

## FASE EXTRA-INTESTINAL DO CICLO EVOLUTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM *TRILATOMA INFESTANS*<sup>1</sup>

DYRCE LACOMBE

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

(Com 30 figuras no texto)

A partir do trabalho de Chagas (1909), o estudo sobre a evolução do *Trypanosoma Cruzi* nos seus transmissores, vem chamando a atenção de inúmeros pesquisadores. Algumas referências do parasito no intestino posterior foram alvo de publicações de Gomes de Faria & Cruz Filho (1927), que citam a existência de um estágio intracelular nas células retais do hospedeiro intermediário, referindo-se à dificuldade de interpretação da posição exata do parasito no conduto digestivo. Dias (1930, 1932), refere o *Trypanosoma Cruzi* nas fezes e nos tubos de Malpighi de *Panstrongylus megistus* e fez uma análise da urina do inseto parasitado, citando a forma alongada e comum dos tripomastigotas metacíclicos no piloro ressaltando, porém, as raras formas de critídias nesta região. Em sua tese (1934), este pesquisador, mencionando o trabalho feito em 1930, cita que as formas descritas em 1927, encontram-se entre as dobras do epitélio do reto, e nunca dentro das células como é referido. As dobras constituiriam sério obstáculo para a interpretação do fato em período passado. Para Chagas, entretanto, o parasito intracelular encontraria na hemolinfa condições mais propícias ao desenvolvimento e sem concorrência com a abundante flora intestinal. Para Dias, porém, o ciclo evolutivo do *T. Cruzi* no inseto transmissor passa-se, somente, no tubo digestivo onde o para-

sito realiza suas diversas fases. Para ele, no estômago do inseto (promesêntero) os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas ou não. No duodeno (= pós-mesêntero) estes vão evoluir e se multiplicar. No reto sofrem a modificação em tripomastigotas metacíclicos, e se acumulam no epitélio da ampola retal (= proctodeo), de onde são eliminados com as fezes ou com a urina. Dias e outros autores confirmaram o ciclo evolutivo do *T. Cruzi*, na luz do conduto intestinal, e ainda Dias (1930) cita a invasão dos parasitos nas ampolas dos tubos de Malpighi, porém, nunca na cavidade geral e nas glândulas salivares. De modo geral, para muitos pesquisadores, o ciclo evolutivo do parasito no inseto, se passa em 3 fases: 1.<sup>a</sup> fase estomacal - onde há formação do tipo leishmanióide (= amastigotas), 2.<sup>a</sup> fase duodenal - onde há o crescimento e multiplicação dos elementos critídiomórficos (= epimastigotas) e 3.<sup>a</sup> fase retal (= tripomastigotas) onde encontramos a formação de tripomastigotas metacíclicos, que aderem ao reto pela extremidade do flagelo. Entretanto, Dias em 1932, injetou na hemocele do *P. megistus*, 0,15 cc da cultura de *Trypanosoma Cruzi* observando que após 24 a 48 h, os parasitos não apresentavam modificações. Com 7 dias, porém, cita diversas critídias e formas de leishmânias em divisão. Acrescenta que a evolução do *T. Cruzi* na cavidade geral do inseto é análoga ao seu desenvolvimento "in vitro". Concluindo, cita que a invasão natural da cavidade geral nunca foi observada. Em 1959, Pereira da

<sup>1</sup> Recebido para publicação a 9 de agosto de 1979. Trabalho apresentado ao Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil.

Silva fez um resumo do ciclo evolutivo e algumas observações no *T. Cruzi*.

Tobie (1961, 1970) trabalhando em *R. prolixus* com *Trypanosoma rangeli*, cita um período de desenvolvimento e multiplicação do parasito no intestino, e depois, sua passagem para a hemocele do inseto. Após alguns dias de desenvolvimento na hemolinfa, o *Trypanosoma rangeli* invade as glândulas salivares.

Em 1962, 1963, Naquira, injetando na cavidade celomática do *Triatoma infestans* formas sanguíneas do *T. Cruzi* em cultura, observou modificações que sugeriram a possibilidade de multiplicação e desenvolvimento do parasito na cavidade celômica do *T. infestans*. Zeledon & Blanco (1965) em trabalho feito com *T. rangeli*, citam que o mecanismo exato de penetração do parasito na parede intestinal não é conhecido. Em 1977, com Alvarenga e no mesmo ano com Schosinsky estudam o *T. Cruzi* na parte final do intestino. Por muitos anos o ciclo evolutivo do *T. rangeli* foi confinado ao aparelho digestivo, como no caso do *T. Cruzi*.

Em 1968, Brack menciona as formas que chamou de esferomastigotas no ciclo do *T. Cruzi* limitando-as, porém ao intestino do inseto. Watkins (1971 a-b) descreve lesões histológicas no *R. prolixus*, causadas pelo parasitismo de *T. rangeli*. Seus trabalhos são bem ilustrados, mostrando alterações histológicas na musculatura, células nervosas, intestino e hipoderme. Enquanto, Brener (1972), observou que após a ingestão de tripomastigotas do sangue, os parasitos se transformam em organismos arredondados com tendência ao pareamento.

Apesar de inúmeras tentativas, não se conseguiu até hoje verificar "in vitro" os estágios do ciclo evolutivo do *T. Cruzi* no tubo digestivo do vetor. Cuba-Cuba (1974, 1975) publicou a infecção natural do *T. rangeli* em *R. prolixus* mostrando sua evolução na cavidade celomática e nas glândulas salivares. Alvarenga & Brener (1977) mostraram que o *T. Cruzi* não necessita de sangue para evoluir no vetor e que o material necessário à sua reprodução e evolução pode ser obtido em substâncias excretadas ou secretadas no tubo digestivo do inseto. Este item vem fortalecer nossas observações atuais, em que o ciclo evolutivo do *T. Cruzi* se passa nos hemócitos do inseto, dentro de vacúolos contendo hormônios de metamorfose, sendo conduzidos mais tarde para o lúmen dos tu-

bos de Malpighi, penetrando de novo no aparelho digestivo do inseto.

A infecção na cavidade celômica dos Triatomíneos pelo *T. Cruzi*, mediante inoculação de formas de cultura, recentemente vem sendo motivo de trabalhos de Ribeiro, Belda Neto & Barretto (1977 a-b). Os autores referem-se às transformações cíclicas do parasito na hemolinfa injetando as formas de cultura na hemocele do inseto.

*Agradecimentos* – Queremos agradecer o estímulo e apoio que sempre recebemos do Prof. Antônio Moreira Couceiro, grande e saudosos cientista, que muito auxiliou inúmeros dos nossos pesquisadores. Aos Profs. Aristides Pacheco Leão, presidente da Academia Brasileira de Ciências; Aloizio Mello Leitão, Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Mauro Pereira Barretto e Rosa Domingues Ribeiro, do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, somos gratos pelo incentivo que recebemos. Aos Srs. Néelson Bernardo, técnico da Fundação Oswaldo Cruz e Newton de Azevedo, fotógrafo, agradecemos o auxílio constante no decorrer do trabalho.

## TÉCNICAS E MÉTODOS UTILIZADOS

Seguindo as inúmeras técnicas mencionadas na descrição de muitos trabalhos, usamos alguns fixadores e corantes histológicos que apresentaram diversos resultados. O líquido de Zenker, se mostrou ótimo para as células da hemolinfa, porém, o mesmo não ocorrendo para os demais tecidos. Com a finalidade de evitar artifícios de técnica, usamos outros fixadores para o presente estudo. Os mais aplicados foram: líquido de Helly, de Carnoy, de Zenker, de Susa, de Bouin (segundo Dubosq-Brasil), de Gilson e de Flemming (com ou sem ácido acético). Aqueles que se mostraram aprovados para o estudo foram os líquidos de Carnoy, de Zenker e de Flemming com ácido acético. As colorações histológicas foram as mais diversas: Giemsa (método clássico), hematoxilina de Delafield, de Ehrlich e de Harris, Cromotop 2R, eosina, galocianina, verde naftol e hematoxilina férrica de Heidenhein (após Fleming). Através de todas estas técnicas, onde eliminamos os possíveis artifícios, conseguimos os resultados abaixo mencionados.

Foram utilizados cerca de 500 exemplares de *Triatoma infestans*, adultos e de ambos os sexos, cedidos pelo Departamento de Entomologia da Fundação Oswaldo Cruz. No laboratório, os divi-

dimos em lotes e os alimentamos em camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma Cruzi*, que nos foi fornecida pelo Dr. Gilberto Freitas, da Fundação Oswaldo Cruz e pelo Dr. Wanderley de Souza, do Instituto de Biofísica da U.F.R.J., e por nós mantida.

Verificamos no decorrer do trabalho, que os melhores fixadores para o estudo, foram os líquidos de Carnoy e o de Flemming com ácido acético, e as colorações mais usadas foram: galocianina com o contraste pelo Cromotrop 2R e a hematoxilina férrica segundo Heidenhein.

A técnica de fixação foi a seguinte: o inseto foi preso por alfinetes entomológicos a uma placa de Petri parafinada. Com muito cuidado para não provocar alterações histológicas, fizemos ligeira pressão sobre a parte posterior do abdômen procurando obter matéria fecal para o exame a fresco. Quando não foi possível, usamos, somente, a técnica histológica. Com diminutos cortes nos conexivos dos exemplares, obtivemos também a hemolinfa, para o exame a fresco. Finalizando com rapidez a manipulação do inseto, cortamos a extremidade dos conexivos e a parte final do aparelho copulador, mergulhando de imediato o inseto no fixador. Os diminutos cortes laterais facilitam a penetração rápida do líquido, impedindo alterações citológicas comuns em histologia. Os cortes histológicos foram feitos ao Micrótopo rotativo Leitz a  $5\mu$  a  $7\mu$  de espessura. A continuidade do método segue a técnica histológica, isto é, desidratação pela série álcool-benzol e inclusão em parafina com látex. As publicações consultadas sobre as técnicas encontram-se principalmente em: Romein (1928), Pantin (1948), Barth (1953, 1958), Lison (1960), Pearse (1960), Thompson (1966).

## RESULTADOS

Após o repasto natural do *Triatoma infestans* em camundongos com alta parasitemia com *Trypanosoma Cruzi*, os tripomastigotas sanguíneos ingeridos pelo inseto durante a alimentação, atravessam a parede do promesêntero em direção à hemocele. Para melhor compreendermos este fenômeno é oportuno lembrar um pouco a histologia do aparelho digestivo (fig. 1).

Lacombe (1957) e Lacombe & Rangel (1977), além de outros autores, citam que o canal alimentar está dividido em 3 regiões:

1ª) Anterior ou estomodeo, de origem ectodérmica e, portanto, com revestimento quitinoso recobrimdo o epitélio da faringe e esôfago que o constitui; tem início na faringe, musculosa e pequena, e termina na válvula cardíaca situada no início do promesêntero.

2ª) Intestino médio ou êntero, formado pelo promesêntero e pelo pós-mesêntero; sendo de origem endodérmica, não tem quitina revestindo suas paredes. O promesêntero é a parte mais volumosa do aparelho, ocupando o maior espaço na cavidade do corpo. Alguns autores o denominam de "proventrículo" ou "ventrículo quilífico". Nesta porção do intestino o sangue vai ser armazenado e depois digerido, o que é facilitado pela dilatação do promesêntero ocasionado pela distensão das dobras do seu epitélio. Este fato, também se observa em outros insetos hematófagos. A ausência de quitina no epitélio desta região facilita a passagem dos tripomastigotas ingeridos para a hemocele do inseto. O desenvolvimento exagerado das dobras epiteliais do promesêntero, mais a perfeita vedação feita pelas células da válvula cardíaca e a contração dos músculos desta região, concorrem para o acentuado fechamento da parte anterior do promesêntero, impedindo a volta do alimento ao esôfago. A parte posterior é hermeticamente fechada por um forte esfíncter muscular existente entre o promesêntero e o pós-mesêntero, e, que pela contração durante os movimentos peristálticos do intestino, impede o regurgitamento do alimento do pós-mesêntero para o promesêntero. O pós-mesêntero é um longo e sinuoso tubo na cavidade do abdômen atingindo de 3 a 5 vezes o comprimento do corpo do inseto. O epitélio é formado por uma camada de células altas com rabdório curto e por uma fina membrana peritoneal. As musculaturas longitudinal e circular são finas, o que torna o êntero uma região muito frágil. As células do pós-mesêntero são mais altas que as do promesêntero e as dobras mais acentuadas. Muitas vezes as altas células do pós-mesêntero chegam a ocupar quase toda a luz do intestino. Em corte histológico é fácil observarmos as células intestinais com a secreção holócrina próxima ao bolo alimentar, e outras vezes, a própria secreção entre o alimento, semelhante a pequenas esferas. Outrossim, observamos no promesêntero e no pós-mesêntero abundantes formações de simbioses observadas por Wigglesworth (1936) em *Rhodnius prolixus*. A parte posterior do pós-mesêntero se

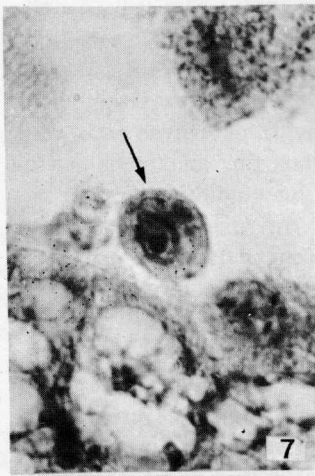
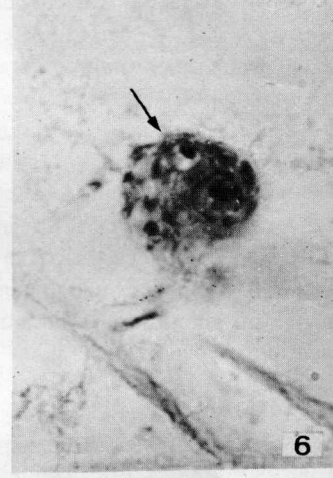
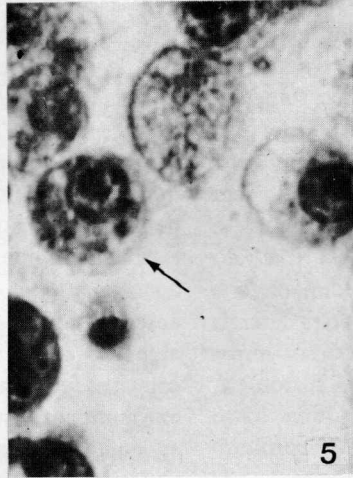
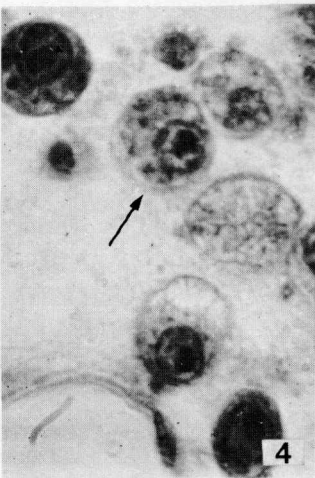
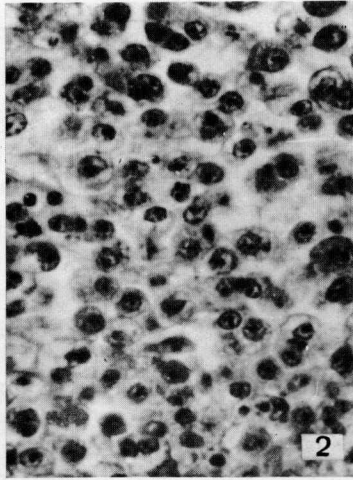
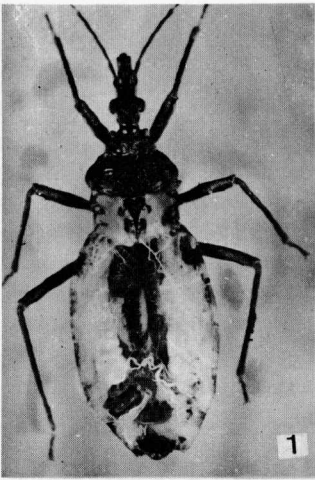


Fig. 1 - Vista geral do aparelho digestivo do *Triatoma infestans*. Fig. 2 - Hemócitos da hemolinfa do *Triatoma infestans*. Fig. 3 - Tipos de hemócitos: pró-leucócitos, leucócitos, oenócitos, hemócito gigante, hemócito com membrana desfeita. Fig. 4 - Hemócitos com parasitos no citoplasma, vendo-se nitidamente núcleo, nucléolo e membrana nuclear. Fig. 5 - Amastigotas de *T. cruzi* nítidos no citoplasma dos hemócitos; notamos alguns parasitos alongados em outro hemócito. Fig. 6 - Vacúolos rodeando os parasitos. Fig. 7 - Outro aspecto dos parasitos dentro do hemócito. Fig. 8 - Hemócito gigante em plena divisão nuclear. Fig. 9 - Outro hemócito após divisão nuclear.

caracteriza externamente, pelas quatro ampolas formadas na base dos quatro tubos de Malpighi.

A 3ª parte do aparelho digestivo é o proctodeo, limitado anteriormente pela válvula pilórica e, posteriormente, pelo esfíncter anal. De modo geral, encontramos nesta região, os 4 tubos de Malpighi (TM), as ampolas, as glândulas retais e o reto. Por sua origem ectodérmica, vai se destacar no ciclo evolutivo do *Trypanosoma Cruzi*, como veremos abaixo. A hipoderme do reto mostra um epitélio sincicial, com muitas dobras. Os núcleos bem destacados, acompanham as dobras do epitélio do reto, tomando-se alongados e bem acentuados. O citoplasma é pobre e transparente. Revestindo todo o epitélio notamos uma fina camada de quitina. Os epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos aderem a estas dobras, permanecendo longo período fixados ao epitélio, saindo com a urina ou com as fezes excretadas. Zeledon *et al.* (1977) mostraram os *Trypanosoma Cruzi* também aderidos ao epitélio da glândula retal.

Retornando ao nosso assunto referente ao trajeto do *Trypanosoma Cruzi* para a hemolinfa, notamos que os parasitos vão se localizar em hemócitos, após 2 a 3 dias do repasto do inseto. A razão e o modo pelo qual os *Trypanosoma Cruzi* atravessam as paredes do promesêntero, para alcançar a hemocele são ainda desconhecidas. Entretanto, Chagas (1909) já admitia o desenvolvimento dos parasitos na hemolinfa, acreditando ser este meio mais favorável ao ciclo evolutivo, sendo o primeiro a prever um ciclo extra-intestinal para o parasito.

Os hemócitos (fig. 2) têm origem do tecido mesodérmico indiferenciado, sendo capazes de se multiplicar por mitose. Encontramos vários tipos de hemócitos em *Triatoma infestans* (fig. 3): proleucócitos — são abundantes na hemolinfa, citoplasma basófilo e reduzido, núcleos grandes e densos, e nunca fagocitários; leucócitos — comuns na hemolinfa, fagocitários, citoplasma com inclusões, se multiplicam por mitose; adipoleucócitos — com inclusões de lipídeos, podendo se agrupar ou não; oenócitos — com citoplasma homogêneo e ácido, não amebóides; hemócitos gigantes — plurinucleados. Os hemócitos se dirigem para os tecidos e podem se apresentar piriformes, fusiformes, etc., sendo capazes de atravessar as paredes dos tubos. Barth (1959) apresentou uma nota prévia sobre os hemócitos de *Triatoma infestans*

não infectados, que muito nos serviu para estudos comparativos com os animais infectados.

Comparando os hemócitos dos animais não infectados com os infectados, notamos sempre o número elevado de parasitos (fig. 4) em vacúolos no citoplasma dos hemócitos, o que os tornam mais densos, além de freqüentes divisões mitóticas. Os hemócitos dos animais normais têm citoplasma bem homogêneo e poucos vacúolos.

Os tripomastigotas sanguíneos atravessam a parede do promesêntero em direção à hemocele, sendo logo englobados pelos hemócitos existentes na hemolinfa. No citoplasma dos hemócitos, os parasitos são envolvidos em vacúolos contendo hormônio de metamorfose, tomando a forma esférica, denominada amastigota ou leishmanióide (fig. 5). Estes se destacam como formas escuras no fundo hialino dos vacúolos (fig. 6).

Durante o desenvolvimento de nossa pesquisa, notamos que, a partir da data de alimentação do inseto até o 3º dia, há formas de amastigotas nos hemócitos (fig. 7). Do 4º ao 6º dia já temos muitos hemócitos gigantes infestados, outros em divisão nuclear (figs. 8 e 9), e muitos próximos às vísceras; donde se conclui, que os parasitos são liberados perto de seu lugar de penetração.

A membrana do hemócito se rompe, deixando livres os parasitos e ocasionando a morte da célula (fig. 10). Estes, soltos ou não na hemolinfa (fig. 11), se orientam para penetrar nos tubos de Malpighi. Em corte histológico transversal do vaso dorsal (fig. 12) verificamos a presença dos parasitos nas paredes musculares. São encontrados também próximos às traquéias (fig. 13) e ao redor dos tubos de Malpighi onde são numerosos (fig. 14). As alterações histológicas são bem visíveis nos tubos de Malpighi, onde notamos a membrana plasmática enrugada (fig. 15). Não encontramos estes hemócitos aderidos ao corpo gorduroso (fig. 16). Como sabemos que a função do corpo gorduroso é a de retirar da hemolinfa os elementos nocivos, supomos que os parasitos evitem ser eliminados por estas células, permanecendo longe das mesmas.

No aparelho digestivo, as alterações histológicas, se limitam ao epitélio do pós-mesêntero, o que é visto (fig. 17) em corte transversal. Nas dobras do epitélio vemos nítidos vacúolos na parte apical das suas células (fig. 18). Na base das dobras, os hemócitos parasitados são encontrados, porém,

a musculatura longitudinal e circular desta região  
se impede de retornar ao ducto digestivo.

Livres na hemolinfa, ou levadas pelos hemócitos (veja fig. 11), as formas alongadas de *T. Cruzi*

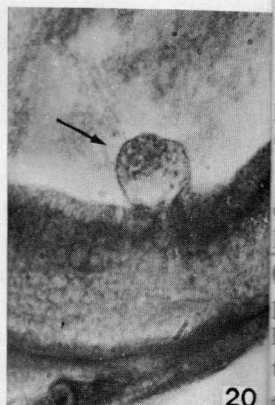
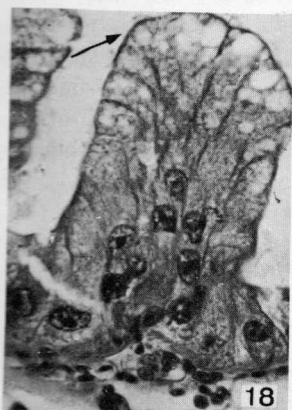
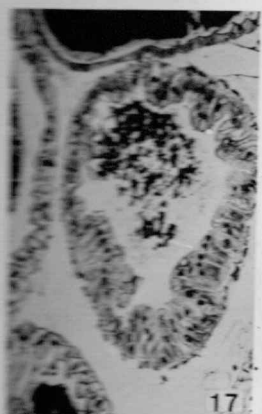
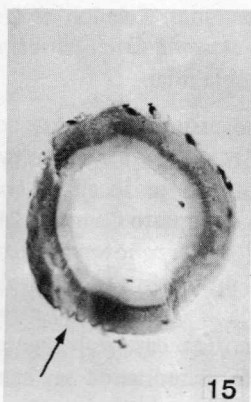
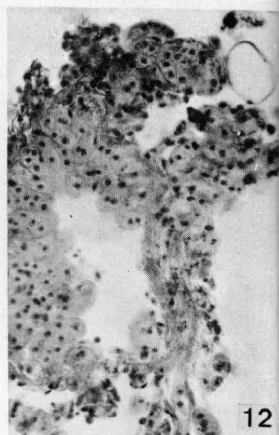


Fig. 10 - Liberação dos parasitos na hemolinfa do *Triatoma infestans*. Fig. 11 - Penetração dos parasitos no espinho dos tubos de Malpighi. Fig. 12 - Corte histológico, transversal, ao nível do vaso dorsal do *Triatoma infestans*. Fig. 13 - Parasitos próximos às traquéias. Fig. 14 - Parasitos ao redor dos tubos de Malpighi. Fig. 15 - Membrana plasmática dos tubos de Malpighi alterada pela presença do parasito. Fig. 16 - Corpo gorduroso. Fig. 17 - Corte transversal ao nível do pós-mesêntero. Fig. 18 - Dobra do epitélio do pós-mesêntero mostrando os vacúolos existentes na parte apical das células. Fig. 19 - Disposição linear do ergastoplasma dos tubos de Malpighi. Fig. 20 - Parasitos na parte apical do epitélio dos tubos de Malpighi.

hemócitos encontram no epitélio dos tubos de Malpighi condições favoráveis à sua penetração. A disposição linear do ergastoplasma favorece a entrada do parasito nas células (fig. 19). Estes se espalham no citoplasma das células dos tubos, dirigindo-se à região apical do epitélio (fig. 20). No 7º dia após a alimentação, temos o citoplasma das células dos tubos de Malpighi com muitos parasitas e no 8º dia estes já são encontrados em sua luz.

Embora não tenhamos injetado formas de cultura de *T. Cruzi* na hemolinfa, mas alimentado os insetos por via natural, isto é, digestiva, observamos as formas amastigotas nos hemócitos da hemolinfa. Em todos os exemplares estudados, o mesmo foi constatado. Este fato nos chamou a atenção, por ter sido a infestação por via digestiva. Concluímos, assim, sobre a passagem do *Trypanosoma Cruzi* sob a forma de tripomastigota sanguíneo do promesentero para os hemócitos. Ao serem englobados por estas células da hemolinfa, os parasitos tomam a forma de amastigotas e são envolvidos por vacúolos contendo hormônio de metamorfose (Wigglesworth, 1933). A multiplicação no ciclo evolutivo do *Trypanosoma Cruzi* se faz também nos vacúolos dos hemócitos, entretanto, vemos que algumas formas jovens como os proleucócitos e os oenócitos mostram-se livres do parasito. Acreditamos que a alta acidez do citoplasma dos oenócitos impede a penetração do parasito, enquanto que o crescimento dos proleucócitos, contendo pouco citoplasma e destituídos de vacúolos, constitui um obstáculo aos parasitos, que são englobados pelos demais hemócitos com citoplasma mais abundante. Wigglesworth (1933, 1934) fez um estudo apurado dos oenócitos e sua provável função, fazendo referências ao hormônio de metamorfose.

Estes parasitos com a forma alongada são excretados das células para a luz dos tubos de Malpighi e contidos em grandes esferas de excreção (fig. 21). Estas deixam ver numerosos e alongados parasitos, bem maiores do que aqueles vistos nos hemócitos (fig. 22). Em cortes histológicos longitudinais pelos tubos, notamos além das esferas de excreção com os parasitos, inúmeros outros penetrando nas células de suas paredes. Estas esferas permanecem o tempo suficiente nos longos tubos de Malpighi (figs. 23 e 24), até que a membrana se rompe, deixando livres os parasitos (fig. 25). Prosseguindo, vemos que após liberados na luz dos tubos (fig. 26), se encaminham para o reto. A des-

cida rápida dos parasitos quando saem das esferas de excreção, concorre para que encontremos quase sempre vazia a luz da parte apical dos tubos de Malpighi. Outrossim, os longos filamentos do epitélio da parte proximal dos tubos dificultam o percurso dos parasitos, o que os tornam mais visíveis em lâminas histológicas (fig. 27). Notamos que os epimastigotas ficam sempre próximos ao bordo filamentosos dos tubos e, posteriormente, são encaminhados ao reto.

Semelhante mecanismo se processa na excreção de esferas de uratos pelos tubos de Malpighi, que podem ser vistos em sua parte proximal. Dias (1930) constatou a presença de muitos *T. Cruzi* na base dos tubos de Malpighi, porém, acreditou ser uma invasão dos parasitos nesta região onde ficariam como reserva (fig. 28, de Dias). Entretanto, pelo presente trabalho, estes parasitos estariam sendo expulsos para o reto. Temos de reconhecer, que Dias esteve bem próximo do que evidenciamos, mostrando os *Trypanosoma Cruzi* nos tubos de Malpighi, entretanto, sua interpretação não foi exata conforme constatamos neste trabalho. Caso tivesse observado as células da hemolinfa e o epitélio dos tubos de Malpighi acreditamos que sua conclusão seria outra, e não aquela que o pesquisador apresentou em 1930. Vimos que na luz dos tubos os epimastigotas, juntamente com a excreção celular, vão ficar mais aderidos ao bordo das células e entre os filamentos. Outros, livres nos tubos, se encaminham para o reto, passando entre as células grandes das ampolas dos tubos, que os encaminham através da válvula pilórica até o reto. Observamos com perfeição a descida dos parasitos ao longo das células.

Na cavidade retal, junto com a excreção expelida pelo inseto, alguns parasitos vão ficar aderidos à região distal das glândulas retais, conforme já constatado por Zeledon *et al.*, (1977a) que os denominam de metatripomastigotas. Outros vão se situar entre as dobras do epitélio do reto e alguns ficam livres na ampola retal, unidos pela excreção sempre abundante (fig. 29).

Para melhor compreender a importância dos tubos de Malpighi no ciclo evolutivo do *Trypanosoma Cruzi*, faremos, também, uma ligeira recapitulação de sua histologia.

O esquema (fig. 30) mostra a topografia dos tubos em relação ao aparelho digestivo. Os tubos de Malpighi são em número de 4, longos e finos

formando na parte final as 4 ampolas que envolvem e delimitam o término do pós-mesêntero.

Wigglesworth (1931), Wigglesworth & Salpete (1961), Mello & Dolder (1977), Lacombe & Range

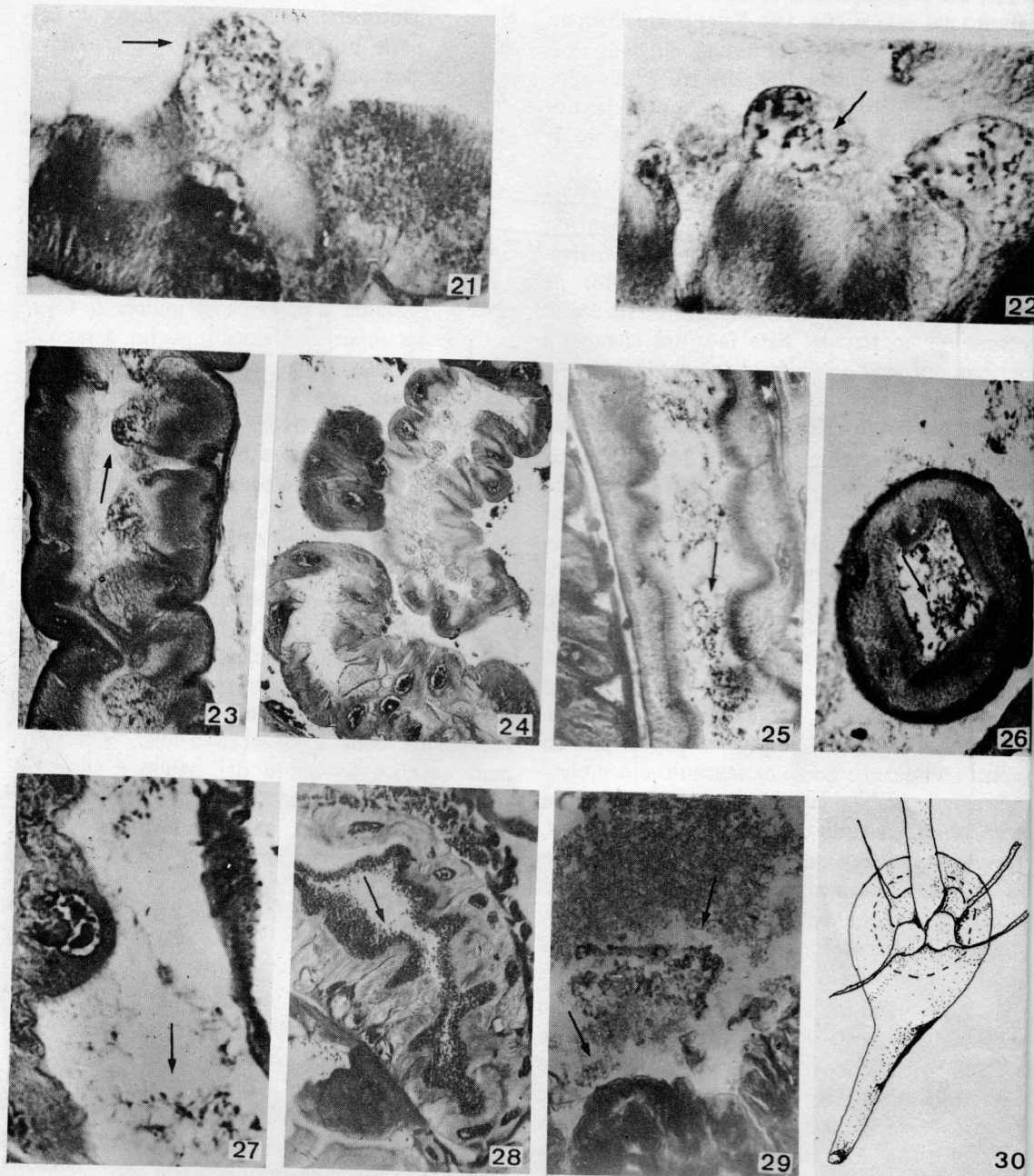


Fig. 21 - Esfera na parte apical do epitélio dos tubos de Malpighi contendo inúmeros parasitos. Fig. 22 - Parasitos dentro das esferas. Fig. 23 - Corte histológico, longitudinal, mostrando as esferas com os parasitos, dentro da luz dos tubos de Malpighi. Fig. 24 - Algumas esferas dentro da luz dos tubos. Fig. 25 - Pelo rompimento da membrana, os parasitos ficam livres na luz dos tubos de Malpighi; notamos ainda, uma esfera com os parasitos saindo. Fig. 26 - Corte histológico, transversal, ao nível dos tubos de Malpighi mostrando a incidência de parasitos na sua luz. Fig. 27 - Epimastigotas na luz dos tubos de Malpighi. Fig. 28 - *T. cruzi* nos tubos de Malpighi (Segundo Dias, 1932). Fig. 29 - Parasitos no reto do *Triatoma infestans*: formas jovens entre e próximo à epiderme e formas adultas-tripomastigotas metacíclicas na luz da ampola retal junto com a substância de excreção. Fig. 30 - Esquema dos tubos de Malpighi e sua relação com o aparelho digestivo.



(1979) e outros, fizeram um estudo acentuado dos tubos de Malpighi nos Triatomíneos não infectados. Os AA mostraram que as células da região distal dos tubos têm o bordo apical com filamentos curtos e homogêneos formando o "honey-comb border" e, as células da zona proximal têm o bordo em "brush border". Os tubos de Malpighi dos Triatomíneos correspondem ao 2.º grupo da classificação de Palm, em que não há musculatura ao longo de suas paredes (Palm, 1946).

As técnicas histológicas mostram que o reto apresenta muitas dobras epiteliais revestidas de delgada cutícula; núcleos arredondados ou alongados penetrando nas dobras; membrana nuclear bem evidenciada, cromatina densa e dispersa na periferia dos núcleos, nucléolo no centro da célula, pouco citoplasma celular e epitélio em sincício. Alguns exemplares de tripomastigotas metacíclicos e a substância de excreção podem ser vistos entre as dobras do reto.

### DISCUSSÃO

Embora Chagas tenha citado a possibilidade da evolução do *T. Cruzi* na hemolinfa do transmissor, os inúmeros pesquisadores a partir de Dias, seguem a linha em que o ciclo se passa somente dentro do aparelho digestivo. Ribeiro *et al.* (1977 a, b) mostraram que os *T. Cruzi* podem evoluir no celoma do vetor através de injeção de cultura na hemocele do inseto.

Feito o repasto do inseto através do tubo digestivo, e com o auxílio de técnicas histológicas, verificamos que a hipótese de Chagas é viável. O ciclo extra-intestinal do *T. Cruzi* no transmissor se passa na cavidade celomática do inseto.

Nosso estudo está baseado em inúmeros exemplares de *T. infestans* infectados pelo *T. Cruzi*, que após fixados, cortados histologicamente a 5 $\mu$  e 7 $\mu$  de espessura e corados por vários processos, apresentam sempre a mesma condição.

Os inúmeros hemócitos repletos de formas amastigotas no citoplasma são bem visíveis após o 3.º dia de alimentação. Semelhante fato ocorre, quando se faz cultura "in vitro", e onde se pode ver bem nítida, a divisão celular dos amastigotas. A seguir, o alongamento dos parasitos, quando então saem das células.

A forma alongada dos parasitos facilita sua penetração no epitélio dos tubos de Malpighi e seu posterior retorno ao aparelho digestivo. Acredi-

tamos que a estrutura dos tubos de Malpighi facilita a volta do parasito ao aparelho digestivo. A necessidade da perpetuação do parasito e seu ciclo no vertebrado, estimulam o *T. Cruzi* no seu trajeto.

Algumas observações feitas por Alvarenga, Zeledon e outros pesquisadores, referentes ao parasito no reto do transmissor, vêm despertando a atenção de pesquisadores.

Vimos que os *T. Cruzi* após a descida em direção ao reto, vão se localizar, ainda em forma imatura, nas paredes do reto, e depois, quando em forma tripomastigota infectante, ficam livres na ampola, esperando o momento para sair do inseto. As inúmeras dobras deste epitélio formam uma grande área para adesão do parasito, onde estes permanecem até o estado adulto, prontos a serem expulsos do inseto.

### RESUMO

- 1) As formas sanguíneas de Tripomastigotas ingeridas durante o repasto do inseto, atravessam as paredes da parte anterior do intestino médio e penetram em determinados hemócitos (leucócitos em geral, e nunca nos oenócitos e proleucócitos).
- 2) É em células sanguíneas do transmissor que os tripanosomas tomam, provavelmente, a forma amastigota ou de leishmânia, e logo iniciam o processo de divisão binária.
- 3) Nestas células continuam sua evolução e vão então tomar a forma alongada, provavelmente, critidiomorfas.
- 4) São estas formas alongadas que procuram voltar à luz intestinal, só o conseguindo através dos tubos de Malpighi.
- 5) A passagem para os tubos de Malpighi se processa por via intracelular e não intercelular.
- 6) As células dos tubos de Malpighi formam uma grande esfera que conduz os parasitos para a luz dos tubos, liberando as formas infestantes na luz, que se dirigirão para suas ampolas e daí para a luz do intestino posterior.
- 7) Na luz do intestino posterior as formas alongadas tendem a se fixar pelos flagelos, nas suas paredes.
- 8) Estas formas alongadas se desenvolvem para se transformar em tripomastigotas metací-

clícos, prontos para infectar o hospedeiro vertebrado.

- 9) Acreditamos que só as paredes dos tubos de Malpighi, por sua estrutura histológica, permitem que as formas evolutivas do *T. Cruzi* alcancem seu lúmen para depois chegarem à luz do intestino posterior.

### SUMMARY

Histology permits the determination of the cytological alterations in *Triatoma infestans* infected by *Trypanosoma cruzi* in haemolymph, Malpighian tubules, tracheal cells, muscles and proctodeum. This is not observed in fat-body and dorsal vessel. The nervous system was omitted in this work. These alterations led us to an other way in the life cycle of *Trypanosoma cruzi* of the insect. As was proved by many microphotographs, the blood trypomastigotes pass through the promesenterum walls to the haemocoel or penetrate in the haemocytes, where they get the amastigote form. The large number of the parasites inside the haemocytes with vacuoles which contain growing hormones, occupy the whole cell and through the rupture of the cellular membrane of the haemocytes these parasites are free in the haemolymph. They go as elongated form to the wall of the Malpighian tubules, the muscles of postmesenteron, etc. Then, the parasites penetrate in the distal part of the tubules of the Malpighian tubules. Facilitated by the anatomical disposition of the ergastoplasm, these parasites go to the lumen of the Malpighian tubules by the excretion sac. Inside the lumen they go immediately to the proximal part of the tubules. Afterwards, the parasites go to the proctodeum and stay there in the walls, in the form of metacyclic trypomastigotes. When the rectum is dilated the parasites leaves with the excretions.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, N.J. & BRENER, Z., 1977, Development of *Trypanosoma Cruzi* in the vector in the absence of blood. IV Reunião sobre biologia do *T. Cruzi*. Caxambu, M.G. (cf. p. 29).
- BARTH, R., 1953, Métodos de trabalho em anatomia e histologia entomológica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 51:95-186.
- BARTH, R., 1958, Métodos usados em Microanatomia e histologia entomológica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 56(2):453-471.
- BARTH, R., 1959, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- BRACK, C., 1968, Elektronmikroskopische Untersuchungen zur lebenszyklus von *Trypanosoma Cruzi*. *Acta Tropica*, 25:289-356.
- BRENER, Z., 1972, A new aspect of *Trypanosoma Cruzi* life-cycle in the invertebrate host. *J. Protozool.*, 19(1):23-27, 27 figs.
- CHAGAS, C., 1909, Nova Tripanozomíase humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1(2):1-62, 12 ests.
- CUBA-CUBA, C.A., 1974, Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. II. Observações sobre a infecção experimental de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 16(1):19-27, 2 ests.
- CUBA-CUBA, C.A., 1975, Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. IV. Observações sobre sua evolução e morfologia na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Int. Med. trop.*, São Paulo, 17(5):283-297, 9 ests.
- DIAS, E., 1930, Da presença de formas de evolução do *Trypanosoma Cruzi* Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 24(3):183-185, 3 ests.
- DIAS, E., 1932, Sur les déjections du *Triatoma megista*. Aspects du *Trypanosoma Cruzi* que l'on y rencontre. *C.R. Soc. Biol.*, Paris, 111:486-489, 2 figs.
- DIAS, E., 1932, O *Trypanosoma Cruzi* pode evoluir na cavidade geral do *Triatoma megista*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 26(1):83-84, 1 est.
- DIAS, E., 1934, Estudos sobre o *Schizotrypanum Cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28(1):1-110, 12 ests., 21 figs.
- GOMES DE FÁRIA, J. & CRUZ FILS, O., 1927, Sur l'existence d'un stage évolutif intracelulaire du *Trypanosoma Cruzi* dans la *Triatoma megista* Burm. *C.R. Soc. Biol.*, Paris, 97:1355-1357, 2 figs.
- GABE, M., 1968, *Techniques histologiques*. V + 1113pp., Masson Edit., Paris.
- LACOMBE, D., 1957, Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). VII: Estudo anatômico do ducto intestinal do *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53(1):69-111, 51 figs.
- LACOMBE, D. & RANGEL, E.F., 1977, Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XXIV: Anatomia comparada do aparelho digestivo de algumas espécies de Triatominae. *Rev. Brasil. Biol.*, 37(2):375-383, 17 figs.
- LACOMBE, D. & RANGEL, E.F., 1979, Anatomy, histology and stains in the Malpighian tubes of the *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Rev. Brasil. Biol.* 39(3):677-686, figs. 1-35.
- LISON, L., 1960, *Histochimie e Cytochimie animales. Principes et Methodes*. 3è. ed. Gauthier-Villars, edit. Paris.
- MELO, M.L.S. & DOLDER, H., 1977, Fine structure of the Malpighian tubes in the broad-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. *Protoplasma*, 93:275-288, 20 figs.
- NAQUIRA, C., 1962, Evolucion de *Trypanosoma Cruzi* en la cavidad celomica de *Triatoma infestans*. *Bol. Chil. Parasit.*, 17(1):29.
- NAQUIRA, C., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- PALM, N.B., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- PANTIN, C., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- PEARSE, A., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- PEREIRA L., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- RIBEIRO, M.P., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- ROMEIN, I., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- TOBIE, E., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- TOBIE, E., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- THOMPSON, C.T., 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- WATKINS, 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.
- WIGGLES, 1962, Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XI parte. Observações histológicas na hemolinfa do *Triatoma infestans*. *Anais Congr. Int. sobre a Doença de Chagas*: 129-139, 12 figs.

- NAQUIRA, C., 1963, Estudio preliminar sobre la infección celomica de *Triatoma infestans* por *Trypanosoma Cruzi* y *Trypanosoma* sp. de Mono. *Biologica*, 35:3-8, 8 figs.
- PALM, N.B., 1946, Studies on the peristalsis of the Malpighian tubes in insects. *Lunds Univers. Arsskr.*, N.F., (2) 42 (11):1-39, 17 figs.
- PANTIN, C.F.A., 1948, *Notes on microscopical technique for Zoologists*. 2nd ed, VIII + 77pp. Cambridge at the University Press.
- PEARSE, A.G.E., 1960, *Histochemistry Theoretical and Applied*. 2nd ed, X+998pp., 10 pls., 245 figs. London, J.A., Churchill., Ltd.
- PEREIRA DA SILVA, L.H., 1959, Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, S. Paulo. 1(2):99-118, 18 figs.
- RIBEIRO, R.D., BELDA NETO, F.M. & BARRETTO, M.P., 1977 a, Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *T. Cruzi*. LXVI : Ciclo evolutivo do *T. Cruzi* na cavidade celômica do *Panstrongylus megistus*. *Rev. Brasil. Biol.*, 37(4):907-912, 11 figs.
- RIBEIRO, R.D., BELDA NETO, F.M. & BARRETTO, M.P., 1977b, Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma Cruzi*. LXII: Evolução do *T. Cruzi* na cavidade celômica de Triatomíneos. *Rev. Brasil. Biol.*, 37(1):55-59, 6 figs.
- ROMEIN, B., 1928, *Guia-formulário de Técnica Histológica*. Barcelona.
- TOBIE, E.J., 1961, Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasit.*, 11:1-9, 4 figs.
- TOBIE, E.J., 1970, Observations on development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J. Invert. Pathol.*, 15, 118-125, 14 figs.
- THOMPSON, S.W., 1966, *Selected histochemical and histopathological methods*. XI + 1639 pp. Charles C. Thomas, Illinois.
- WATKINS, R., 1971a, *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *J. Invert. Pathol.*, 17(1):67-71.
- WATKINS, R., 1971b, Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invert. Pathol.*, 17(1):59-66, 16 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1931, The physiology of excretion in a blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) II. Anatomy and histology of the excretory system. *J. Exp. Biol.*, 8:428-442, 4 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1933, The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatominae, Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Quart. J. Microsc. Soc.*, N.S., 76(2):269-318, 15 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1934, The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera), II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Quart. J. Microsc. Soc.*, 77(2):181-222, 15 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1936, Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Triatominae). *Parasitology*, 28(2): 284-289, 4 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1939, *The Principles of Insect Physiology 1st ed.*, VIII + 434 pp., 316 figs. Methuen & Co. Ltd., London.
- WIGGLESWORTH, V.B., 1974, *Insect Physiology*. 7th ed., IX + 166 pp., 20 figs.
- WIGGLESWORTH, V.B. & SALPETER, M.M., 1962, Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). *J. Int. Physiol.*, 8: 299-307, 17 figs.
- ZELEDON, R., 1976, Host-parasite relationships in the vector. New approaches in American Trypanosomiasis Research, Belo Horizonte, Brazil (18-21 March 1975). *Pan Am. Hlth. Org., Sc. Publ.* N.º 318.
- ZELEDON, R. & ALVARENGA, N.J., 1977, Ecology of *Trypanosoma Cruzi* in the insect vector. 5th Intl. Congr. Protozool. Abstr. of papers, New York, Jun.-Jul., page 8.
- ZELEDON, R. ALVARENGA, N.J. & SCHOSINSKY, K., 1977, Ecology of *Trypanosoma Cruzi* in the insect vector. *Pan Am. Health Org. Scientific Publ.* N.º 317, 59-70, 18 figs.
- ZELEDON, R. & BLANCO, E., 1965, Relaciones huésped-parásito in *Tripanosomiasis rangeli*. I. Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. *Rev. Biol. Trop.* 13(1):143-158.