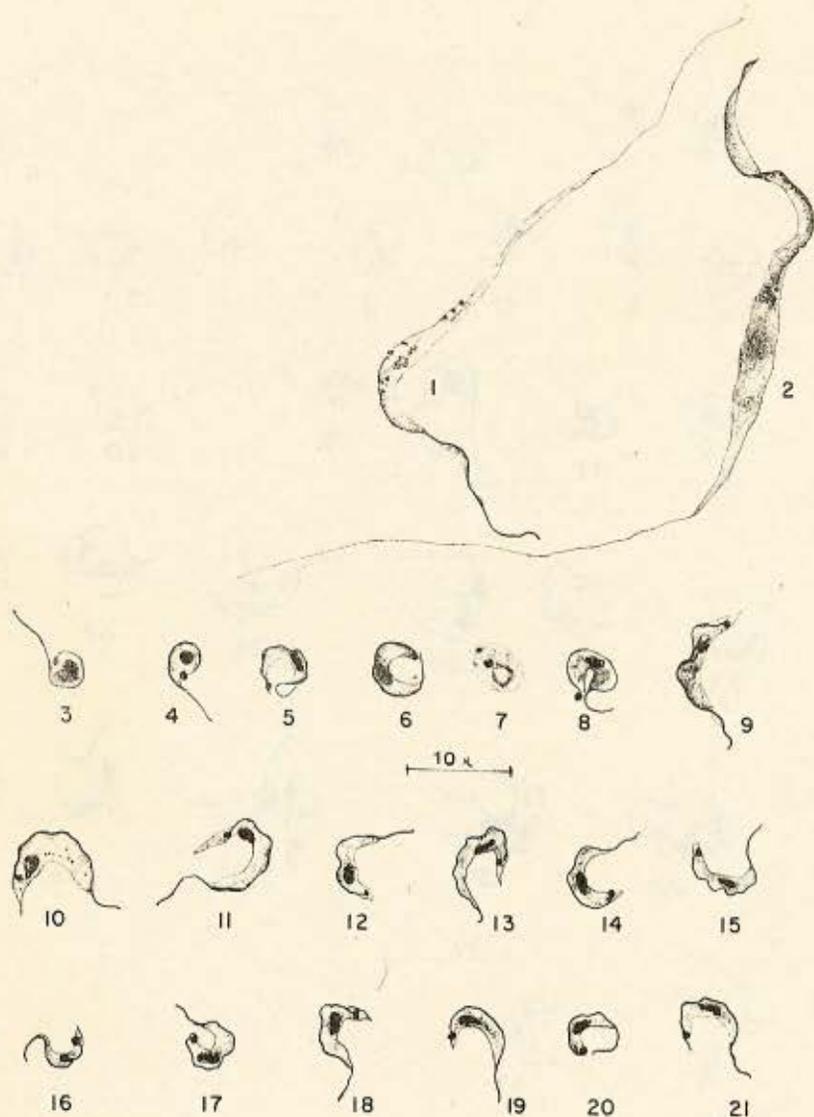


Fig. 1 — Conteúdo de glândulas salivares de *R. ecuadoriensis* naturalmente infectado com *T. rangeli*, mostrando um tripomastigota metacíclico em divisão. 1500 x

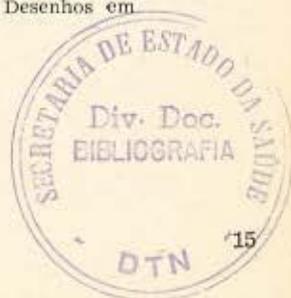
A caracterização morfológica do parasita por nós estudado e a sua distribuição no inseto vector demonstram que a cepa do flagelado encontrada em *R. ecuadoriensis* não diferiu, basicamente, de outras cepas estudadas em *R. prolixus* (PIFANO & col.²¹; GROOT¹³; ZELEDÓN²⁶; D'ALESSANDRO⁵; D'ALESSANDRO & MANDEL⁷) e em *R. pallenscens* pelos pesquisadores do Gorgas Memorial Laboratory¹⁰. Um aspecto importante da infecção em *R. ecuadoriensis* que constatamos foi o encontro de tripomastigotas metacíclicos na hemolinfa de exemplares naturalmente infectados, fato assinalado por TOBIE²⁴ em infecções experimentais e por CUBA & col.⁴ em insetos coletados na natureza. Além disso, confirmamos as observações de HERRER²⁷ e Gorgas Memorial Laboratory¹⁰ que, respectivamente, no *R. eua-*

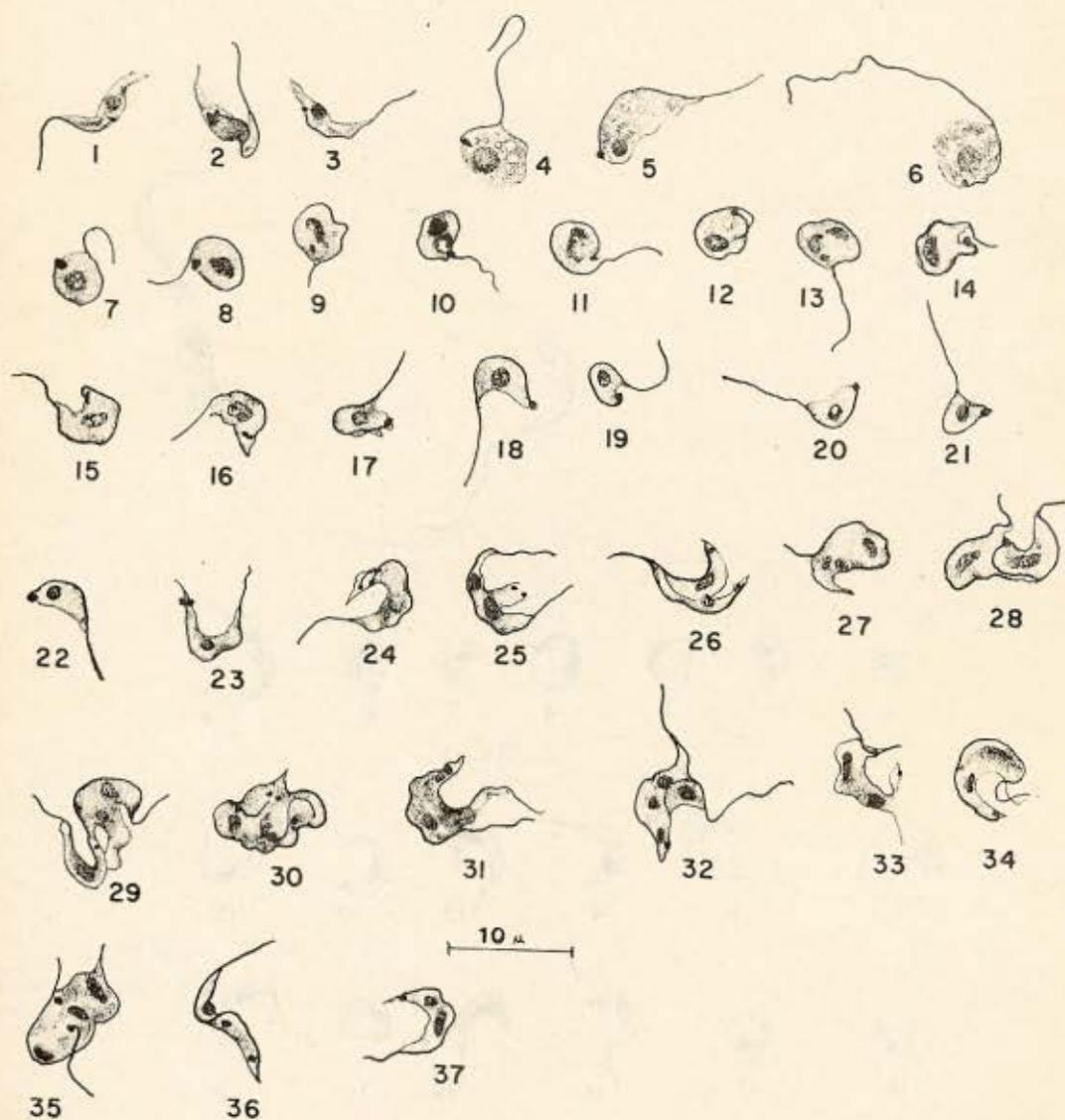
doriensis infectado por inoculação intracelômica e em *R. pallenscens* do Panamá naturalmente infectados, assinalaram massas de epimastigotas em ativa multiplicação aderidas à parede externa das glândulas salivares. Consideram, os últimos Autores, ser esse fenômeno uma característica importante das cepas panamenhas de *T. rangeli*. D'ALESSANDRO & MANDEL⁷ afirmam nunca haver observado esse fato em *R. prolixus* da Colômbia com infecção glandular natural. Esses achados poderiam, aparentemente, estar relacionados com o mecanismo de invasão das glândulas salivares já que segundo WATKINS²⁵, o *T. rangeli* produziria um enzima que permitiria remover alguma substância da membrana basal das glândulas; a quantidade necessária de enzima para propiciar a penetração do parasita seria alcançada através das grandes massas de parasitas aderidos.

A presença de tripomastigotas metacíclicos em provável divisão binária nas glândulas salivares de triatomíneos foi relatada por D'ALESSANDRO⁸ em *R. neglectus* e *T. protracta* experimentalmente infectados com uma cepa Colombiana de *T. rangeli*. Constitui a nossa observação em *R. ecuadoriensis* naturalmente infectados um fato aparentemente não assinalado. GREWAL¹² encontrou tripomastigotas sanguíneos em divisão binária em esfregaços de sangue de camundongos infectados por inoculação de conteúdo de glândulas salivares de *R. prolixus* experimentalmente infectados. TOBIE²³ discutiu a possibilidade de que tripomastigotas metacíclicos, procedentes de material de cultura, quando injetados no vertebrado sejam detectados durante os primeiros dias de infecção apresentando evidência de divisão. A mesma TOBIE²⁴, em observações realizadas na hemolinfa de *R. prolixus* infectado por via hemocelômica, já havia comprovado a existência de tripomastigotas metacíclicos com duplo cinetoplasto, sugerindo divisão. Nas nossas observações, entretanto, nunca fomos capazes de verificar a presença dessas formas na hemolinfa de insetos natural ou experimentalmente infectados.



Prancha I — Infecção natural de *R. ecuadoriensis* por *T. rangeli*, esfregado de hemolinfa. Figs. 1-2: Epimastigotas muito longos. Figs. 3-8: Formas de transição para tripomastigotas metacíclicos. Figs. 9-21: Tripomastigotas metacíclicos com grande variação de tamanho. Coloração pelo Giemsa. Desenhos em câmara-clara.





Prancha II — Infecção natural de *R. ecuadoriensis* por *T. rangeli*. Esfregação de conteúdo de glândulas salivares. Figs. 1-3: Epimastigotas curtos. Figs. 4-6: formas arredondadas flageladas. Figs. 7-22: Diversas fases da formação de tripomastigotas metacíclicos. Figs. 23-37: formas de tripomastigotas metacíclicos que sugerem divisão. Desenhos em câmara-clara.

S U M M A R Y

Study of a Peruvian strain of Trypanosoma rangeli. I — Verification of natural infection in salivary glands of Rhodnius ecuadoriensis

The natural infection of *Rhodnius ecuadoriensis* salivary glands by *Trypanosoma rangeli*, in Peru, was detected by transmission through the bite and dissection of infected *Triatomine* bugs. The parasite stages of development in the haemolymph and salivary glands have been studied; some aspects found in the salivary glands strongly suggest division of metacyclic trypomastigotes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da Terapêutica Experimental da Doença de Chagas*. Tese. Belo Horizonte, Univ. Minas Gerais, 80 pp., 1961.
2. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J. Parasitol.* 51:922-926, 1965.
3. CUBA, C.; MORALES, N.; FERNANDEZ, E. & FERNANDEZ, W. — Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* naturalmente infectado por tripanosomas semejantes a *Trypanosoma rangeli* en Cascas, Contumazá, Cajamarca. *Libro de Resúmenes del III Congreso Peruano de Microbiol. y Parasitol.*, Trujillo, Perú, 1970.
4. CUBA, C.; MORALES, N.; FERNANDEZ, E. & FERNANDEZ, W. — Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León 1958 infectado naturalmente por tripanosomas semejantes a *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en caseríos del distrito de Cascas, Contumazá, Dpto. de Cajamarca, Perú. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:191-202, 1972.
5. D'ALESSANDRO, A. — The life cycle of *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs as it occurs in nature. *Bull. Tulane Univ. Med. Fac.* 23:21, 1963.
6. D'ALESSANDRO, A. — Technique of hemolymph examination to detect *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs. *Proc. VII Intern. Congr. Trop. Med. Malaria*, Rio de Janeiro, 1963, 2:247, 1964.
7. D'ALESSANDRO, A. & MANDEL, S. — Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J. Parasitol.* 55:846-852, 1969.
8. D'ALESSANDRO, A. — New experimental vectors of colombian *Trypanosoma rangeli*. *J. Med. Ent.* 9:187-195, 1972.
9. D'ALESSANDRO, A.; BARRETO, P. & C. A. DUARTE, R. — Distribution of Triatominae-Transmitted Trypanosomiasis in Colombia and new records of the bugs and infections. *J. Med. Ent.* 8:159-172, 1971.
10. GORGAS MEMORIAL LABORATORY — *Annual Report of the Fiscal Year 1965*. U.S. Government Printing Office, Washington, 1966.
11. GORGAS MEMORIAL LABORATORY — *Annual Report of the Fiscal Year 1970*. U.S. Government Printing Office, Washington, 1971.
12. GREWAL, M. S. — *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in its vertebrate and invertebrate hosts. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 50:301-302, 1956.
13. GROOT, H. — Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia South America. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 1:585-592, 1952.
14. GROOT, H. — Estudios sobre los trypanosomas humanos clasificados como *T. rangeli* con especial referencia a su evolución en *Rhodnius prolixus* y a su comparación con *T. ariarii*. *An. Soc. Biol.* (Bogotá) 6:109-126, 1954.
15. HERRER, A. & WYGODZINSKI, P. — Presencia del *Trypanosoma rangeli* en el Perú. *Libro de Resúmenes de Trabajos del I Congr. National de Microbiol. y Parasitol.*, Arequipa, Perú, pp. 60, 1964.
16. HERRER, A. — Reproducción de un *Trypanosoma* tipo *rangeli* a nivel de la glándula salivar del *Rhodnius ecuadoriensis*. *Arch. Peruanos Pat. Clin.* 18:251-254, 1964.
17. HERRER, A. — Trypanosomiasis producida por el *Trypanosoma rangeli* en el Perú. *Libro de Conferencias y Mesas Redondas III Congr. Peruano de Microbiol. y Parasitol.*, Trujillo, Perú, pp. 31-39, 1971.
18. HOARE, C. A. — Morphological and Taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes: XI. The systematic position of *Trypanosoma rangeli*. In *Medicina Tropical*, ANSELMI, A. (Ed.) México, Fournier S.A., pp. 277-289, 1968.

CUBA, C. A. C. — Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. I — Verificação da infecção natural de glândulas salivares em *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16:10-18, 1974.

19. IKITAWA, O. & OGURA, Y. — The Feüigen reaction after hydrolysis at room temperature. *Stain Tech.* 29:13-15, 1954.
20. MARINKELLE, C. J. — *Triatoma dimidiata capitata* a natural vector of *Trypanosoma rangeli* in Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 15:203-205, 1968.
21. PIFANO, C. F.; MAYER, M.; ROMER, M.; DOMINGUEZ, E.; MEDINA, R. & BENAÏM, PINTO, E. — Estado actual de las investigaciones en Venezuela sobre una nueva trypanosomiasis humana de la región neotrópica producida por el *Trypanosoma rangeli*. *Arch. Venezol. Patol. Trop. Parasitol. Méd.* 1:135-152, 1949.
22. PIFANO, F. & MAYER, M. — Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* en el jugo de la trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Arch. Venez. Patol. Trop. Parasit. Méd.* 1:153-158, 1949.
23. TOBIE, E. J. — Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.* 11:1-9, 1961.
24. TOBIE, E. J. — Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebrate Path.* 15:118-125, 1970.
25. WATKINS, R. — Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebrate Path.* 17:59-66, 1971.
26. ZELEDON, R. — Hallazgo de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli* Tejera 1919, en glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, salvadoreños. *Rev. Biol. Trop.* 4:1-8, 1956.
27. ZELEDON, R. — *Trypanosoma rangeli* en glândulas salivares de *Rhodnius pallescens* de Panamá. *Rev. Biol. Trop.* 13:157-159, 1965.

Recebido para publicação em 10/5/1973.