

DESENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *LEISHMANIA*  
EM ESPÉCIES BRASILEIRAS DE FLEBÓTOMOS DO GÊNERO  
*LUTZOMYIA* FRANÇA, 1924

V — Infetividade de leptomonas evoluindo no flebótomo e  
experiências de transmissão de leishmanioses

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

R E S U M O

A inoculação em hamsters, por via subcutânea, de leptomonas de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. mexicana*, em desenvolvimento no tubo digestivo de *L. longipalpis*, produziram lesões nas quais foi verificada a presença de leishmânias. A transmissão independeu do período de evolução do flagelado, indicando a ausência de formas especialmente infetantes no desenvolvimento do protozoário no inseto.

Em um total de 37 tentativas de transmissão por picada de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. tropica*, utilizando-se 172 exemplares de *L. longipalpis* e 30 exemplares de *L. renei*, intensamente infetados e muitas vezes com leptomonas localizadas na faringe, na cavidade bucal e na probóscida, e que seguramente segaram o hamster são, apenas em duas ocasiões obteve-se a transmissão de leishmânias. Em ambos os casos, tratou-se de *L. mexicana*, transmitida por *L. longipalpis* e *L. renei*.

O grande número de insucessos na transmissão de leishmânias, apesar das condições experimentais favoráveis utilizadas, bem como a irreprodutibilidade dos êxitos obtidos indicam o atual desconhecimento do mecanismo de transmissão das leishmanioses pelos flebótomos especialmente no que concerne a leishmaniose tegumentar no Novo Mundo.

I N T R O D U Ç Ã O

A transmissão experimental de espécies do gênero *Leishmania* por picada de flebótomos tem sido obtida, em diversas circunstâncias (SMITH & col.<sup>4</sup>; ADLER & BER<sup>2</sup>; SWAMINATH & col.<sup>17</sup>; CHUNG & FENG<sup>5</sup>; CHUNG<sup>4</sup>; STRANGWAYS-DIXON & LAINSON<sup>15</sup>; COELHO & FALCÃO<sup>7</sup>; BIACI & col.<sup>3</sup>), utilizando-se flebótomos alimentados em animais parasitados ou artificialmente alimentados com culturas do protozoário. No en-

tanto, apesar dos êxitos obtidos comprovarem que a transmissão das leishmanioses se faz por meio da picada de flebótomos, o grande número de insucessos, assinalados praticamente por todos os pesquisadores que tem trabalhado no assunto, parece justificar a opinião de que, até o presente, permanece fora de controle científico o real mecanismo de transmissão das leishmanioses.

No presente trabalho, numa tentativa de contribuir para a elucidação desse importante problema, é estudada a infetividade para hamsters de leptomonas de *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*, evoluindo em *L. longipalpis* e *L. renei*. Adicionalmente estuda-se a possibilidade destas espécies de flebótomos transmitirem para hamsters, por picada, as diferentes espécies de *Leishmania* acima citadas.

#### MATERIAL E METODOS

*Flebótomos* — Nas diversas experiências de transmissão foram utilizados exemplares de *L. longipalpis* e *L. renei*, capturados no Município de Lagoa Santa, Minas Gerais, infetados ao sugarem hamsters parasitados.

Para as inoculações experimentais de leptomonas em desenvolvimento no inseto, foi utilizado como inóculo triturado em salina de tubos digestivos de flebótomos já especificamente classificados e examinados. Estes triturados eram inoculados em hamsters (*Cricetus auratus*), que passavam a ser observados durante o período máximo de dezoito meses.

Nas tentativas de transmissão por picada do inseto, foram utilizados flebótomos que haviam previamente sugado animal parasitado e permanecido nas gaiolas de manutenção por três ou mais dias. Dessas gaiolas, eram os insetos transferidos para as caixas de alimentação, por meio do capturador de Castro e induzidos a um segundo ou repetidos repastos em hamster são. Aquêles insetos com evidências de haverem sugado o segundo hamsters eram sacrificados, dissecados, examinados e classificados. Os hamsters sujeitos às experiências de transmissão, eram examinados semanalmente, tanto por meio de cuidadosa observação do tegumento, como por meio de biopsias de baço e de pele, especialmente com lesão aparente. Uma vez transcorridos 18 meses e na ausência de infecção aparente, eram sacrificados, examinados microscopicamente a pele do local de inoculação, o baço e o fígado. Além dos exames diretos, realizaram-se sistematicamente culturas de sangue cardíaco, de baço, de fígado e de tecido conectivo subcutâneo, retirado do sítio de inoculação, e semeados em meios de N.N.N.

e de ADLER (semi-sólido com sangue de coelho). Os exames de tecidos foram realizados em esfregaços por aposição, fixados pelo metanol e corados pelo Giemsa.

*Leishmania* — Nas várias experiências foram utilizadas amostras de *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. donovani* e *L. mexicana*. A origem e manutenção das várias amostras, bem como as técnicas de manutenção e de infecção de flebótomos foram descritas nos trabalhos anteriores desta série (COELHO & col.<sup>s</sup>).

#### RESULTADOS

A transmissão de *L. braziliensis*, amostras n.ºs 4 e 6, de *L. mexicana* n.º 5, de *L. tropica* n.º 11, e de *L. donovani* n.º 8, foi obtida por meio de inoculação, em hamsters, de triturados de tubos digestivos de *L. longipalpis* experimentalmente infetados. Utilizando-se inócula, semelhantes de *L. renei*, obteve-se a transmissão para hamsters de *L. braziliensis* n.º 4 e *L. mexicana* n.º 5. Resultados mais detalhados das experiências conduzidas neste sentido são apresentados na Tabela I.

Nas várias tentativas de transmissão por picada, utilizando-se flebótomos que, após dois ou mais repastos no hamster são, eram sacrificados e examinados, foram obtidos quase sempre resultados negativos. Os flebótomos em questão, contudo, em grande proporção dos casos, apresentavam-se intensamente parasitados, com leptomonas situadas na cárdia anterior, válvula esofagiana e, algumas vezes, na cavidade bucal e na probóscida. A formação de grande aglomerado de flagelados ao nível da válvula esofagiana não impediu, em nenhum caso, nôvo e farto repasto sanguíneo pelo flebótomo. As leptomonas, após a ingestão de sangue, tornavam-se muito ativas, com movimentos flagelares muito rápidos.

Apenas em duas ocasiões obteve-se a transmissão por picada, em duas diferentes experiências com *L. longipalpis* e *L. renei* e com a mesma espécie do parasita, *Leishmania mexicana*, amostra n.º 5. Maiores detalhes sobre as várias tentativas de transmissão das diferentes espécies de *Leishmania* são apresentados na Tabela II.

TABELA I  
Transmissão de *Leishmania* através da inoculação de leptomonas de flebótomos experimentalmente infetados

N.º de experiências	Flebótomos			<i>Leishmania</i>	N.º de hamsters	Resultados
	Espécie	Dias após repasto infetante	N.º de exemplares			
1	<i>L. longipalpis</i>	5-9	5	<i>L. braziliensis</i> , n.º 4	8	Dois morreram nos 5 primeiros dias. Dos 14 restantes 2 apresentaram lesões ricas em leishmânias, 106 e 109 dias após a inoculação.
2	<i>L. renei</i>	3	5	<i>L. braziliensis</i> , n.º 4	10	Seis morreram nos 10 primeiros dias. Dos 4 restantes 1 apresentou-se com lesão rica em leishmânia, 65 dias após a inoculação. Os 3 outros mantiveram-se negativos durante os 18 meses de observação.
3	<i>L. longipalpis</i>	2-4	4	<i>L. braziliensis</i> , n.º 6	7	Um morreu 4 dias após a inoculação. Os 6 restantes apresentaram-se com lesão nodular, 35 a 43 dias depois de infetados.
4	<i>L. longipalpis</i>	8	2	<i>L. braziliensis</i> , n.º 6	2	Um apresentou-se negativo até a morte, 5 meses após a inoculação. O outro, decorridos 80 dias, apresentou nódulo cutâneo rico em leishmânias.
5	<i>L. longipalpis</i>	4	3	<i>L. mexicana</i> , n.º 5	2	Apresentou nódulo rico em leishmânias, 69 dias após a inoculação. O outro conservou-se negativo durante 14 meses, quando morreu.
6	<i>L. renei</i>	3	2	<i>L. mexicana</i> , n.º 5	1	Apresentou nódulo subcutâneo, rico em leptomonas, 190 dias após a inoculação.
7	<i>L. longipalpis</i>	3	6	<i>L. tropica</i> , n.º 11	5	Um morreu 10 meses após a inoculação, sem apresentar lesões aparentes e negativo aos exames parasitológico e de isolamento em cultura. Os 4 restantes apresentaram nódulos ricos em leishmânias 26, 32, 35 e 54 dias após a inoculação.
8	<i>L. longipalpis</i>	8-12	7	<i>L. donovani</i> , n.º 8	2	Um morreu 35 dias após, negativo. O outro, com 43 dias apresentou cultura de fragmento de baço positiva, sendo negativo o exame microscópico de esfregaco, por aposição. Este hamster veio a morrer 2 dias após, em consequência do ato cirúrgico.

TABELA II  
Tentativas de transmissão de *Leishmania*, por picada de *L. longipalpis* e *L. renei*, experimentalmente infetados

N.º de experiências	Flebótomos			<i>Leishmania</i>	N.º de hamsters	Resultados
	Espécie	Dias após repasto infetante	N.º de exemplares			
7	<i>L. longipalpis</i>	8-21	46	<i>L. donovani</i> , n.º 8	9	Todos negativos até o máximo de 18 meses de observação, quando foram sacrificados.
10	<i>L. longipalpis</i>	4-10	61	<i>L. braziliensis</i> , n.º 4	13	Todos negativos até o máximo de 1 ano de observação, quando morreram.
2	<i>L. renei</i>	6-10	12	<i>L. braziliensis</i> , n.º 4	2	Ambos negativos, até 13 meses de observação, quando morreram.
4	<i>L. longipalpis</i>	7-11	26	<i>L. braziliensis</i> , n.º 6	6	Todos negativos até 18 meses de observação, quando foram sacrificados.
7	<i>L. longipalpis</i>	4-10	27	<i>L. mexicana</i> , n.º 5	8	Um apresentou nódulo cutâneo com leishmânias, aproximadamente 5 meses após ser sugado. Os outros 7 apresentaram-se negativos até 17 meses de observação, quando os últimos morreram.
8	<i>L. renei</i>	4-7	18	<i>L. mexicana</i> , n.º 5	4	Um apresentou nódulo rico em leishmânias, 127 dias após ter sido sugado. Os três restantes mostraram-se negativos até um máximo de 18 meses de observação, quando foram sacrificados.
4	<i>L. longipalpis</i>	5-7	12	<i>L. tropica</i> , n.º 11	4	Todos negativos até 18 meses de observação, quando foram sacrificados.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A transmissão de amostras de *L. braziliensis*, de *L. donovani*, de *L. mexicana* e de *L. tropica* foi obtida em hamsters, por meio de inoculações de triturados de tubos digestivos de *L. longipalpis*, infetados ao sugarem hamsters parasitados (Tabela I). Nessas experiências foram utilizados, em várias ocasiões, flebótomos apresentando localizações anteriores de leptomonas; no entanto, em algumas delas as infecções eram de apenas 2 a 3 dias, com leptomonas localizadas no estômago, o que não impediu que se obtivesse sua transmissão. Desta forma, ficou comprovado que em qualquer fase do desenvolvimento no inseto as leptomonas são infetantes para hamsters, desde que sejam inoculadas sob sua pele. O fato de leptomonas de quatro distintas espécies de *Leishmania*, evoluindo na mesma espécie de flebótomo — *L. longipalpis* — se mostrarem infetantes para hamsters demonstra, por outro lado, que a infetividade independe da evolução na espécie adequada de flebótomo. Sabe-se que *L. longipalpis* é, seguramente, o transmissor de *L. donovani* no Brasil, como foi demonstrado em focos de calazar, no Ceará, por DEANE & DEANE<sup>9</sup>. No entanto, o encontro de exemplares desta espécie naturalmente infetados por leptomonas, em foco de leishmaniose tegumentar, na Venezuela (PIFANO<sup>13</sup>), sugere a possibilidade de sua participação na transmissão de *L. braziliensis*, pelo menos naquele país.

No que se refere a *L. mexicana* e *L. tropica*, a comprovação de que leptomonas destas espécies, evoluindo em flebótomos de regiões ou sub-regiões zoogeográficas diferentes, mantêm sua infetividade para animais de laboratório, e podem mesmo, como é o caso de *L. mexicana* (COELHO & FALCÃO<sup>7</sup>), ser transmitidas por picada (Tabela II), nos induz a conclusão de que devem ser consideradas com ceticismo as afirmações da existência de especificidade de flebótomos, em relação as leishmânias parasitas do homem. No entanto, é necessário assinalar, como o fizeram ADLER<sup>1</sup> e BIAGI & col.<sup>3</sup>, que o fato de uma determinada espécie de flebótomo se infetar experimentalmente por uma espécie de *Leishmania* não implica necessariamente em que possa ela ter qualquer papel na transmissão da leishmaniose na

natureza. No entanto, estudos sobre a suscetibilidade de diferentes espécies de flebótomos às amostras de *Leishmania* têm sua importância, na medida que podem revelar transmissores potenciais do protozoário. Esses estudos são ainda necessários, especialmente tendo em vista o atual desconhecimento das condições de transmissão na maior parte dos focos endêmicos, sobretudo de leishmaniose tegumentar americana, e considerando ainda a ausência de dados sobre a distribuição de numerosas espécies do gênero *Lutzomyia* no continente. Deve ser enfatizada, contudo, a ressalva de que só o conhecimento das condições epidemiológicas do próprio foco pode levar a conclusão de que determinada espécie de flebótomo está realmente implicada na transmissão da protozoose. A generalizada suscetibilidade de flebótomos às infecções por *L. braziliensis*, por outro lado, deve conduzir o epidemiologista a uma atitude de cautela diante dos achados de infecções naturais em flebótomos, que podem representar somente linhas laterais na cadeia de transmissão, sem qualquer significação epidemiológica efetiva.

O mecanismo de transmissão das leishmanioses por flebótomos, considerado até pouco tempo como problema esclarecido, vem sofrendo recentemente uma série de interrogações, principalmente no que diz respeito a leishmaniose tegumentar americana. Número considerável de experiências com resultados negativos tem sido assinalado, mesmo quando foram utilizados flebótomos intensamente parasitados, com localizações anteriores de leptomonas (STRANGWAYS-DIXON & LAINSON<sup>16</sup> e COELHO<sup>6</sup>) (Tabela II). Apenas em raras ocasiões e em circunstâncias de difícil reproduzibilidade foi obtida por picada de flebótomos a transmissão experimental de *L. mexicana* (STRANGWAYS-DIXON & LAINSON<sup>16</sup>; COELHO & FALCÃO<sup>7</sup>; BIAGI & col.<sup>3</sup>). Obtivemos sistematicamente resultados negativos em 21 tentativas de transmissão de *L. braziliensis* por *L. longipalpis* e *L. renei* (Tabela II), embora tenham sido utilizados 99 insetos intensamente parasitados, com 4 a 11 dias após o repasto infetante e com infecções na cárdia, no proventrículo, na faringe, e algumas vezes, na cavidade bucal e na probóscida. Considerando os baixos índices naturais de

infecção em flebotomos nos focos endêmicos (PESSÔA & BARRETTO<sup>12</sup>), torna-se difícil imaginar a possibilidade do homem ser sugado em condições normais por quantidade semelhante de insetos infetados. As presentes considerações, somadas às recentes observações dos pesquisadores do Gorgas Memorial Laboratory, no Panamá (HERTIG & McCONNEL<sup>10</sup>; JOHNSON & col.<sup>11</sup>), que assinalaram grande número de infecções naturais e experimentais de flebotomos, com localização posterior de leptomonas, tornam patente a necessidade de revisão nos estudos sobre o mecanismo de transmissão da leishmaniose tegumentar no Novo Mundo.

O problema parece menos agudo no que respeita a *L. tropica* e *L. donovani*. É sabido que, em diversas ocasiões e em distintos focos endêmicos, tem sido obtida a transmissão experimental destas espécies (ADLER & BER<sup>2</sup>; SMITH & col.<sup>14</sup>; SWAMINATH & col.<sup>17</sup>; CHUNG & FENG<sup>5</sup>; CHUNG<sup>4</sup>). No entanto, mesmo em se tratando de *L. tropica* e *L. donovani*, são mais numerosos os insucessos que os resultados positivos, o que parece indicar que ainda permanecem desconhecidos os fatores que condicionam a transmissão das leishmanias pelos flebotomos.

#### SUMMARY

*Behaviour of Leishmania species in Brazilian sandflies (Lutzomyia França, 1924). V — Infectivity of leptomonads developing in phlebotomi and transmission of different species of Leishmania by Brazilian sandflies.*

Hamsters inoculated subcutaneously with *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. tropica* and *L. mexicana* leptomonads from the digestive tract of *L. longipalpis* developed lesions harbouring L. D. bodies. The transmission did not depend on the stage of the flagellate's life-cycle in the insect, leptomonads being infective from the second day on.

In a total of 37 attempts to transmit by bite, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana* and *L. tropica*, employing, respectively, 172 and 30 specimens of *L. longipalpis* and *L. renei*, highly infected with leptomonads in the fore gut and proboscis, transmission was achieved on two occasions only.

Consistent failure to transmit leishmanias, despite the favourable conditions under which the experiments were conducted, as well as the great difficulty to reproduce the positive results obtained, actually show the lack of information on the mode of transmission of leishmaniasis by sandflies, especially as regards dermal leishmaniasis of the New World.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, S. — *Leishmania*. *Advances Parasit.* 2:35-96, 1964.
2. ADLER, S. & BER, M. — The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *Indian J. Med. Res.* 29: 803-809, 1941.
3. BIAGI, F.; DE BIAGI, A. M. & BELTRAN, F. — *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmissor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Med. Mex.* 30:267-272, 1965.
4. CHUNG, H. L. — A résumé of Kala-Azar work in China. *Chinese Med. J.* 71:421-464, 1953.
5. 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.
6. COELHO, M. V. — Pesquisas recentes sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Brasil. Malariol. & Doenças Trop.* 16:13-18, 1964.
7. COELHO, M. V. & FALCÃO, A. R. — Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II — Transmissão de amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* e de *Phlebotomus renei*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:220-224, 1962.
8. 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.
9. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará. *Hospital (Rio)* 48: 347-364, 1955.
10. HERTIG, M. & McCONNEL, E. — Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Exp. Parasit.* 14:92-106, 1963.

COELHO, M. de V.; FALCÃO, A. R. & FALCÃO, A. L. — Desenvolvimento de espécies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebótomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. V — Infetividade de leptomonas evoluindo no flebótomo e experiências de transmissão de leishmanioses. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:367-373, 1967.

11. JOHNSON, P. T.; McCONNEL, E. & HER-  
TIG, M. — Natural infections of lepto-  
monas flagellates in panamanian *Phlebotomus*  
sandflies. *Exp. Parasit.* 14:107-122,  
1963.
12. PESSÓA, S. B. & BARRETTO, M. P. —  
*Leishmaniose tegumentar americana*. Rio  
de Janeiro, Ministério da Educação e Saúde,  
1948, 527 pp.
13. PIFANO, F. — Notas sôbre entomologia  
médica venezolana. I — Flebótomos trans-  
missores de leishmaniasis tegumentária en  
Valle do Yaracury. *Bol. Entomol. Venezol.*  
2:99-102, 1943.
14. SMITH, R. O. A.; HALDER, K. C. &  
AHMED, I. — Further investigations on  
the transmission of Kala-Azar (Part III).  
The transmission of Kala-Azar by the bite  
of the sandfly *P. argentipes* *Indian J. Med.*  
*Res.* 28:585, 1940.
15. STRANGWAYS-DIXON, J. & LAINSON, R.  
— Dermal leishmaniasis in British Hondu-  
ras: Transmission of *L. braziliensis* by  
phlebotomus species. *Brit. Med. J.* 1:297-  
299, 1962.
16. STRANGWAYS-DIXON, J. & LAINSON, R.  
— The epidemiology of dermal leishma-  
niasis in British Honduras (Part III). The  
transmission of *Leishmania mexicana* to  
man by *Phlebotomus pessoanus*, with obser-  
vations on the development of the para-  
site in different species of phlebotomus.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:192-  
201, 1966.
17. SWAMINATH, C. S.; SHORTT, H. E. &  
ANDERSON, L. A. P. — Transmission of  
Indian Kala-Azar to man by the bites of  
*Phlebotomus argentipes*. *Indian J. Med.*  
*Res.* 30:473-477, 1942.

Recebido para publicação em 2/12/1966.