

TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

II. Transmissão de amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* e de *Phlebotomus renei*

Marcello de Vasconcellos COELHO⁽¹⁾ e Alberto Rocha FALCÃO

RESUMO

Utilizando exemplares de *P. longipalpis* e *P. renei*, que haviam sugado lesões de hamsters infectados com uma amostra de *L. braziliensis*, isolada de um caso de "úlceras de los chicleros", e expondo hamsters sadios à picada desses flebótomos, por 3 dias consecutivos, a partir do quarto dia após o repasto infectante dos flebótomos, foram observadas lesões tegumentares em 2 de 12 hamsters expostos, transcorridos cerca de 5-6 meses. As lesões iniciais, localizadas no lábio superior e na bolsa escrotal, se apresentaram como pequenas zonas de depilação, com nódulos no tecido subcutâneo. O exame microscópico dessas lesões revelou a presença de leishmânias.

É confirmada, desta forma, a possibilidade de transmissão da leishmaniose tegumentar americana pela picada de flebótomos.

INTRODUÇÃO

A transmissão de *Leishmania braziliensis* por flebótomos, embora fortemente sugerida por argumentos epidemiológicos e por dados experimentais^{2, 3, 5, 6, 7, 8, 9}, aguardava comprovação definitiva.

Observações recentes, realizadas em nosso laboratório⁴, demonstraram a grande suscetibilidade de *P. longipalpis* e *P. renei* às infecções por uma amostra mexicana de *L. braziliensis*. Nessas duas espécies de flebótomos as leptômonas de *L. braziliensis*, em 46,4 e 18,7%, respectivamente, dos exemplares que haviam sugado lesões de hamsters, apresentavam-se, transcorridos 3 a 7 dias, localizadas no cárdia anterior, e em 2,1% dos 59 *P. renei* podiam ser observadas no faringe. A grande suscetibilidade dessas espécies de *Phlebotomus*, as características do desenvolvimento do parasito, apresentando abundantes formas anteriores, aliada à grande suscetibilidade do hamster às infecções por essa amostra de *L. braziliensis*, nos le-

varam a tentar a transmissão experimental da leishmaniose tegumentar pela picada desses dípteros.

MATERIAL E METODOS

Amostra de L. braziliensis — Foi utilizada uma amostra de *L. braziliensis*, gentilmente cedida pelo Prof. Garnham, do Departamento de Parasitologia, da London School of Hygiene and Tropical Medicine, isolada de um caso de "úlceras de los chicleros". Esta amostra vem sendo mantida em nosso laboratório, há cerca de um ano, em culturas e em hamsters sírios (*Cricetus auratus*) e camundongos albinos (*Mus musculus*) através de subinoculações sucessivas.

Flebótomos — Foram utilizados exemplares de *P. longipalpis* e *P. renei*, coletados com isca humana em um foco existente no Município de Lagoa Santa, Minas Gerais.

(1) Do Instituto Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte. Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Este foco, exaustivamente estudado pelos autores, há cerca de um ano, não tem apresentado flebotomos naturalmente infectados, apesar de já terem sido examinadas mais de 2.500 fêmeas.

Infecção de flebotomos, camundongos albinos e hamsters — Uma vez capturados, os flebotomos eram colocados em pequenas caixas cilíndricas de material plástico, com uma das paredes circulares de nylon, de aproximadamente 2 cm de diâmetro. Através do nylon eram os flebotomos colocados para sugar lesões não ulceradas de hamsters, ricas em *L. braziliensis*. Em seguida eram transportados para pequenas gaiolas individuais, com armação de metal, paredes de nylon e fundo com suporte de barro, recoberto com gesso umedecido, sendo mantidos no insetário à temperatura de 25-27°C e umidade relativa superior a 80%. Diariamente, eram observados, recolhidos os mortos, dissecados, inoculando-se em focinhos de camundongos albinos os triturados em salina dos que se apresentavam positivos para leptômonas. A partir do 4.º dia, os sobreviventes, separados por espécie, eram colocados, em conjunto, em gaiolas de 40×25×25 cm, de paredes de eucatex e fundo de gesso, que era mantido umedecido. Nestas gaiolas, como nas individuais, diariamente eram oferecidas passas fervidas como alimento. Através da abertura existente em uma das paredes da gaiola era introduzido o hamster são, anestesiado com "Sonifene", na dosagem de 0,8 ml de uma diluição a 10% da solução original, em água destilada, aplicada por via parenteral. O hamster permanecia na gaiola durante 4 horas, entre 16 e 20 horas, em três dias consecutivos, após o que ficava sob observação, durante vários meses. Periódicamente era examinado, notando-se sobretudo o estado da pele, a fim de se verificar o aparecimento de lesões. Uma vez constatada qualquer alteração cutânea, era procedida biopsia da região, feitos esfregaços por aposição, que eram corados pelo May-Grünwald-Giemsa e examinados.

RESULTADOS

1 — *Camundongos albinos inoculados com triturados em salina de "P. longipalpis" ex-*

perimentalmente infectados — Foram inoculados, nos meses de setembro e outubro de 1961, 20 camundongos albinos com triturados de *P. longipalpis* e *P. renei* ricos em formas de leptômonas. Morreram de infecções intercorrentes, nos primeiros dias após a inoculação, 8 dos camundongos, permanecendo os 12 restantes sob observação, durante cerca de 6 meses. Dêstes, 2 camundongos, inoculados no dia 11-10-61 com triturado de 5 *P. longipalpis*, mortos 7 dias após o repasto infectante, apresentaram-se com pequeno nódulo subcutâneo, apenas perceptível ao tato, no local da inoculação, no focinho, transcorridos 112 e 171 dias, respectivamente. A biopsia dos nódulos revelou a presença de reduzido número de leishmânias. As lesões evoluíram nos meses seguintes com o aumento dos nódulos, tumoração não ulcerada do focinho e queda de pêlos (Fig. 1). Microscopicamente foi observado infiltrado histiocitário no subcutâneo, apresentando-se os histiócitos vacuolados e com abundante número de leishmânias (Fig. 2). Os 10 camundongos restantes permanecem sob observação, não sendo constatada até o presente qualquer alteração na pele, sendo negativos os resultados de biopsias realizadas 6 meses após a inoculação.

2 — *Hamsters expostos à picada de "P. longipalpis" e "P. renei" experimentalmente infectados* — De um total de 3 a 12 hamsters expostos, respectivamente, a vários exemplares de *P. longipalpis* e *P. renei* nos meses de setembro e outubro de 1961, dois apresentaram lesões comprovadamente produzidas por *L. braziliensis*, transcorridos aproximadamente 6 meses. Transcrevemos, a seguir, as observações dêstes hamsters:

Hamster 105 A — Exposto à picada de 27 *P. longipalpis*, experimentalmente infectados, 5 dias após o repasto infectante, durante 3 dias consecutivos, a partir do dia 29-9-61. Verificou-se em exames realizados após a morte dêstes flebotomos, que 12 ou 44,4%, apresentavam leptômonas em seus tubos digestivos, sendo observadas formas do parasito localizadas no cárdia anterior ou no faringe, em 7 exemplares. Em 26-2-62 observou-se na região da bolsa escrotal, peque-

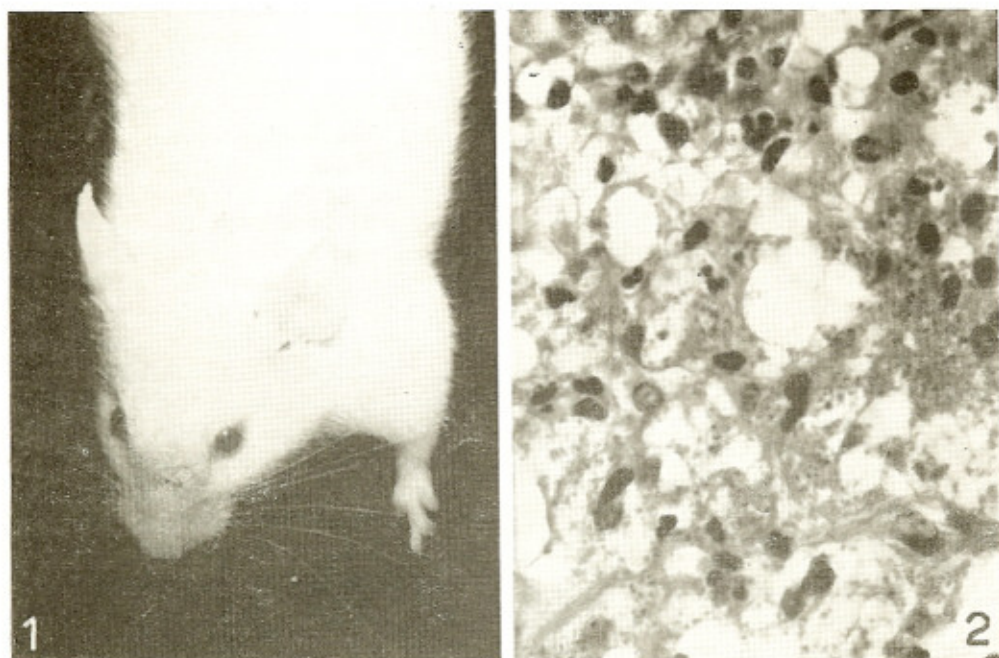


Fig. 1 — Camundongo inoculado no focinho com triturado de 5 *P. longipalpis*, infectados com *L. braziliensis*. Notar a lesão no focinho, 6 meses após a inoculação.

Fig. 2 — Aspecto do tecido subcutâneo, do camundongo apresentado na Fig. 1, notando-se o infiltrado histiocitário, rico em leishmânias (675 \times).

na zona avermelhada, notando-se, à palpação, nódulo subcutâneo com cerca de 0,5 cm de diâmetro. Biopsia realizada nesta região revelou a presença de leishmânias, em número reduzido. Em 16-3-62 notou-se aumento considerável do nódulo da bolsa escrotal, atingindo então diâmetro de cerca de 1 cm, com abundância de leishmânias ao exame microscópico (Figs. 4, 5 e 6). No focinho, no lábio superior, notava-se pequena zona de depilação, não sendo perceptível ao tato nódulo subcutâneo; biopsia desta pele depilada revelou a existência de número reduzido de leishmânias.

Hamster 108 — Em 18-10-61 e 2 dias subsequentes foi exposto à picada de 20 exemplares *P. renei*, 5-7 dias após terem sugado lesão de hamster. Observou-se, entre os 20 flebotomos, a infecção de 18, ou 90%, sendo que em 9 exemplares as leptômonas se localizavam no cárdia anterior e no estômago e em 2, no cárdia e no faringe. Em 25-3-62 observou-se zona de depilação na

pele do focinho, com cerca de 0,8 cm de comprimento máximo, apresentando a pele aspecto normal (Fig. 3). Biopsia da região revelou a presença de leishmânias.

COMENTARIOS E CONCLUSÕES

Os resultados experimentais apresentados demonstram a possibilidade de transmissão da *Leishmania braziliensis* por inoculação de triturados de flebotomos experimentalmente infectados e por picada de duas espécies de flebotomos (*P. longipalpis* e *P. renei*). A existência de condições experimentais favoráveis, especialmente os índices elevados de infecção por *L. braziliensis* obtidos em *P. longipalpis* e *P. renei*, a grande suscetibilidade do hamster sírio (*Cricetus auratus*) a essa amostra do flagelado, as características da infecção no hamster, com lesões cutâneas não ulceradas ricas em parasitos devem ser responsabilizados pelo êxito das experiências aqui conduzidas. Fica desta forma compro-

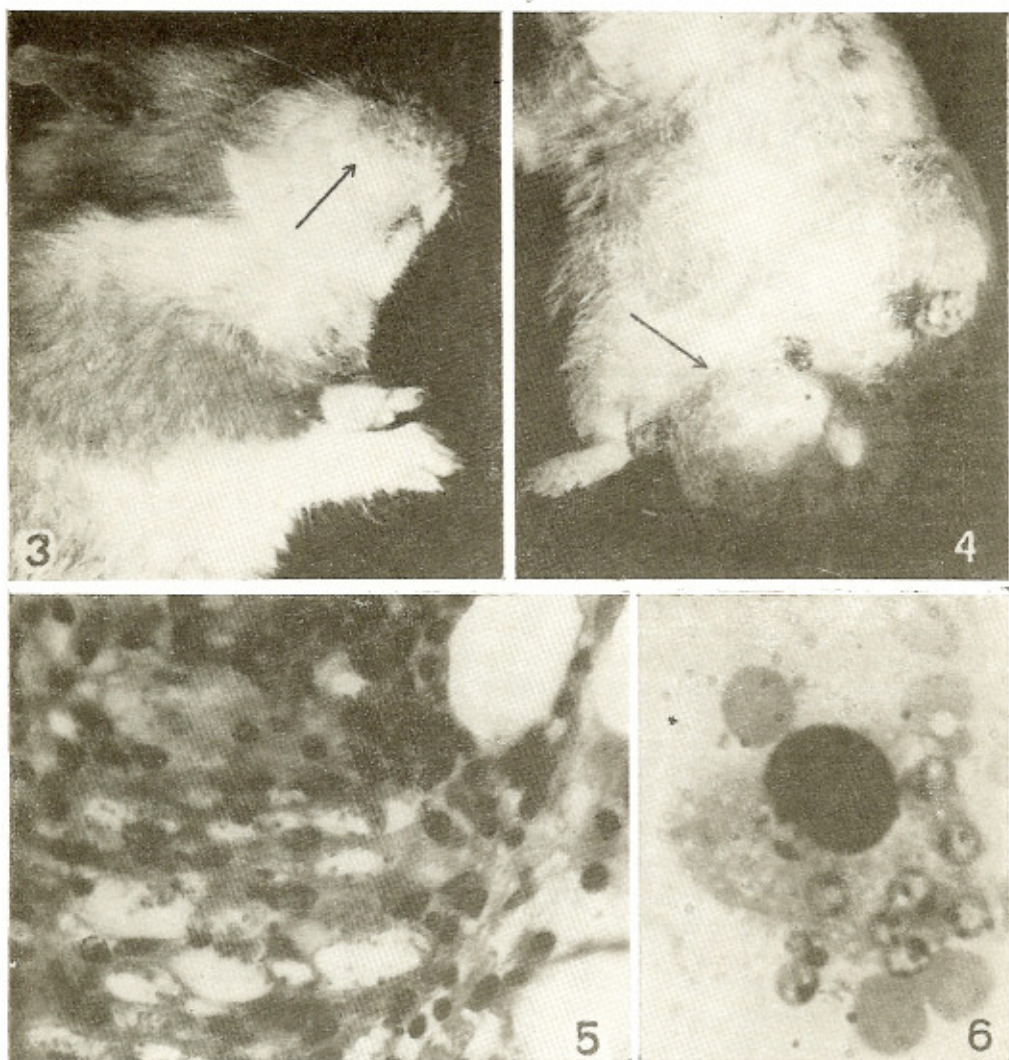


Fig. 3 — Lesão inicial no focinho do hamster 108, seis meses após ter sido sugado por exemplares de *P. renei*, infectados por *L. braziliensis*.

Fig. 4 — Lesão tumoral na bolsa escrotal do hamster 105-A, sugado por exemplares de *P. longipalpis*, experimentalmente infectados por *L. braziliensis*. Aspecto da lesão após 3 meses de evolução, 8 meses depois do repasto infectante dos flebótomos.

Figs. 5 e 6 — Aspectos microscópicos da lesão do hamster 105-A (675 \times e 1500 \times , respectivamente).

vado serem *P. longipalpis* e *P. renei* transmissores potenciais de *L. braziliensis*. É bem verdade que a ausência de superposição na distribuição dessas espécies de flebótomos e da leishmaniose tegumentar americana, de acordo com os dados conhecidos, parece indicar a ausência de participação de *P. renei*

e *P. longipalpis* na transmissão dessa parasitose. No entanto, seria necessário maior número de observações em focos de transmissão da moléstia, em sua extensa área de distribuição, para que se pudesse excluir com segurança sua eventual importância epidemiológica. Sabemos como são precários

os conhecimentos sobre a distribuição de flebotomos na América Latina, sobretudo no que se refere a espécies recentemente descritas, como é o caso de *P. renei*. No que se refere a *P. longipalpis* são conhecidas as observações de PIFANO¹⁰, que encontrou exemplares dessa espécie naturalmente parasitados com leptômonas, em zona endêmica de leishmaniose tegumentar, na Venezuela. O posterior encontro do calazar naquele país¹, embora possa sugerir serem as leptômonas observadas por PIFANO de *L. donovani*, não exclui a possibilidade de se tratarem de formas flageladas de *L. braziliensis*. De fato, as observações aqui conduzidas, comprovando a possibilidade de desenvolvimento de diferentes espécies de leishmânias numa mesma espécie de flebotomo, como é o caso de *P. longipalpis*, devem ser levadas em consideração nos levantamentos epidemiológicos, desde que, até o presente, não se dispõe de meios suficientes para distinguir com segurança as várias espécies do parasito, tanto no hospedeiro definitivo, como, principalmente, no inseto transmissor.

SUMMARY

Experimental transmission of "Leishmania braziliensis". II. Transmission of a Mexican strain by the bite of "Phlebotomus longipalpis" and "Phlebotomus renei".

Phlebotomus longipalpis and *Phlebotomus renei* fed on hamsters experimentally infected with a strain of *Leishmania braziliensis* isolated from a case of "úlceras de los chicheros" developed forward infection with leptomona forms. Experimental transmission was obtained by inoculating a suspension of grinded infected *P. longipalpis* in albino mice.

P. longipalpis and *P. renei* were able to transmit, by bite, this strain of *L. braziliensis* to normal hamsters. Cutaneous and subcutaneous leishmaniotic lesions were observed 5-6 months after the initial exposure.

REFERÊNCIAS

1. AMARAL, A. D. F.; TORREALBA, T.; J. W.; KOWALENKO, W. & BARRIOS, P. A. — Studies on visceral leishmaniasis in Venezuela. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3: 91-98, 1961.
2. ARAGÃO, H. B. — Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos flebotomos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 20:177-195, 1927.
3. ARAGÃO, H. B. — Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedium*. Brasil-méd. 36:129-130, 1922.
4. COELHO, M. V. — Suscetibilidade de *Phlebotomus longipalpis* e *P. renei* à infecção por *Leishmania braziliensis*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4:159-162, 1962.
5. FORATTINI, O. P. & SANTOS, M. R. — Nota sobre a infecção natural de *Phlebotomus intermedium* Lutz e Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. Arq. Hig. Saúde públ. 17:171-173, 1952.
6. PESSOA, S. B. & BARRETTO, M. P. — Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro, Minist. Educ. e Saúde, 1948.
7. PESSOA, S. B. & COUTINHO, J. O. — Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *L. brasiliensis*. Rev. Biol. & Hig. 10:139-142, 1940.
8. PESSOA, S. B. & COUTINHO, J. O. — Infecção natural e experimental nos flebotomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo. Hospital, Rio de Janeiro 20: 25-35, 1941.
9. PESSOA, S. B. & PESTANA, B. R. — Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente da *L. brasiliensis*. Acta med., Rio de Janeiro 5:106-111, 1940.
10. PIFANO, F. — Notas sobre entomologia médica venezolana. I. Flebotomos transmissores de leishmaniasis tegumentaria en Valle de Yaracury. Bol. Entomol. venezol. 2:99-102, 1943.

Recebido para publicação em 26 março 1962.