

DESENVOLVIMENTO DE ESPÉCIE DO GÊNERO *LEISHMANIA*
EM FLEBÓTOMOS BRASILEIROS DO GÊNERO
LUTZOMYIA FRANÇA, 1924

IV — Ciclo vital de *L. donovani* em *L. longipalpis* e *L. renei*

Marcello de Vasconcellos COELHO, Alberto Rocha FALCÃO e Alda Lima FALCÃO

RESUMO

Infecção experimental de *L. longipalpis* e *L. renei* por *L. donovani* foi obtida, quando exemplares destas espécies foram induzidos a sugar hamsters sírios (*Cricetus auratus*) infetados com amostra do flagelado isolada em Minas Gerais, Brasil.

Nas infecções de *L. longipalpis* as leptomonas apresentavam grande tendência a se localizar nos segmentos anteriores do tubo digestivo. Já em *L. renei*, as formas flageladas se localizavam de preferência no estômago e no intestino posterior, o que não impediu que, em pequena proporção dos insetos, as infecções fossem indistinguíveis daquelas de *L. longipalpis*. Desta forma, *L. renei* pode ser considerado como transmissor potencial de *L. donovani*.

INTRODUÇÃO

A infecção de *L. longipalpis* por *L. donovani* assinalada por FERREIRA & col.²⁰ e por CHAGAS⁶, foi minuciosamente estudada por DEANE & DEANE^{15, 16, 17, 18, 19}, tendo estes Autores podido concluir ser *L. longipalpis* o mais importante e, possivelmente, exclusivo transmissor do calazar nos focos estudados, no Nordeste do País. Posteriormente, SHERLOCK & SHERLOCK²⁹, repetiram experiências de DEANE & DEANE, assinalando ainda vários aspectos da morfologia e do ciclo vital de *L. donovani* na mesma espécie vectora. COELHO¹¹ verificou a infecção experimental de *L. renei* e de *L. longipalpis* de Minas Gerais por uma amostra do protozoário, isolada no Vale do Rio Dôce, no mesmo Estado. No presente trabalho são apresentados dados sobre o desenvolvimento de *L. donovani* nas duas espécies citadas, *L. renei* e *L. longipalpis*.

MATERIAL E MÉTODOS

L. donovani — Foi utilizada apenas uma amostra, n.º 8, isolada de um caso humano de calazar no Município de Itanhomi, Minas Gerais, em 9/6/1961. Esta amostra vem sendo mantida desde aquela data, tanto em culturas (meio N.N.N. com repiques cada 10 dias) como em hamsters sírios (*Cricetus auratus*), por subinoculações bi-mensais.

Flebótomos — Os exemplares de *L. longipalpis* e *L. renei* utilizados foram coletados em criadouro natural de flebótomos, na gruta da Lapinha, Município de Lagoa Santa, Minas Gerais, fora da zona endêmica de calazar.

As técnicas de captura, transporte, manutenção em laboratório e exame dos flebótomos foram descritas no primeiro trabalho desta série (COELHO & col.¹³).

RESULTADOS

A) *Características do desenvolvimento*

As várias observações sobre a evolução de *L. donovani* em *L. longipalpis* e *L. renei* estão apresentadas nas Tabelas I e II. Em *L. longipalpis*, nos três primeiros dias após a alimentação infetante obtiveram-se sempre resultados negativos ao exame microscópico, apesar de terem se mostrado positivas culturas do conteúdo estomacal de alguns flebótomos utilizados para este fim. Em diversas experiências, o exame subsequente de flebótomos do mesmo lote mostrou vários exemplares infetados a partir do 4.º dia, indicando que o aumento numérico de leptomonas se faz lentamente.

A partir do 4.º dia, à medida que o sangue era digerido e reabsorvida a membrana peritrófica, as leptomonas proliferavam ativamente e se dirigiam nitidamente para a parte anterior do tubo digestivo, formando verdadeiro êmbolo ao nível da válvula esofágiana que, contudo, não obstruía inteiramente o órgão, permitindo repetidos repastos sanguíneos. Em grande percentagem dos flebótomos examinados após o 6.º dia a infecção, sempre intensa, se restringia à parte anterior da cárdia, ao proventrículo, à válvula esofágiana a faringe, atingindo em alguns exemplares, a cavidade bucal e mesmo a probóscida. Alguns exemplares apresentavam leptomonas em tôdas as porções do tracto digestivo, embora sua concentração fôsse maior ao nível da cárdia.

TABELA I

Evolução de *L. donovani*, amostra n.º 8, em *L. longipalpis*

Dias após repasto infetante	Exemplares examinados	Infetados		Resultados
		N.º	%	
2 — 3	20	0	0,0	Não foram observadas formas parasitárias ao exame microscópico, tanto nos diversos segmentos do tubo digestivo, quanto no conteúdo estomacal. A cultura do conteúdo estomacal mostrou-se positiva, em vários casos.
4 — 5	21	6	28,6	Leptomonas localizadas na cárdia e no estômago. Abundante número de formas no estômago, no sangue incompletamente digerido. Leptomonas, na cárdia, com flagelo colado às paredes do órgão.
6 — 25	226	133	58,8	Em 123 exemplares a infecção se limitou ao cárdia anterior, proventrículo, e faringe, sendo raras as formas encontradas na parte posterior do estômago. As leptomonas se agrupavam, em grande número, no proventrículo e cárdia, formando um aparente êmbolo. Seus flagelos se colavam ao epitélio do órgão, em grande número de exemplares. Formas muito delgadas. Em 3 flebótomos o divertículo esofágiano apresentava numerosas leptomonas. Em 12 exemplares foram observadas leptomonas na cavidade bucal e em 5 nas peças bucais. Nos dez exemplares restantes, a infecção se distribuiu por todo o tubo digestivo, da faringe à ampola retal, embora fôsse evidente a maior concentração de formas na cárdia e proventrículo. Não se observou diferenças significativas entre 6.º e 25.º dia, sendo visíveis, no entanto, diferenças individuais, quer quanto à quantidade de formas, quer quanto à localização. Em três exemplares foram observadas leptomonas na probóscida.

TABELA II

Evolução de *L. donovani*, amostra n.º 8, em *L. renei*

Dias após repasto infetante	Exemplares examinados	Infetados		Resultados
		N.º	%	
2 — 3	8	5	62,5	Leptomonas, em número de uma dezena ou, no máximo, de uma centena, localizadas no estômago, no sangue em digestão. Em 2 dos exemplares, a infecção atingia ainda o intestino posterior.
4 — 5	6	3	50,0	Infecção restrita ao estômago, com formas no sangue em digestão. Abundante número de formas.
6 — 23	32	17	53,1	Em 13 exemplares a infecção se restringia à presença de algumas dezenas de leptomonas, localizadas no estômago e no intestino posterior, não atingindo a cárdia anterior, o proventriculo e as partes cefálicas do tubo digestivo. Em 4 exemplares, contudo, a infecção era nitidamente anterior, com abundante número de formas no proventriculo, com aspecto semelhante às infecções observadas em <i>L. longipalpis</i> . Não foram vistas leptomonas localizadas na cavidade bucal e na probóscida.

Em *L. renei*, leptomonas puderam ser observadas em pequeno número já no 3.º dia após o repasto infetante. Entre o 4.º e 5.º dias, sua proliferação era intensa no estômago e, nos dias subseqüentes, na maioria dos flebótomos examinados, o número de leptomonas se reduzia a algumas dezenas, ficando a infecção localizada no estômago e no intestino posterior. Em raros exemplares, contudo, numerosas leptomonas se localizavam no proventriculo, não atingindo, no entanto, a faringe e a cavidade bucal.

B) Morfologia das leptomonas

Apesar do polimorfismo característico do desenvolvimento das várias espécies do gênero *Leishmania* no flebótomo, observou-se nítida preponderância das formas típicas de leptomonas, fusiformes, curtas ou longas, com 16 a 22 μ de comprimento por 2 a 3 μ de largura. O percentual de formas em divisão se manteve estável após o 4.º dia, quando foram observados microscópi-

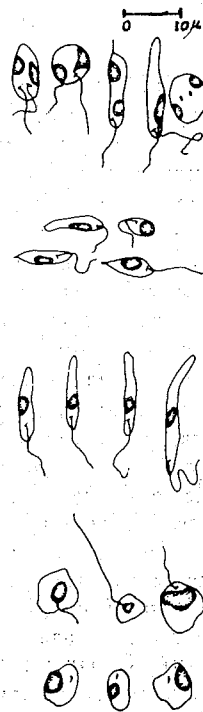


Fig. 1 — Desenho em câmara clara de formas evolutivas de *L. donovani* em *L. longipalpis*.

TABELA III

Percentuais de freqüência das várias formas de leptomonas de *L. donovani* amostra n.º 8, observadas no tubo digestivo de *L. longipalpis*. Variações no curso da infecção. Contagem de 100 formas por exemplar

Dias após repasto infetante	N.º de flebótomos	Formas de leptomonas (%)				
		Divisão	Fusiformes		Globosas	
			Curtas	Longas	Flageladas	Aflageladas
4 — 5	2	10,0	41,5	42,5	4,5	1,5
6 — 25	52	8,6	44,1	38,1	7,0	2,1

camente os primeiros exemplares infetados (Tabela III e Fig. 1). Nas infecções da faringe e da cavidade bucal eram observadas, quase exclusivamente, formas curtas ($\pm 12 \mu$) com flagelos longos ($\pm 20 \mu$). Na Fig. 1 podem ser observadas as formas mais características encontradas em *L. longipalpis*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A infecção experimental de *L. longipalpis* por *L. donovani*, assinalada por FERREIRA & col.²⁰ e por CHAGAS⁶, foi exaustivamente estudada por DEANE & DEANE^{16, 17}, por DEANE¹⁴ e finalmente por SHERLOCK & SHERLOCK²⁹. Estes Autores, em suas experiências, utilizaram exemplares coletados em focos endêmicos de calazar, infetando-os com amostras locais do parasita. COELHO & FALCÃO¹² assinalaram a infecção experimental de *L. longipalpis*, coletados em uma gruta no Município de Lagoa Santa, Minas Gerais, fora da área endêmica. Fazendo sugar um cão naturalmente parasitado, procedente de zona endêmica do Vale do Rio Doce, obtiveram em 175 exemplares 34% de infecções. O desenvolvimento do flagelado no tubo digestivo do inseto, nessa como nas experiências ora conduzidas foi idêntico ao descrito nas observações originais de DEANE & DEANE¹⁶. As infecções por *L. donovani* se tornaram patentes apenas após o 2.º dia, quando podiam ser observadas al-

gumas raras leptomonas no estômago. Já a partir do 3.º dia, milhares de leptomonas se localizavam no estômago e na cárdia. A partir do 4.º dia e nos dias subsequente, observou-se nítida progressão para a porção anterior da cárdia, para o proventricio, a faringe, a cavidade bucal e a probóscida (Tabela I). Já em *L. renei*, embora os percentuais de infecção fôssem semelhantes aos de *L. longipalpis*, observou-se que, em grande percentagem dos insetos, a infecção era menos intensa e restrita ao estômago e intestino posterior (Tabela II). Apesar disto, em 4 de 17 exemplares que sobreviveram de 12 a 18 dias, foram observadas leptomonas em grande número, na cárdia e no proventriculo, com seus flagelos ligados ao epitélio do órgão, infecções estas indistinguíveis das observadas em *L. longipalpis*. ADLER & THEODOR⁴ observaram infecções semelhantes em *P. papatasi*, alimentadas com culturas de *L. donovani* (*L. chagasi*) provenientes do Brasil, o que representa mais um argumento a favor da falta de especificidade dos flebótomos em suas relações com as leishmânias. Outrossim, um fato que chama a atenção, no que respeita ao desenvolvimento do *L. donovani* nas várias espécies de flebótomos, é a constante progressão das leptomonas para os segmentos anteriores do tubo digestivo do inseto. Neste sentido são as observações dos pesquisadores ingleses na Índia (CHRISTOPHERS & col.^{7, 8}; NAPIER & col.²⁰; SMITH & col.^{30, 31}); dos diversos trabalhos realizados na China

(YOUNG & HERTIG³³; HINDLE²⁸; PATTON & HINDLE²⁸; WO & SUN³²; CHUNG & col.¹⁰; CHUNG⁹); de ADLER & THEODOR^{1, 2, 3, 5} e de PARROT & col.²⁷ na bacia do Mediterrâneo; de HEYNEMAN²² e de HOOGSTRAAL & DIETLEIN²⁴ no Sudão; de HEISCH & col.²¹ e de MINTER & col.²⁵; no Kenia e de DEANE & DEANE^{16, 17}, no Brasil, entre outros. É de se notar que, em todos os trabalhos citados, a evolução se fazia sempre na espécie transmissora local. O que surpreende no caso específico de *L. renei* é o fato de se tratar de espécie desvinculada das áreas endêmicas de calazar e sem aparente ligação com o protozoário.

SUMMARY

Behaviour of Leishmania species in Brazilian sandflies (Lutzomyia França, 1924). IV — Life-cycle of L. donovani in L. longipalpis and L. renei

Experimental infection of *L. longipalpis* and *L. renei* with *L. donovani* was achieved when specimens from those species were induced to feed on Syrian hamsters (*Cricetus auratus*) infected with a strain of the flagellate isolated in Minas Gerais, Brasil.

It was observed that, in the infections of *L. longipalpis*, leptomonas were generally found in the insect's foregut, whereas, in *L. renei*, the flagellate forms were generally located in the midgut and hindgut. However, in a small number of specimens of *L. renei*, the infection was indistinguishable from that of *L. longipalpis*. Hence, *L. renei* can be considered a potential vector of *L. donovani*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, S. & THEODOR, O. — The behaviour of cultures of *Leishmania* sp. in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 21:111-134, 1927.
2. ADLER, S. & THEODOR, O. — Investigations on Mediterranean Kala-Azar. IV — Infection of sandflies with *Leishmania infantum*. Natural parasites of wild sandflies in Catania. Observations on *Trypanosoma pygodyctyli* Catouillard. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108:481-493, 1931.
3. ADLER, S. & THEODOR, O. — Investigations on Mediterranean Kala-Azar. IX — Feeding experiments with *Phlebotomus perniciosus* and other species on animals infected with *Leishmania infantum*. *Proc. Roy. Soc.* 116:516-542, 1934.
4. ADLER, S. & THEODOR, O. — The behaviour of *Leishmania chagasi* in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 33:45-47, 1939.
5. ADLER, S.; THEODOR, O. & WITENBERG, G. — Investigations on Mediterranean Kala-Azar. XI — A Study of Leishmaniasis in Canea (Crete). *Proc. Roy. Soc.* 125:491-516, 1938.
6. CHAGAS, A. W. — Criação de flebotomos e transmissão experimental da Leishmaniose visceral americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35:327-333, 1940.
7. CHRISTOPHERS, S. R.; SHORTT, H. E. & BARRAUD, P. J. — The development of the parasite of Indian Kala-Azar in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti. *Indian J. Med. Res.* 12:123-125, 1924.
8. CHRISTOPHERS, S. R.; SHORTT, H. E. & BARRAUD, P. J. — Development of the parasite of Indian Kala-Azar in the sandfly *Phlebotomus argentipes*. Re-fed flies and further results of the feeding of sandflies on Kala-Azar cases. *Indian J. Med. Res.* 4: 141-145, 1926.
9. CHUNG, H. L. — A résumé of Kala-Azar work in China. *Chin. Med. J. (Peking)* 71: 421-464, 1953.
10. CHUNG, H. L.; FENG, L. C. & FENG, S. L. — Observations concerning the successful transmission of Kala-Azar in North China by the bites of naturally infected *Phlebotomus chinensis*. *Peking Nat. Hist. Bull.* 19:302-326, 1950-1951.
11. COELHO, M. V. — Suscetibilidade de *Phlebotomus longipalpis* e *P. renei* à infecção por *Leishmania braziliensis*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:101-104, 1962.
12. COELHO, M. V. & FALCÃO, A. R. — Aspectos epidemiológicos do calazar em Minas Gerais. *J. Brasil. Med.* 10:259-262, 1966.
13. COELHO, M. V.; FALCÃO, A. R. & FALCÃO, A. L. — Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França 1924. I — Evolução de *L. braziliensis* em flebotomos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:177-191, 1967.

14. DEANE, L. M. — *Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará.* Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956, 162 pp.
15. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco calazar, no Ceará. *Hospital* (Rio) 45:697-702, 1954.
16. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Infecção experimental de *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de Leishmaniose visceral. *Hospital* (Rio) 46:487-489, 1954.
17. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em rapôsa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *Hospital* (Rio) 46:651-653, 1954.
18. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da rapôsa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. *Hospital* (Rio) 48:61-76, 1955.
19. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Observações sobre a transmissão da Leishmaniose visceral no Ceará. *Hospital* (Rio) 48:347-364, 1955.
20. FERREIRA, L. C.; DEANE, L. M. & MANGABEIRA Filho, O. — Infecção de *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania chagasi*. *Hospital* (Rio) 14:2-3, 1938.
21. HEISCH, R. B.; WIJERS, D. J. B. & MINTER, D. M. — *In Pursuit of the Vector of Kala-Azar in Kenya.* *Brit. Med. J.* 26:1456-1458, 1962.
22. HEYNEMAN, D. — Leishmaniasis in Sudan Republic. 12 — Comparison of experimental *Leishmania donovani* infections in *Phlebotomus papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) with natural infections found in man bited *P. orientalis* captured in Kala-Azar endemic region of the Sudan. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 12:725-740, 1963.
23. HINDLE, E. — The development of various strains of *Leishmania* in chinese sandflies. *Proc. Roy. Soc. (Biol.)* 108:366-383, 1931.
24. HOOGSTRAAL, H. & DIETLEIN, D. R. — Leishmaniasis in the Sudan Republic: Recent Results. *Bull. W.H.O.* 31:137-143, 1964.
25. MINTER, D. M.; WIJERS, D. J. B.; HEISCH, R. B. & MANSON-BAHR, P. E. C. — *Phlebotomus martini* a probable vector of Kala-Azar in Kenya. *Brit. Med. J.* 29:835, 1962.
26. NAPIER, L. E.; SMITH, R. O. A.; GUPTA, C. R. das & MUKERJI, S. — The infection of *Phlebotomus argentipes* from dermal leishmanial lesions. *Indian J. Med. Res.* 21:173-177, 1933.
27. PARROT, L.; DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F. — Sur la développement du parasite de la leishmaniose canine viscerale chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. *Bull. Soc. Path. Exot.* 23:724-726, 1930.
28. PATTON, W. S. & HINDLE, E. — The development of chinese *Leishmania* in *Phlebotomus major* var. *chinensis* and *P. sergenti*. *Proc. Roy. Soc. (Biol.)* 101:369-391, 1927.
29. SHERLOCK, I. A. & SHERLOCK, V. A. — Sobre a infecção experimental de *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. *Rev. Brasil. Biol.* 21:409-418, 1961.
30. SMITH, R. O. A.; HALDER, K. C. & AHMED, I. — Further investigations on the transmission of Kala-Azar (Part II). The phenomenon of the "blocked" sandfly. *Indian J. Med. Res.* 28:581-584, 1940.
31. SMITH, R. O. A.; HALDER, K. C. & AHMED, I. — Further investigations on the transmission of Kala-Azar (Part IV). The duration of life and other observations on "blocked" flies. *Indian J. Med. Res.* 29:783-787, 1941.
32. WU, C. C. & SUN, C. — Notes on the study of Kala-Azar transmission (Part III). Experimental infection of chinese sandflies of the erecthaired division fed on Kala-Azar patients and infected chinese hamsters. *Chin. Med. J.* 2:579-591, 1938.
33. YOUNG, C. W. & HERTIG, M. — The development of flagellates in chinese sandflies (*Phlebotomus*) fed on hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 23:611-615, 1926.

Recebido para publicação em 2/12/1966.