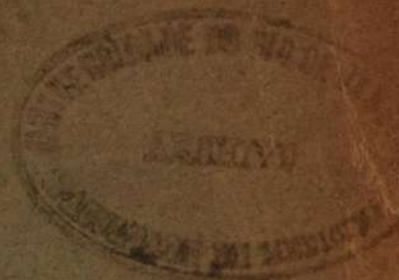


81
14
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO RIO DE JANEIRO



ESTUDOS SOBRE O SCHIZOTRYPANUM CRUZI
(Tése de doutoramento)

por

EMMANUEL DIAS

APROVADA COM DISTINÇÃO E LAUREADA COM OS PREMIOS GUNNING E DE LOUVOR



Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz

RIO DE JANEIRO
1933

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO RIO DE JANEIRO

TÉSE

Apresentada á Faculdade em 25 de Novembro
e defendida em 21 de Dezembro de 1933

por

EMMANUEL DIAS

(Adjunto de Chefe de Laboratorio contratado do Instituto Oswaldo Cruz).
Filho do Dr. Ezequiel Caetano Dias e Dna. Maria Candida da Fonseca Dias,
natural do Distrito Federal

DISSERTAÇÃO

ESTUDOS SOBRE O SCHIZOTRYPANUM CRUZI (cadeira de Parasitología)

Tése aprovada com distincão e laureada com os premios Gunning e de Louvôr

Banca examinadora composta pelos Professores :
Eduardo Rabello, Olympio da Fonseca Filho, Aloysio de Castro, Bruno Lobo e Evandro Chagas

Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz

RIO DE JANEIRO
1933



Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro

RELAÇÃO DO CORPO DOCENTE

1933

NOME	CADEIRA	CATEGORIA
Francisco Lafayette R. Pereira	Física biológica	Catedrático em 1925 Substituto em 1916
Adelino da Silva Pinto	Química fisiológica	Catedrático em 1926 Substituto em 1919
José de Carvalho del Vecchio	Química fisiológica	Catedrático em 1925 Substituto em 1920
Olympio O. Ribeiro da Fonseca	Parasitologia	Catedrático em 1933
Alvaro Frós da Fonseca	Anatomia	Catedrático em 1926
Ernani Carlos de Menezes Pinto	Histologia e embriologia	Catedrático em 1925 Substituto em 1911
Oscar Frederico de Souza	Fisiologia	Catedrático em 1910 Substituto em 1895
Alvaro Ozorio de Almeida	Fisiologia	Catedrático em 1926 Substituto em 1911
Bruno Alvares da Silva Lobo	Microbiologia	Catedrático em 1914 Substituto em 1908
Pedro Augusto Pinto	Farmacologia	Catedrático em 1920 Substituto em 1917
Agenor Guimarães Porto	Terapêutica clínica	Catedrático em 1916 Substituto em 1911
Francisco Pinheiro Guimarães	Patologia geral	Catedrático em 1922 Substituto em 1911
Ugo de C. Pinheiro Guimarães	Clinica propedeutica cirurgica	Catedrático em 1927
Raul Leitão da Cunha	Anatomia e fisiologia patológicas	Catedrático em 1907 Substituto em 1907
João Benjamin Ferreira Baptista	Tecnica operatoria e cirurgia experimental	Catedrático em 1922 Substituto em 1911
Julio Afranio Peixoto	Higiene	Catedrático em 1916 Substituto em 1906
Henrique Tanner de Abreu	Medicina legal	Catedrático em 1925 Substituto em 1917
Oswaldo Coelho de Oliveira	Clinica medica	Catedrático em 1919 Substituto em 1915
Clementino da Rocha Fraga Jo.	Clinica medica	Catedrático em 1914 Substituto em 1915
Miguel de Oliveira Couto	Clinica medica	Catedrático em 1901 Substituto em 1898
Aloysio de Castro	Clinica medica	Catedrático em 1909 Substituto em 1908
Juvenil da Rocha Vaz	Clinica propedeutica medica	Catedrático em 1925 Substituto em 1919
Augusto Brandão Filho	Clinica cirurgica	Catedrático em 1925 Substituto em 1920
Augusto Paulino Soares de Souza	Clinica cirurgica	Catedrático em 1916 Substituto em 1911
Alcindo de Figueiredo Baena	Clinica urologica	Catedrático em 1919 Substituto em 1918
Fernando Ribeiro de Magalhães	Clinica obstetrica	Catedrático em 1922 Substituto em 1911
Augusto de Souza Brandão	Clinica ginecologica	Catedrático em 1911 Substituto em 1887

NOME	CADEIRA	CATEGORIA
José Antonio de Abreu Fialho	Clinica oftalmologica	Catedratico em 1906 Substituto em 1897
João Marinho de Azevedo	Clinica oto-rino-laringologica	Catedratico em 1918 Substituto em 1915
Luiz Pedro Barbosa	Clinica pediatrica medica e hig. infantil	Catedratico em 1928 Substituto em 1911
Antonio B. Barbosa Vianna	Clinica cirurgica infantil e ortopedica	Catedratico em 1925 Substituto em 1922
Eduardo Rabello	Clinica dermatologica e sifilografica	Catedratico em 1925 Substituto em 1915
A. Austregesilo Rodrigues Lima	Clinica neurological e neuropatologia	Catedratico em 1912 Substituto em 1909
Henrique de Brito Belfort Roxo	Clinica psiquiatria	Catedratico em 1921 Substituto em 1911
Carlos R. Justiniano das Chagas	Clinica de doenças tropicais e infectuosas	Catedratico em 1925
Alfredo Alberto Pereira Monteiro	Clinica neuro-cirurgica	Catedratico em 1926
José de Moura Muniz	Microbiologia	Substituto em 1911
Renato G. de Souza Lopes	Terapêutica	Substituto em 1920
Octavio do Rego Lopes	Clinica oftalmologica	Substituto em 1908
Francisco Eiras	Clinica oto-rino-laringologica	Substituto em 1918

PROFESSORES EM DISPONIBILIDADE

Fernando Terra	Clinica dermaologica e sifilografica
Antonio Sattamini	Fisica medica
Luiz Antonio da Silva Santos	Anatomia descritiva
Tiburcio Valeriano Pecegueiro do Amaral	Quimica organica e biologica

PROFESSORES JUBILADOS

Benjamin Franklin Ramiz Galvão
Benjamin Antonio da Rocha Faria
Augusto Brant Paes Leme

DIRETOR — PROFESSOR RAUL LEITÃO DA CUNHA — 1931 a 1934

« EDUARDO RABELLO — Em exercicio

CONSELHO TECNICO-ADMINISTRATIVO

Professor Miguel de Oliveira Couto

« Eduardo Rabello
« Francisco Lafayette Rodrigues Pereira
« Augusto Brandão Filho
« Pedro Augusto Pinto
« Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas

Secretario da Faculdade — Dr. Martinho Lima Guimarães

Parecer da Comissão nomeada pela Congregação da Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, sobre a concessão dos premios Gunning e de Louvôr, propostos á presente tése pela banca examinadora:

« O trabalho do Dr. Emmanuel Dias, saído dos laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz, intitula-se *Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi* e constitui a mais ampla contribuição (até agora trazida ao conhecimento desse protozoario patogenico depois das publicações feitas pelo seu descobridor. O autôr abôrda a questão em capitulos sucesivos dedicados ao estudo do *Schizotrypanum cruzi* no organismo do hospedador vertebrado e no do invertebrado transmissor, do desenvolvimento em cultura e do módo de transmissão.

Em cada um desses capitulos, trás o autôr sua contribuição pessoal, óra de simples confirmação de fatos já assinalados mas ainda duvidosos, óra de verificações originais que ampliam o conhecimento do assunto tratado. Ainda, no estudo da infecção, o autôr precisa vários fatos interessantes, que dizem respeito ao aparecimento dos parasitos no sangue circulante e ás fâses de incubação, aguda e crônica da doença de Chagas. No capitulo referente á marcha geral da infecção, o autôr estudou particularmente o comportamento do *Schizotrypanum cruzi* em relação ao sistema reticulo-endotelial, cujo bloqueio biológico provôca.

A parte mais interessante do trabalho, porém, é a que diz respeito á evolução do parasito no tubo digestivo do inséto transmissor, evolução essa que o autor demoradamente estudou em observações minuciosas e repetidas, obtendo resultados por vezes diferentes dos até agora conseguidos por outros autôres. Nesse estudo da evolução do *Schizotrypanum cruzi* o autôr contribui com vários dados novos para a ciencia e dá detalhes ainda não anteriormente assinalados sobre a marcha do processo evolutivo. No estudo da distribuição do parasito no meio exterior o autôr se demorou particularmente pesquisando a infecção natural de morcegos por Tripanosomídeos do genero *Schizotrypanum* e procurando averiguar sua possivel identidade com o parasito do homem.

A rapida análise que acabamos de fazer da tése inaugural do Dr. Emmanuel Dias basta para demonstrar o merito do trabalho a que a Congregação da Faculdade, conferindo os premios Gunning e de Louvôr, fará inteira e merecida justiça ».

(a) *Carlos Chagas*

Olympio da Fonseca, filho.

A Carlos Chagas

Homenagem

INTRODUÇÃO

A descoberta do *Schizotrypanum cruzi* por Carlôs Chagas trouxe novo campo de pesquisas no domínio da Biología e da Medicina Tropical. Pelos trabalhos de Chagas adquiriu a Ciência os conhecimentos fundamentais sobre uma nova doença humana: o agente etiológico e sua transmissão por Hemiptéros hematófagos; os reservatórios de virus na natureza; sua atividade patogénica para os animais de laboratório, traduzindó-se no homem por quadros clínicos complexos, — tais foram em grandes linhas os conhecimentos com que enriqueceu a Ciência um único pesquisador.

Outros autores estudaram a biología do *Schizotrypanum cruzi* e os processos patogénicos da «Doença de Chagas», contribuindo poderosamente para a solução de certos problemas: E. Brumpt, Gaspar Vianna, Mayer e Rocha Lima, Eurico Villéla, Arthur Neiva, Magarinos Torres e Souza Campos foram os que mais concorreram para ampliar a grande obra de Chagas.

Nossos estudos sobre o agente etiológico da tripanosomiase americana foram iniciados nas últimas semanas de 1929, quando trabalhavamos com o Dr. José Gomes de Faria no Laboratório do Hospital Arthur Bernardes, em material que nos foi bondosamente cedido pelo Professor Chagas.

Em 1930 continuámos nossos trabalhos, já então no Instituto Oswaldó Cruz dirétamente orientado por este pesquisador, onde e com quem temos trabalhado até agora. Melhores condições não poderíamos ter encontrado para a realização de semelhantes estudos, e deles muito mais seria de esperar, não fossem também imprescindíveis ao trabalho experimental qualidades pessoais que só se adquirem em longos anos de lida contínua no laboratório.

Réunimos nesta publicação, que apresentamos como Tése de Doutoramento á Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, os principais dados que pudemos adquirir no estudo do tripanosoma de Chagas, alguns dos quais já se acham referidos em publicações anteriores. Para satisfazer aos requisitos de uma Tése, o presente trabalho representa apenas uma série de resultados experimentais e de observação por nós obtidos; não é um trabalho de conjunto, em que estudamos metódicamente a Tripanosomiase americana, desde a biología do agente patogénico e dos inséto transmissores até as expressões clínicas e a terapeutica da

doença humana. Seus capitulos concernem os aspétos da biologia do *S. cruzi* que foram por nós mais detalhadamente estudados, sucedendo-se em ordem mais ou menos arbitraria sem haver entre eles, necessariamente, estreita correlação.

Nestes «Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*» consideraremos em primeiro lugar as relações do parasito com o hospedador Vertebrado, em condições experimentais; em seguida, sua evolução em Invertebrados, transmissores naturais ou não; os métodos de transmissão da doença; o cultivo artificial do flagelado *in vitro* e na cavidade geral do *Triatoma megista*. Por fim, relataremos algumas observações e experiencias feitas no primeiro fóco conhecido da enfermidade e anexaremos uma contribuição ao estudo de um flagelado do mesmo genero, parasito de morcêgos, muito semelhante ao *S. cruzi*.

Os assuntos de que tratamos acham-se expostos segundo a ordem indicada no index que se segue. Naturalmente, o titulo de cada capitulo ou seção não importa no estudo desenvolvido da materia correspondente, compreendendo uns, a respeito, mesmo, apenas ligeiras referencias. Damos, quando possivel, os principais resultados das pesquisas anteriores, focalizando aspétos de cada problema, e relatando experiencias nossas que possam contribuir para sua elucidação. Estas experiencias são em geral, pouco numerosas; mas, não poderíamos estudar a fundo todos os interessantissimos fátos que se apresentam na biologia do *S. cruzi*. muitos ficam ainda na obscuridade, reclamando novas pesquisas.

Ao Professor Chagas devemos a realização de nossos trabalhos. Além do auxilio imprecindivel de sua orientação científica e dos beneficios de um estimulo constante, encontrámos no seu laboratorio todo o material necessario á experimentação.

Durante nossos estudos tivemos tambem o recurso inestimavel do contrôle seguro e dos bons ensinamentos do dr. Eurico Villela.

Ao Professor Chagas e ao Dr. Villela exprimimos a nossa maior gratidão pelo muito que lucrámos de sua sabedoria e de seu altruismo.

Ao Dr. Gomes de Faria, nosso primeiro mestre, manifestamos nosso sincero reconhecimento pela longa iniciação técnica que lhe devemos.

Meus agradecimentos tambem aos técnicos deste Instituto, Snrs. J. Pinto, photo-micrographo, e Antonio Pugas, desenhista, a cujos serviços devemos as ilustrações deste trabalho, e ao Snr. Raul de Avellar Alves, administrador do Hospital Oswaldo Cruz, que sempre nos acompanhou a Lassance, e cuja experiencia muito nos aproveitou.

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Novembro 1933.

INDICE DAS MATERIAS

I) *S. cruzi* no organismo do vertebrado

EVOLUÇÃO INICIAL DA INFECCÃO EXPERIMENTAL

Distribuição dos parasitos no organismo
Inoculação de fórmulas sanguícolas:
Passagem para o sangue
Duração da fase sanguínea inicial; período de incubação
Infectividade durante a fase sanguínea inicial
Morfologia dos parasitos no sangue e nos tecidos
Inoculação de tripanosomas metacíclicos;
Distribuição segundo a via de inoculação.

MARCHA GERAL DA INFECCÃO

Evolução
Sensibilidade dos animais
Virulência
«Raças» de *S. cruzi*, genealogia.
S. cruzi no sangue
S. cruzi nos tecidos, Sistema Reticulo Endotélial:
Localizações nas células do SRE e outras
Adaptação do *S. cruzi* e outros protozoários ao SRE
Afinidade pelo SRE e galvanotropismo
Mecanismo de penetração do parasito nas células
Papel de defesa do SRE:.
Esplenectomias
Bloqueios

IMUNIDADE

Imunidade adquirida:
Desaparecimento dos parasitos do sangue
Reinoculações, recidivas
Ação protetora do soro de animais imunes
Anticórpas
Imunidade natural
Animais de sangue frio
Animais de sangue quente

II) *S. cruzi* no organismo do invertebrado

TRITOMA MEGISTA

Material e técnica
Anatomia, histologia e fisiologia do aparelho digestivo
Ciclo evolutivo do *S. cruzi*:
Considerações gerais
Fase estomacal — Bacterioides

Fáse intestinal
Fáse rétal
Tubos de Malpighi
Glandulas salivares, cavidade geral

Dejeções:
Caractéres
Condições de eliminação
Origem, composição
Fórmias parasitarias
Significação

Infectividade das fórmias evolutivas:
Durante a incubação
Fórmias do estomago
Fórmias do duodeno
Fórmias do réto

CIMEX LECTUARIUS

Evolução do *S. cruzi*
Infectividade e transmissibilidade

TRANSMISSÃO ENTRE INVERTEBRADOS

Transmissão hereditaria
Canibalismo
Coprofagia
Considerações gerais

III) Transmissão do *S. cruzi* do invertebrado ao vertebrado

Transmissão por inoculação
Transmissão por picada
Transmissão pelas dejeções
Penetrabilidade
Considerações gerais

IV) Cultura in vitro e na cavidade geral

Cultura:
Aparecimento de metaciclicos
Infectividade, inoculações
Fórmias do insêto
Cavidade geral:
Inoculação de fórmias do sangue
Inoculação de fórmias do insêto

V) Pesquisas in natura

Relatório de estadia em Lassance
Animais infectados
Schizotrypanum de morcêgo.

Schizotrypanum cruzi **no organismo do vertebrado**

EVOLUÇÃO INICIAL DA INFECCÃO EXPERIMENTAL

Trataremos em primeiro logar da distribuição inicial dos parasitos durante as primeiras fáses da infecção, acompanhando as modificações morfológicas do *S. cruzi* e suas relações com o organismo parasitado, desde o momento da inoculação. Sobre este assunto publicámos anteriormente uma nta prévia (1932) em que nossas conclusões foram parcialmente expostas.

Segundo o material inoculado provenha de animaes infectados ou de triatomas parasitados, é variavel a distribuição inicial dos tripanosomas no animal injetado; consideraremos primeiramente o que se passa logo após a inoculação de sangue infectado, por diversas vias.

Passagem para o sangue — E. Villela, trabalhando com coelhos novos, em experiencias não publicadas, observou que em pouco tempo os parasitos inoculados podiam ser encontrados no sangue periferico. E. Brumpt (1912) faz referencia á passagem de fórmas largas do tripanosoma para a torrente circulatoria « em algumas horas ». A rapida passagem para o sangue pode ser facilmente verificada em animais de pequeno tamanho, principalmente quando é grande o numero de parasitos inoculados. — Injetando pequenos cães e examinando seu sangue com curtos intervalos, observámos que aí podiam se encontrar tripanosomas 40 minutos após a inoculação subcutanea (cão de 795 gr.) e

165 minutos após a inoculação intraperitoneal (cão de 720 gr.). C. Chagas Filho em experiencia inédita verificou também a rápida passagem para o sangue em gatinhos inoculados na massa encefalica.

Os tripanosomas que se encontram na circulação desde as primeiras horas, com a morfologia das fórmulas finas ou das fórmulas largas, podem ali permanecer por varios dias, não migrando para os tecidos não se dividindo no sangue: constituem uma fase da infecção a que propuzémos chamar-se « fase sanguinea inicial ».

Duração da fase sanguinea inicial; periodo de incubação.

Inoculando-se sangue rico em tripanosomas em animal novo, alguns deles, como dissemos, passam em pouco tempo para a torrente circulatoria, onde podem ser encontrados pelo exame a fresco nos dias subsequentes, sempre em pequeno numero mais ou menos constante. Geralmente no 5.º dia depois da inoculação nota-se um acréscimo sensível no numero de flagelados no sangue periferico; é então que começa, a verdadeira fase sanguinea da infecção, caracterizada pelo augmento crescente do numero de parasitos, pela chegada daqueles resultantes da multiplicação intracelular. Pelo fáto que acabamos de expôr, não se póde avaliar a duração do periodo de incubação nas infecções obtidas por inoculação de sangue contaminado pelo simples aparecimento de tripanosomas no sangue circulante do animal inoculado; achamos que se deve considerar como marcando o fim do periodo de incubação o apparecimento na circulação dos tripanosomas recémformados nos tecidos, que determina um aumento numerico sensível dos parasitos no sangue.

Nos diversos animaes inoculados com sangue muito infectado o periodo de incubação, avaliado segundo este criterio, foi em geral de 5 dias. Não se deve esquecer de que estas verificações não têm significação pratica senão no caso de pequenos animais inoculados com sangue rico em parasitos; experimentando-se com animaes de grande peso é sempre difficil a determinação de tripanosomas pelo exame diréto do sangue nos primeiros dias, a menos que se tenha injectado grande numero de parasitos. O periodo de incubação está sujeito naturalmente a variações segundo a resistencia do animal e a virulencia e o numero de parasitos inoculados; sua duração para cada animal tem sido avaliada dentro de limites bastantes amplos por diversos autores, sendo a existencia da fase sanguinal inicial uma das causas capazes de falsear a sua avaliação. Quando se inocula pequeno numero de parasitos não se observa a fase sanguinea inicial, ou

porque não exista realmente, ou, o que é mais admissível, porque escape á observação.

M. Torres (1922) verificou a presença precoce do *S. cruzi* na circulação semeando sangue de cobaia dois dias depois de inoculada.

Ignora-se quanto tempo os tripanosomas inoculados que passaram rapidamente para a circulação aí possam permanecer sem migrarem para os tecidos ou sem serem destruídos; já vimos que ahí se encontram até começar a invasão do sangue pelas fórmulas vindas dos tecidos, isto é, desde o primeiro ao quinto dia depois da inoculação. A permanência de flagelados no sangue periferico durante o « período de incubação » pôde ser attribuída seja á sua capacidade definitiva de migrar para os tecidos, seja á sua incapacidade provisoria. Para verificar a infectividade dos tripanosomas sanguícolas durante a fase sanguinea inicial fizemos as seguintes experiencias:

1)—Foi inoculado intraperitonealmente em 17-11-33 um camundongo branco com 2 c. c. de sangue de cobaia infectada. Diariamente, até o dia 21 do mesmo mez, retiravam-se deste camundongo, por secção da extremidade da cauda, 5-6 gotas de sangue que eram recebidas em sôro fisiologico citratado e inoculadas em outros camundongos, depois de verificada a presença de tripanosomas. O seguinte quadro resume os resultados obtidos:

QUADRO 1

Camundongo n.º	Data da inoculação	Resultados														
		22	27	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	16
1	18-II-33	†														
2	19-II-33	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3	20-II-33	.	--	--	--	--	--	--	+							
4	21-II-33	.	.	.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+

† morte

-- + exame de sangue negativo e positivo

. não examinado

Em vista dos resultados das inoculações dos dois primeiros dias, repetimos a experiencia nas seguintes condições:

2)—Em 8-V-33 foi inoculado um camundongo no peritonio e sob a pele do dorso com 2 c. c. de sangue de um cão no 21º dia de infecção (raça

de tatú, 1a. passagem). 24 e 48 horas depois de inoculado foram retiradas 5 gotas de sangue da extremidade da cauda deste camondongo e injetadas em mistura com sôro citratado em dois camondongos. Ambos se infectaram, tendo tido exames de sangue positivos 8 dias depois de inoculados.

— Por estas experiencias verificámos que durante toda a fase sanguinea inicial ha parasitos na circulação infectantes, isto é, capazes de se localizarem no interior de elementos anatomicos e ahí se multiplicarem.

— Morphologia dos parasitos no sangue e nos tecidos durante os primeiros dias.—No sangue de gatinhos recém-nascidos encontrámos 24 horas depois da inoculação tripanosomas de protoplasma irregularmente corado e com pequenas granulações de volutina. Estas alterações morfológicas, provavelmente degenerativas, não são constantes. No cão, nos primeiros dias, muitos tripanosomas têm a morfologia da chamada «fôrma fina». Nos tecidos, os diferentes estadios evolutivos intracelulares sucedem-se como na cultura ou no intestino do inséto (Chagas). Os parasitos multiplicam-se sob a fôrma de leishmania e passando pela fôrma de *critidia*, transformam-se em tripanosomas. A fase intermediaria de *critidia* tem curta duração; durante a mesma os flagelados ainda pôdem se dividir. As leishmanias reproduzem-se por divisões binarias simples e excepcionalmente por divisões multiplas. Em frottis de órgãos de animaes sacrificados durante a phase inicial de multiplicação encontrámos raras vezes massas protoplasmaticas encerrando dois ou mais grupamentos de nucleo-blefaroplasto.

O ciclo intracelular completo, de tripanosoma a tripanosoma, dura em geral 5 dias durante as primeiras fases da infecção aguda. Dentro do mesmo elemento celular os parasitos estão no mesmo estadio evolutivo (Mayer e Rocha Lima, 1912).

Inoculação de tripanosomas metaciclicos — Quando se inoculam pequenos animais com certas dejeções de triatomas, muito ricas em tripanosomas metaciclicos, não se verifica o aparecimento de parasitos na circulação senão depois de decorrido um certo numero de dias, variavel de 8 a 11 em média. Confirmamos as observações de Brumpt (1927) segundo as quais, nos animais inoculados com fôrmas metaciclicas do inséto, os tripanosomas não aparecem no sangue pouco depois, ao contrario do que acontece com aqueles inoculados com as fôrmas sanguicolas do *S. cruzi*. Nos animais injetados com dejeções ou conteúdo intestinal de barbeiros infectados o aparecimento dos primeiros parasitos na circulação assinála o fim do periodo de incubação. A inexistencia de uma fase sanguinea inicial nos animais assim infectados é explicavel pela grande afinidade que os tripanosomas metaciclicos têm por certos elementos dos tecidos e pela sua grande capacidade de penetração. A permanencia destas fôrmas no sangue será muito rapida, não tendo sido por nós ainda verificada. Lafont

(1912), inoculando conteúdo intestinal de *Triatoma rubrofasciata* muito rico em tripanosomas, no peritonio de camondongos, observou o aparecimento de parasitos no sangue 6, 30, 48 horas, 3 e 7 dias depois da inoculação. Em camondongos brancos inoculados com *S. cruzi* proveniente de *Triatoma megista*, Brumpt e P. da Silva (1912) verificaram um periodo de incubação de 5 dias.

—Distribuição inicial dos parasitos nos tecidos segundo a via de inoculação.—De um modo geral, qualquer que seja a via de inoculação, quando se injeta em animal novo sangue de um animal infectado, sempre se observa a passagem mais ou menos rapida de alguns tripanosomas para o sangue do primeiro; a maioria porém ganha os tecidos, quer directamente, quer por vehiculação pelo sangue. A localização nos tecidos é mais rapida e quasi sempre dirêta quando se inoculam fórmias metacíclicas do *S. cruzi*.

Via subcutanea.—Os parasitos localizam-se principalmente no interior de elementos do ponto de inoculação e vizinhanças, onde se multiplicam intensamente. No caso de inoculação de fórmias sanguícolas, dos tripanosomas que passam para a circulação alguns se localizam em diversos órgãos, enquanto que outros permanecem no sangue determinando a fase sanguínea inicial. As seguintes observações mostram a importancia do ponto de inoculação como foco de proliferação inicial:

Cão de 795 gr. inoculado sob a pele com sangue de cão bastante infectado (*S. cruzi*, raça humana, 21º dia de infecção). Exames de sangue feitos diariamente, positivos desde 40 minutos após a inoculação; a infecção sanguínea aumentou no 5.º dia, quando foi sacrificado.

Nos frottilis de varios órgãos encontravam-se fórmias sanguícolas, e leishmanias sempre em pequeno numero; baço-raras leishmanias isoladas ou raramente em pequenos grupos de 4-6. Fígado-fórmias sanguícolas e muito raras leishmanias. Ganglio periferico-leishmanias mais frequentes embora em pequeno numero; tripanosomas e fórmias de evolução intermediarias (critídias). Musculo do ponto de inoculação—numerosas fórmias de evolução, tripanosomas finos. Líquido de edema do ponto de inoculação — rico em fórmias flageladas e de evolução. Líquido peritonial — a fresco e corado, após centrifugação, raros tripanosomas. Medula ossea — femur-raras leishmanias. Sangue-tripanosomas normaes (fórmias finas) não muito numerosos. Exame dos córtes.—Ponto de inoculação e adjacencias-(musculo da coxa e tecido sub-cutaneo)-grande numero de celulas repletas de leishmanias, bem como uma fibra muscular estriada; em alguns córtes as cellulas peri-musculares são raramente parasitadas ao passo que grande numero de celulas do tecido conjunctivo frouxo contém leishmanias, Estampa 1, fig. 2; em outros as celulas peri-musculares estão também intensamente parasitadas. Ganglio, raras celulas do reticulo bem parasitadas. Nos córtes de baço, fígado, coração, pulmão, cerebro e cerebello não encontrámos elementos parasitados.

Camondongo adulto inoculado com sangue infectado em 1-XI-32, subcutanea e intraperitonealmente; exames de sangue positivos nos dias 4, 5, 6 (fórmãs finas), 7, sacrificado a 9 do mesmo mez. Frottis: ponto subcutaneo inoculado-leishmanias e tripanosomas. Peritonio (raspagem)-muito raras leishmanias. Baço, negativo; figado-tripanosomas sanguicolas. Córtes: Ponto de inoculação-numerosas celulas parasitadas no tecido conjuntivo subcutaneo e entre os feixes musculares; não encontrámos leishmanias no interior de fibras musculares. Não achamos celulas parasitadas nos córtes de baço, testiculo e cerebro.

Camondongo adulto inoculado sob a péle em 1-XI-32 com dejeções limpidas muito infectadas de *T. megista*. Exames negativos de sangue 5, 6, 7, positivo 8-XI-32; sacrificado no dia 9. Frottis: raras leishmanias. Baço, figado e testiculo, negativos. Córtes-Ponto de inoculação-celulas relativamente pouco numerosas repletas de parasitos (leishmanias ou tripanosomas); celulas de parede de vaso parasitadas. Entre os feixes musculares e no tecido sub-cutaneo nota-se um exsudato rico em monocitos e polimorfonucleares; não vimos leishmanias dentro de fibras musculares. Nos córtes de coração, baço, cerebro, testiculo, pulmão e intestino delgado, não encontrámos parasitos.

Cão de 1200 gr., macho, inoculado (13-X-32) em varios pontos do tecido sub-cutaneo (sob os mamilos) com dejeções limpidas de *T. megista* muito ricas em tripanosomas metaciclicos: Exames de sangue negativos em 14, 15, 17, 18, positivo em 24-X-32 (tripanosomas relativamente numerosos). Retirámos e incluímos pequenos fragmentos de tecido dos pontos inoculados 5, 11 e 16 dias depois da inoculação, em cujos córtes encontrámos celulas parasitadas cada vez mais numerosas quanto maior o tempo decorrido desde a inoculação. Nos pontos em que eram feitas as biópsias formavam-se ulceras que não cicatrizavam, nos esfregaços e córtes das quaes encontrámos leishmanias. O animal morreu em 4-XI-32 com intensa infecção sanguinea. Nos órgãos havia numerosos parasitos: Coração (miocardite), baço, figado, ganglio periferico, supra-renal, testiculo, pulmão, musculos estriados, ulceração do ponto de inoculação retirado no 11º dia. Nos frottis de medula ossea encontrámos leishmanias.

—Via intraperitoneal.—Os parasitos inoculados desaparecem pouco a pouco da cavidade, passando para o sangue e para os tecidos, não se encontrando mais fórmãs livres depois de 24 horas (cão); mais tarde podem-se encontrar aí tripanosomas, provenientes da multiplicação nos tecidos. Nota-se desde as primeiras horas o aparecimento no liquido peritonial de elementos celulares emigrados do sangue, aos quais frequentemente adérem tripanosomas; a fagocitose entretanto é um fáto excepcional (cão, 6 horas).

Nos animaes inoculados com *S. cruzi* por outras vias menos correntemente empregadas, como a intra-raquiana e a intra-ocular, observa-se igualmente a penetração e multiplicação de parasitos em elementos das regiões injetadas, como se vê pelas seguintes experiencias:

Cão de 1200 gr., inoculado em 16-XI-32 com pequena quantidade de urina hialina de triatoma infectado, diluída em água fisiológica. A inoculação, realizada por punção sub-occipital, foi feita pelo Dr. E. Villela. O sangue foi examinado com resultado negativo nos dias 21 e 22; em 24-XI-32 foram encontrados raros tripanosomas (fórmulas finas em menor número do que os existentes no liquor retirado neste mesmo dia por punção sub-occipital. No dia seguinte o cão apresentava convulsões e sinais de paralisia, tendo sido então sacrificado. Nos cortes de bulbo e medula espinhal encontramos focos parasitários esparsos, que não foram vistos no cérebro. Outros órgãos não foram examinados.

Gatinho inoculado pelo Dr. E. Villela em 9-IV-32, na câmara anterior do olho, com sangue (citratado e centrifugado) de um cão morto no 22º dia de infecção pelo *S. cruzi*, raça humana. O animal morreu 13 dias depois de inoculado, tendo tido exame de sangue negativo no 4º dia e positivo no 11º dia. No humor aquoso do olho inoculado havia tripanosomas relativamente abundantes, quando morreu; no humor vítreo não achamos parasitos. Nos cortes do olho viam-se numerosos elementos do tecido conjuntivo, córnea e íris parasitados. 2 ou 3 dias depois da inoculação a córnea se apresentava opacificada.

Quanto à via de inoculação sanguínea não há nada de particular a ser assinalado. A maioria dos parasitos se localiza em diversos órgãos, enquanto que alguns permanecem na circulação ocasionando a fase sanguínea inicial, no caso da inoculação de tripanosomas sanguícolas.

Pelas experiências que acima referimos vê-se que, de uma maneira geral, qualquer que seja a via de inoculação utilizada, tanto as formas sanguícolas como as formas metacíclicas do *S. cruzi* têm histotropismo muito acentuado, principalmente estas. Penetrando em elementos celulares dos pontos de inoculação e multiplicando-se ativamente, aí constituem a principal sede de sua proliferação inicial.

MARCA GERAL DA INFECÇÃO

Os tripanosomas resultantes da multiplicação intracelular caem na circulação e se espalham por todo o organismo, localizando-se em elementos celulares dos diversos órgãos, onde novamente se multiplicam. A infecção pôde evoluir agudamente, pelo aumento crescente e rápido do número de parasitos nos tecidos e no sangue, terminando pela morte do animal, ou tornar-se crônica após uma fase sanguínea mais ou menos intensa e de duração variável.

Quanto à presença de parasitos no sangue periférico há nitida diferença entre as infecções humanas e as dos animais de laboratório. Ao passo que naquelas os tripanosomas só podem ser encontrados pelo exame directo do sangue, e geralmente em pequeno número, durante os primeiros dias de molestia, nestas, ao contrario, podem ser facilmente encontrados pela mesma maneira durante longo tempo (Chagas).

O gráu de infecção bem como a persistencia de parasitos na circulação de animaes experimentalmente infectados é muito variavel para cada especie de animal sensível e mesmo para individuos da mesma especie, ainda quando inoculados com material infectante de igual procedencia.

Os dados mais minuciosos a este respeito, actualmente existentes, são referidos por H. C. Clark e L. H. Dunn (1932), que acompanharam cuidadosamente a infecção em diversos animaes inoculados com *S. cruzi* de virulencia atenuada, de diferentes origens.

Os animais mais sensíveis á infecção, segundo Chagas, são os cães e gatos jovens, cobaias e macacos do genero *Callithrix*. Nas nossas experiencias temos nos utilizado principalmente de cães, nos quaes a infecção é em geral mais intensa que nas cobaias. Os camondongos brancos tambem se prestam muito á experimentação com o *S. cruzi*. Os animaes jovens são mais sensíveis á infecção (Chagas).

Tanto nos casos cronicos da tripanosomíase americana, como nos animaes que já não têm infecção sanguinea apreciavel, os parasitos pôdem por muito tempo conservar-se nos tecidos sob a fórma de leishmania, vivos e áttivos; este fáto explica a presença ocasional de tripanosomas no sangue de enfermos cronicos, do qual pôdem ser isolados por inoculação (Chagas), e os casos de recidivas algumas vezes observados em animaes (Mayer e R. Lima, Blanchard).

A marcha da infecção dos animaes de laboratorio é tambem muito variavel, naturalmente, segundo a virulencia do *S. cruzi*, que por sua vez varia conforme a origem do parasito. As amostras mais patogenicas de *Schizotrypanum* tem sido as isoladas em Lassance (Minas Gerais), onde este parasito é grandemente espalhado. Em outros paizes das Americas, em que foi encontrado, sua patogenicidade para o homem e para os animaes é em geral fraca.

A raça mais virulenta para animais de laboratorio é a proveniente do tatú, nos quaes produz intensas infecções que rapidamente terminam pela morte, principalmente em cães jovens (Chagas).

Durante nossas estadías em Lassance tivemos ocasião de isolar varias amostras de *S. cruzi* de animaes portadores de infecção natural, tatús, cães e gatos. Os quadros anexos, que representam a « genealogia » (Schilling) de duas raças de cão e uma de tatú, mostram a grande virulencia destas raças para o cão. As datas da morte dos animaes que figuram nestes quadros nem sempre apresentam o termo natural da infecção; alguns eram sacrificados para experiencias ou sangrados no coração para passagens, mas sempre com grande numero de tripanosomas no sangue periferico.

QUADROS 2 e 3
Amostras de S. Cruzi isoladas de cães com infecção natural em Lassance (Abril 1933)
Cão da caféia de Argemiro
Cão da caféia de Geremias

Passagem	Animal inoculado	Sangue infectado de	Data da inoculação	Data da morte	Dias de infecção	Passagem	Animal inoculado	Sangue infectado de	Data da inoculação	Data da morte	Dias de infecção
1a.	Cobaia	Cão	17-IV	20-V	33	1a.	Cobaia	Cão	3-IV	17-IV	14
	ε	ε	ε	26-V	39		ε	ε	ε	9-IX	150
	ε	ε	ε	5-VIII	109		ε	ε	7-IV	28-IV	21
	ε	ε	ε	13-V	26		ε	ε	28-IV	17-V	19
	ε	ε	ε	ε	ε		ε	ε	ε	19-VI	52
	ε	ε	ε	ε	ε		ε	ε	15-V	7-VI	23
2a.	Cão	ε	12-V	8-VI	26	3a.	Cão	Sagui	31-V	12-VI	12
	ε	ε	13-V	27-V	14		ε	ε	ε	22-VI	12
	ε	ε	ε	ε	20		ε	ε	12-VI	23-VI	22
	ε	ε	8-VI	28-VI	23		ε	ε	ε	24-VI	11
3a.	ε	ε	ε	1-VII	17		ε	ε	ε	25-VI	12
	ε	ε	26-VI	13-VII	ε		ε	ε	23-VI	ε	—
4a.	ε	ε	ε	ε	ε		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	1-VII	2-VIII	32		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	9-VIII	39		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	24-VIII	11		ε	ε	ε	ε	—
5a.	ε	ε	13-VII	24-VII	12		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	25-VII	ε		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	2-VIII	12-VIII	10		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	ε	ε		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	12-VIII	26-VIII	14		ε	ε	ε	ε	—
6a.	ε	ε	ε	11-IX	16		ε	ε	ε	ε	—
7a.	ε	ε	26-VIII	11-IX	21		ε	ε	ε	ε	—
8a.	ε	ε	11-IX	2-X	22		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	3-X	8		ε	ε	ε	ε	—
9a.	ε	ε	29-IX	7-X	8		ε	ε	ε	ε	—
10a.	ε	ε	5-X	13-X	ε		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	6-X	ε		ε	ε	ε	ε	—
11a.	ε	ε	13-X	14-X	ε		ε	ε	ε	ε	—
	ε	ε	ε	16-X	ε		ε	ε	ε	ε	—

(2)

(3)

QUADRO 4

Amostra de *S. Cruzi* isolada de tatú com infecção natural (Lassance, Abril 1933)

Passagem	Animal inoculado	Sangue injectado de	Data da inoculação	Data da morte	Dias de infecção
1a.	Cobaia	Tatú	17—IV	22—VIII	127
	Cão	«	« «	10—V	23
2a.	«	Cão	8—V	27—V	19
	«	Cobaia	14—VI	22—VI	8 (?)
	«	«	23—VI	?	?
	«	«	« «	?	?
3a.	«	Cão	27—V	6—VI	10
	«	«	« «	« «	«
	«	«	5—VII	21—VII	16
	«	«	« «	?	?
4a.	«	«	21—VII	29—VII	8
	«	«	« «	1—VIII	11
5a.	«	«	29—VII	9—VIII	11
	«	«	« «	10—VIII	12
	Cobaia	«	1—VIII	—	—
	«	«	« «	—	—
6a.	Cão	«	10—VIII	23—VIII	13
	«	Cobaia	29—VIII	13—IX	15
7a.	«	Cão	12—IX	19—IX	7
	«	«	« «	24—IX	12
8a.	«	«	21—IX	3—X	12
9a.	«	«	27—IX	5—X	8
	«	«	« «	6—X	9
10a.	«	«	5—X	14—X	9
	«	«	« «	17—X	12
11a.	«	«	17—X	26—X	—
	«	«	« «	—	—
12a.	«	«	26—X	—	—

Duas amostras que tivemos no laboratorio isoladas de gatos eram de virulencia muito menor. As infecções obtidas por inoculação de sangue humano são em regra pouco intensas; actualmente existem no laboratorio do Dr. Chagas duas raças isoladas de doentes trazidos de Lassance, ainda com poucas passagens, que continuaremos a estudar. As inoculações de dejeções ou conteúdo intestinal de *T. megista* parasitados determinam infecções de evolução muito variavel, em geral graves.

Qualquer que seja o material infectante utilizado, a intensidade da infecção depende muito do numero de parasitos inoculados. Por varias vezes temos conseguido fortes infecções fazendo inoculações subcutaneas em diversas regiões do mesmo animal, ou fazendo passagens do sangue de animaes pouco dias depois de começarem á augmentar os parasitos no sangue.

Passagens sucessivas de animal a animal pódem inicialmente aumentar a virulencia do tripanosoma, mas parece que em geral a virulencia decréce muito após grande numero de inoculações, como algumas vezes temos observado.

— Estudaremos a seguir diversos aspétos do *S. cruzi* no sangue e nos tecidos dos animaes parasitados, depois de estabelecida a infecção.

S. cruzi no sangue: — Os parasitos se apresentam no sangue circulante muitas vezes sob aspétos morfologicos bem caracterizados (Chagas): flagelados delgados e longos, de nucleo alongado e movimentos muito ativos, ou largos, de plasma abundante, nucleo ovoide e movimentos de translação lentos.

Segundo Chagas o *S. cruzi* é dotado de diferenciação sexual, que se traduz nos tripanosomas adultos pelo seu dimorfismo, sendo as fórmas finas o elemento masculino (microgameto) e as fórmas largas o elemento feminino (macrogameto).

Outros autores interpretam diversamente a variabilidade morfológica das fórmas sanguícolas dos tripanosomas. Breinl e Moore atribuem-n'a a estados de crescimento dos parasitos, considerando as fórmas finas as mais jovens. No caso do *S. cruzi* esta interpretação é acceita por Brumpt, Mayer e Rocha Lima, Magarinos Torres, etc. O fáto de aparecerem primeiro as fórmas finas no sangue periferico dos animais inoculados, e a existencia de fórmas intermediarias entre os dois typos extremos de flagelados, constituem os principais fundamentos desta interpretação, aliás já entrevista por Chagas (1909) conforme o assignalou Torres (1918). Este autor propõe, em seu trabalho, as designações de formas jovens e formas adultas do *S. cruzi* em substituição ás correntemente usadas de fórmas finas (fórmas delgadas, organismo filiforme) e formas largas.

Em nossas experiencias temos comumente observado o aparecimento das formas jovens na circulação antes das formas adultas, nas infecções obtidas por inoculação de material de barbeiros; nas inoculações de sangue contaminado, conforme assinalámos, encontram-se não raro parasitos jovens durante a fase sanguinea inicial, aumentando em numero ao começar a invasão do sangue pelas tripanosomas recémformados nos tecidos. Nos frottis de órgãos de animais injetados com sangue e sacrificados ao fim do periodo de incubação, encontram-se, ao lado de fórmas de evolução mais atrasadas, tripanosomas jovens, intracelulares ou não, morfologicamente muito semelhantes aos tripanosomas metacíclicos (gatinhos, 5 dias).

É sabido, que o *S. cruzi* não se divide no sangue; mas muito rara-

mente aí se encontram parasitos com sinâes de divisão (Chagas). No sangue periferico de uma cobaia esplenectomizada vimos uma vez um tripanosoma provido de dois nucleos e dois flagelos e blefaroplasto volumoso (fig. 1). Estas fórmas excepcionais devem provir de critídias que antes de terminar a divisão iniciaram sua transformação em tripanosoma, deixando prematuramente a situação intracelular; é mais admissível considera-las como individuos procedentes dos tecidos e de evolução incompleta, do que parasitos dividindo-se precocemente no sangue, destinados a terminar a divisão no interior dos elementos anatomicos.

Algumas vezes tem sido assignalada a presença de corpusculos leishmaniformes no sangue periferico de animais infectados pelo *S. cruzi*. Em esfregaço de sangue de cão muito infectado encontrámos uma vez um macrofago encerrando tres leishmanias; nunca vimos parasitos arredondados, sem flagello, livres no plasma sanguineo.

S. cruzi nos tecidos — Sistema reticulo-endotelial —

O *S. cruzi* é mais um parasito dos tecidos do que do sangue (Chagas). Dentro de certos elementos anatomicos este parasito toma a fórma de um corpusculo ovoide, de nucleo arredondado e blefaroplasto em fórma de bastonete, sem flagelo: é o corpusculo leishmanifórme ou *leishmania*, descoberto independentemente por Hartmann e Gaspar Vianna. A multiplicação intracelular se faz por divisões binarias sucessivas, havendo excepcionalmente divisão multipla de que resultam 4 ou mais individuos. As leishmanias, depois de se multiplicarem, passando transitariamente pela fórma de critídida, sob a qual ainda se pódem dividir, transformam-se em tripanosomas jovens que ganham a torrente circulatoria.

Desde os primeiros trabalhos em que se estudarem as localizações parasitarias nos tecidos do homem e dos animaes infectados pelo *S. cruzi* tem sido assignalada a existencia de fórmas de multiplicação deste flagelado no interior de celulas que hoje são reconhecidas como pertencentes ao sistema reticulo-entotélial. Mais recentemente, Souza Campos tem estudado as alterações de taes celulas ao decorrer da infecção experimental, e nós mesmo (1932) procurámos demonstrar a grande afinidade do *S. cruzi* pelos elementos deste sistema organico.

Estudaremos a evolução da infecção nos animaes de laboratorio, principalmente o cão, considerando a distribuição dos parasitos e suas relações com o sistema reticulo-endotelial:

— Como já foi referido precedentemente, os tripanosomas inoculados penetram em grande numero nas celulas do ponto de inoculação,

que constituem inicialmente a séde de multiplicação mais importante, localizando-se depois, com a progressão da infecção, em outros órgãos, onde também se acumulam em grande quantidade. Em cães inoculados sob a pele com sangue de animal infectado, encontram-se poucos dias depois da inoculação numerosas células do « reticulo-periferico » e clasmátocitos da região injetada cheios de parasitos (fig. 2). Entre as primeiras, chamamos a atenção especialmente para as células do reticulo sarcolemico dos musculos do esqueleto, pelo fáto de que algumas vezes os parasitos nelas contidos pódem ser tomados como localizados na propria fibra muscular, sendo em certos casos difficil determinar sua situação.

Nos primeiros dias de infecção quasi a totalidade das leishmanias do ponto inoculado estão no interior destas células e não na musculatura; porém, num cão sacrificado 5 dias depois da inoculação, já vimos parasitos no interior da propria fibra muscular. As células do ponto de inoculação mais frequentemente parasitadas são as células do tecido conjuntivo frouxo, clasmátocitos e células migradoras (fibrocitos?)¹

Os elementos reticulo-histiocitarios dos ganglios linfáticos vizinhos á região inoculada são também cedo invadidos pelos parasitos. Num cão morto no 12.º dia de infecção encontramos nestes ganglios perifericos numerosas células muito intensamente parasitadas (fig. 3-4).

Espalhando-se pelo organismo do vertebrado, o *S. cruzi* invade todos os territorios do sistema reticulo-histiocitario, parasitando numerosos de seus elementos, que são de um modo geral as células do reticulo dos órgãos hemolinfopoiéticos, as células do reticulo endotelial, as células do reticulo periferico, e os clasmátocitos, fibrocitos e células migradoras do tecido conjuntivo. As fórmulas de multiplicação são encontradas em quasi todos os órgãos, quasi sempre no interior dos elementos deste sistema. Os órgãos mais intensamente afetados, nos cães infectados experimentalmente, são o baço, o figado, os órgãos hemolinfopoiéticos e o coração.

O *S. cruzi* não é um parasito exclusivo do sistema reticulo-histiocitario. Entre as localizações deste protozoario em elementos extranhos a este sistema organico, a mais importante é a constituida pela musculatura estriada, compreendendo o coração e os musculos do esqueleto. As células do testiculo (Gaspar Vianna), a nevrogliá e algumas vezes os proprios neuronios (Souza Campos, E. Villela) têm sido encontrados com parasitos no seu interior. Assinalemos também a microglia, que segundo alguns aautores faz parte do sistema reticulo-histiocitario, e que

¹ Para esclarecimento da nomenclatura dos elementos do S. R. E., de que nos servimos, vêr M. Volterra (1927), G. Guglielmo (1933).

constitue uma das localizações do *S. cruzi* no sistema nervoso central de cães infectados (Villela e Villela, 1932).

A distribuição do *S. cruzi* nos órgãos do vertebrado pôde variar segundo circunstancias indeterminadas, que parecem depender mais do proprio parasito que no seu hospedador, pelo menos relativamente ao parasitismo do sistema reticulo-endotelial. Nas infecções produzidas pela raça de tatú a localização do *Schizotrypanum* nas celulas deste sistema é muito mais exclusiva: não temos encontrado leishmanias nas fibras cardiacas de cães senão excepcionalmente e nunca as vimos nas de cobaias infectadas por aquela raça. Nos tatús apanhados com infecção natural, os unicos elementos parasitados que temos verificado são os gigantocitos quisticos descritos por Torres e Penna de Azevedo e que, segundo estes autores, parecem originar-se de histiocitos perivasculares. O parasitismo das proprias fibras musculares, estriadas ou lisas, principalmente as do coração, é muito mais comum nos animais infectados com virus proveniente do homem ou do cão.

Segundo Chagas, o musculo cardiaco é séde de eleição do parasito nas infecções humanas. A respeito da predileção pelo coração temos interessante observação em cão por nós achado com infecção natural nos arredores de Lassance: ao passo que nos órgãos não foram encontradas leishmanias (baço, figado, pulmão, ganglio, intestino delgado), apesar de serem numerosos os parasitos no sangue, no coração existem em abundancia, incluidas nas fibras musculares e nas celulas do reticulo, havendo intensa miocardite intersticial. No coração também ás vezes é difficil julgar si os parasitos estão dentro destas celulas ou no proprio interior do elemento contrátil.

A preferencia de raças isoladas do tatú pelo sistema nervoso de cães experimentalmente infectados foi observada por Villela e Torres (1926) e Villela e Villela (1932); si bem que abundantes em diversos elementos do sistema nervoso central (macroglia, microglia, celulas neuronais, macrofagos, celulas perivasculares), as leishmanias eram raras ou ausentes no coração (1932). O acentuado neurotropismo dessas raças traduzia-se clinicamente por varios sintomas, nos cães, principalmente por paralisias.

Entre as localizações mais raras do *S. cruzi* citaremos a verificada por C. Chagas Filho (observação inédita) nos glomerulos renais de um cão infectado por uma amostra recentemente isolada do tatú. Nunca observámos fórmãs de multiplicação no interior de celulas parenquimatosas (figado, rim, supra-renal, etc.).

Segundo os resultados de Souza Campos, os elementos do SRE de cães com infecção congenita são também eletivamente parasitados.

— Em outras parasitoses em que o agente etiologico é também

estritamente adaptado ao SRE, tem sido igualmente verificada sua localização em elementos estranhos e este sistema. Assim, no Kala-Azar natural ou experimental, pôde-se encontrar células nobres parasitadas pela *Leishmania donovani*, embora raramente, no fígado, rim, glândula supra-renal, pâncreas (vêr Laveran 1917).

Gaspar Vianna (1914) observou a presença de parasitos nas fibras musculares de uma arteriola num caso de leishmaniose cutânea (*Leishmania brasiliensis*), fato este que não foi novamente observado, a nosso conhecimento.

O *S. cruzi* é menos estritamente adaptado ao SRE do que os parasitos do genero *Leishmania*, e sua distribuição no organismo do vertebrado muito mais geral do que a destes protozoários, no caso de infecções agudas. Este fato é explicável si se considera a existência, na tripanosomiase, de intensa infecção sanguínea produzida por formas flageladas extracelulares, o que não ocorre nas leishmanioses. Na leishmaniose visceral, em que a presença de parasitos aflagelados no sangue é muito frequente, as relações das leishmanias com o SRE e sua distribuição no organismo assemelham-se bastante ás do *S. cruzi*, principalmente pelas suas afinidades pelo SRE.

A grande afinidade do *S. cruzi* pelo SRE traduz-se pela penetração precoce do parasito em seus elementos, seguida de intensa multiplicação e posterior invasão de todos os distritos do sistema. Conforme a raça do tripanosoma e sua virulência, como vimos, varia a distribuição dos parasitos no organismo, mas sempre se observa sua tendência a invadir os elementos reticulo-histiocitários. Acreditamos ser o *S. cruzi* um parasito primitivo do SRE, posteriormente adaptado e ainda com diversos graus de adaptação a elementos não pertencentes a este sistema.

A propósito da afinidade do *S. cruzi* pelo SRE é interessante recordar as experiências de Szent-Gyorgyi (1921) sobre galvanotropismo de diversos microorganismos. Este autor verificou que o *S. cruzi* e a *L. donovani* são anódicos, isto é, comportam-se num campo eléctrico como os colóides electro-negativos; são justamente os que têm afinidade pelo SRE. Os tripanosomas sanguíneos, não histoparasitos (*T. brucei*, *T. gambiense*, *T. rhodesiense*, *T. equiperdum*) são catódicos. O *T. theileri* é anódico (tecidos?)².

Relativamente ao mecanismo de penetração do *S. cruzi* nas células reticulo-histiocitárias, tudo leva a crêr tratar-se de um processo ativo por parte do parasito, considerando-se sua grande penetrabilidade através

² Vêr M. Carpano, 1932.

os tegumentos e sua capacidade de se alojar no interior de fibras musculares e outros elementos incapazes de um englobamento ativo. As células do SRE não exercem uma ação « fagocitária » sobre os tripanosomas, mas são por eles penetradas; aliás, segundo a teoria de Schulemann, mesmo o englobamento de agentes inanimados não seria um processo ativamente exercido por estas células, mas sim um fenómeno físico principalmente (vêr R. Freund 1933).

— Conhecidas as afinidades biológicas do *S. cruzi*, é de crêr que um tratamento eficaz da doença de Chagas só poderá ser conseguido por um agente terapeutico coloidal.

A expressão anatomo-pathologica do parasitismo do SRE pelo *Schizotrypanum* é constituída principalmente pela hipertrofia e hiperplasia de seus elementos.

Papel defensivo do SRE na infecção pelo *S. cruzi*.

A estrita adaptação de certos parasitos (*Schizotrypanum*, *Leishmania*) aos elementos reticulo-histiocitarios, que representam no organismo a séde de eleição de suas localizações e de sua multiplicação, parece indicar por si mesma que nenhuma ação protetora contra eles exerce o « sistema de defeza fagocitaria ».

No inicio da infecção, como vimos, a penetração do *Schizotrypanum* nas células de origem mesenquimatosa é seguida de intensa multiplicação; terminada a evolução, sem que haja sinais de degeneração, os parasitos passam para o sangue, invadindo depois os órgãos, em cujas células se introduzem e evoluem do mesmo modo. Quando a molestia progride agudamente, terminando pela morte, é enorme a quantidade de células do SRE e outros elementos parasitados; passando á cronicidade, pela diminuição ou desaparecimento dos tripanosomas da circulação, encontram-se nos tecidos de homens e animaes aparentemente restabeleciidos células reticulo-endoteliais encerrando leishmanias, ás vezes longo tempo depois de decorrida a fase sanguinea da infecção.

Estes fatos mostram que o SRE não exerce nenhuma ação defensiva diretamente, isto é, por destruição imediata dos parasitos contidos em seus elementos. Possivelmente o SRE intervirá indiretamente, mediante a formação de anticorpos especificos, na defesa do organismo contra o *S. cruzi*; mas mesmo esta intervenção no estabelecimento da imunidade humoral na tripanosomiase americana ainda carece de demonstração. Si as experiencias em animaes esplenectomizados pôdem ser tomadas como conclusivas, dever-se-á admitir como não existente a participação deste sistema na formação de anticorpos, na referida infecção.

—A existencia de uma ação protetora tem sido demonstrada em diversas infecções. Para se comprovar experimentalmente a ação defensiva deste sistema são geralmente empregadas duas tecnicas, por meio das quaes procura-se conseguir uma relativa paralisação, ou realiza-se uma restrição numerica de seus elementos. No primeiro destes processos empregam-se os chamados «bloqueios» por meio de agentes diversos; no segundo faz-se a extirpação do baço, órgão que representa importante territorio do SRE.

Submetido o animal a qualquer destas tecnicas, ou a ambas ao mesmo tempo, verifica-se depois sua resistencia a determinado germen, comparativamente á de animaes integros. Tem-se estudado tambem a capacidade de produção de anticorpos em animaes assim tratados, com o fim de elucidar o possivel papel do SRE na sua formação. Kurotchkin e Chung (1930) verificaram que a formação de aglutininas em animaes experimentalmente infectados pela *Leishmania donovani* ou bloqueados por agentes inanimados, era consideravelmente menor que nos animais normais.

As tecnicas de bloqueio e esplenectomia não representam meio bastante seguro para a investigação de certos problemas, pois as alterações sofridas por organismos a ellas submetido não poderão ser atribuidas exclusivamente ás modificações sofridas pelo sistema reticulo-histiocitario.

Esplenectomias.—Alguns autores estudaram a marcha da infecção pelo *S. cruzi* em animaes privados de baço. Kritschewski e Schwarzmann (1928) não observaram nenhuma modificação nas infecções em camundongos esplenectomizados depois de aparecerem os tripanosomas no sangue periferico. Nieschulz e W. Rontze (1930), retirando o baço de cães varios dias antes da inoculação, chegaram tambem á conclusão de que o SRE não exerce ação protetora nessa infecção. H. Galliard (1930) verificou que pela inoculação do *S. cruzi* a animaes esplenectomizados, ou pela ablação do baço durante o curso da infecção, não se consegue modificar de modo sensível o curso desta, parecendo que os camundongos operados contraem mais rapidamente a imunidade que os normaes. Este autor não obteve infecção mortal em ratos operados, inoculando raças virulentas de *S. cruzi*. P. Regendanz (1930) tambem trabalhando com ratos adultos esplenectomizados não verificou diminuição de sua resistencia; segundo informação verbal deste pesquisador, em numerosas experiencias inéditas que fez com Kikut, não foi constatada nenhuma alteração na marcha da infecção pelo *S. cruzi* em camundongos, cães e cobaias operadas. Pelas experiencias de Kofoid e Donat (1933) a extirpação do baço parece favorecer o aparecimento dos parasitos no sangue peripherico de ratos inoculados.

Nas nossas experiencias, muito pouco numerosas, feitas em diversos animais (cobaia, cão, camundongo), não observámos modificações sensiveis na evolução da infecção pelo *Schizotrypanum* após a esplenectomia.

Seguem-se algumas de nossas observações:—Camondongo inoculado em 27-I-33 (sangue), exames: positivo 6-II-33, negativos 16, 26 e 27-II-33. Operado neste dia, continuou com exames negativos até 17-III-33.

—Camondongo branco. Ingeriu dejeções de triatomas infectados em 16-XI-aparecendo parasitos no sangue em 1-XII-32. Até 27-I-33 teve sempre poucos tripanosomas na circulação, sendo neste dia inoculado com *S. cruzi* (sangue de cão); a infecção sanguínea não se modificou até 27-II-33, quando foi esplenectomizado. Continuou com raros parasitos no sangue até 17-III-33, tendo tido ligeiro aumento do numero de parasitos em 3-III-33, aumento esse que foi, além de fraco, muito transitorio.

—Cobaia que resistiu a repetidas inoculações de *S. cruzi* de diversas origens, provavelmente imunizada por uma infecção anterior; Inoculações 20-X-32 (liquido hialino de barbeiros infectados), 13-XII-32 (fezes de *T. megista*), 13-I-33 (sangue de cobaia-raça de tatú). Teve sempre exames de sangue negativos.

Operada em 3-III-33, continuou negativa até 13-III-33. A reação de Machado (feita por E. Villela) havia sido fortemente positiva em 10-II-33.

Bloqueios

Acompanhando autores que estudaram a leishmaniose visceral (Pitaluga, Kurotchkin e Chung), da qual o agente etiologico é estritamente adaptado ao SRE, dissemos em uma comunicação anterior (1932) que a tripanosomiase americana experimental é um exemplo de bloqueio biologico deste sistema.

De fato, nos animaes em que as amostras virulentas de *S. cruzi* produzem intensas infecções (especialmente o cão), os parasitos, invadindo e proliferando no interior de numerosos de seus elementos, determinam verdadeiro «bloqueio» parasitario ou biologico de tal sistema. Estas expressões, no caso, são de toda propriedade, uma vez que não se considere o termo «bloqueio» no antigo sentido, isto é, como indicativo de uma inibição ou paralisação total dos elementos do SRE pelos agentes englobados. A noção de bloqueio total não é mais admissivel por diversas razões, entre as quaes a da possibilidade de se realizarem bloqueios por dois ou mais agentes sucessivamente.

—Fizemos varias experiencias com o fim de observar as ações reciprocas dos bloqueios biologico e coloidal.

Estudando a distribuição dos coloides e dos parasitos nos animaes inietados primeiramente com um destes agentes e depois com o outro, verificámos que de um modo geral ambos se distribuem independentemente pelos elementos do SRE. Relativamente ao numero enorme de celulas no interior das quaes ha parasitos ou coloide floculado, aquelas que encerram a ambos

constituem raridade. Assim, nos animaes muito infetados, em que se injeta por via sanguinea um preparado coloidal, observa-se que este é fixado em grande parte pelos elementos não parasitados, excepcionalmente pelas células infetadas. Entre estas células o englobamento do coloide dá-se mais frequentemente pelas que contêm pequeno numero de leishmanias.

A coexistencia de parasitos e coloides no interior da mesma célula observa-se também nos animais préviamente bloqueados em que se inocula o *S. cruzi*.

Da verificação de uma menor atividade coloidopexica dos elementos parasitados, nos animais com tripanosomiase americana experimental, pôde-se concluir que nesta infecção ha um bloqueio relativo do SRE, determinado pela proliferação do *S. cruzi* no interior das células reticulo-histiocitárias.

Sobre possíveis modificações da evolução da infecção em animaes submetidos a bloqueios coloidaes, antes ou depois da inoculação do parasito, nada concluímos das experiencias que fizemos. Seguem-se os protocolos de algumas destas experiencias, destinados a mostrar principalmente a distribuição dos parasitos e dos coloides no organismo.

Experiencias com Torotraste.

Cão T. 1—900 gr.—Inoculado em 14-IV-32 intraperitonealmente com sangue de cobaia pouco infetada (raça de tatú), reinoculada no dia seguinte com sangue de cão bem infectado (11º dia, raça humana), no peritonio (2 cc.) e sob a pele (0,5 c.c.). Em 20-IV estava regularmente infectado; em 21 e 22 foi injetado na veia com 4 c.c. e 3,5 c.c. de torotraste (mistura em partes iguaes de T. e sôro glicosado a 5%). Morreu no 11º dia de infecção (25-IV-32).

Exame dos esfregaços—Baço: numerosas células com deposito pardo amarelado, numerosas leishmanias. Foi encontrada uma forma parasitaria em divisão multipla, encerrando 5 nucleos e 5 blefaroplastos. Medula ossea—numerosas leishmanias, poucas células com T. Sangue: monocitos com plasma muito corado parecendo conter T.; alguns com leishmanias e restos de tripanosomas (exame feito quanto tempo depois da morte?).

Exame dos córtes—(alcool absoluto, hematoxilina-eosina)—Fígado: células parasitadas pouco numerosas, algumas encerrando granulos de T. Grande numero de células com deposito de T., sob a forma de granulos grandes e irregulares, pardacentos ou quasi incolores. Coração: Células e fibras musculares parasitadas; raras destas células contêm pequeno numero de granulos que por sua coloração e refringencia parecem ser de T. Algumas células não parasitadas com coloide floculado. Rim: ausencia de leishmanias, granulos de T. só nos glomerulos. Cerebro: grãos de T. quasi incolores e refringentes distinguiveis em poucas células; ausencia de parasitos. Baço: numerosas células cheias de T. Grandes fôcos de leishmanias. Raras células com coloide e parasitos.

Cão T. 2—1200 gr.—Sofreu as mesmas inoculações de parasitos que o cão precedente, em 14 e 15-IV-32. Em 21 e 22-IV-32, inoculações intravenosas de 5 a 4 cc. da mesma mistura de T. e sôro glicosado. No dia 23 tinha bastantes parasitos no sangue, morrendo com bôa infecção em 26-IV-32.

Frotis—Baço: numerosas celulas parasitadas e numerosas celulas carregadas de T. Ganglio: enorme quantidade de leishmanias e tripanosomas. Fígado: tripanosomas sanguícolas. Medula ossea: numerosos parasitos, raras celulas encerrando leishmanias e granulos de T. Sangue: numerosos tripanosomas.

Córtex—(alcool absoluto, H. E.)—Fígado: numerosas celulas bloqueadas pelo coloide, algumas com parasitos. Baço: celulas parasitadas em pequeno numero; encontram-se destas celulas com T. Grande numero de elementos fortemente carregados de T. Ganglio: grande quantidade de celulas bloqueadas; as que contem leishmanias e T. são como sempre em pequeno numero.

Cão T. 3—1100 gr.—Inoculado na veia em 15, 16 e 18-IV-32 respectivamente com 3, 3, e 3,5 de T. (a 50 % em sôro glicosado).

No dia 21, portanto 6 dias após a primeira injeção de T. foi inoculado na jugular com sangue de cão (raça humana, 7 dias). Morreu em 26-IV-32, tendo tido exame negativo em 21 e positivo em 25. Frotis.—Baço: raras leishmanias, algumas atípicas, numerosas celulas vacuolizadas e granulosas (T). Piroplasmose. Ganglio: celulas com T., ausencia de parasitos. Medula ossea: raras celulas T., raros parasitos esparsos; algumas celulas de grandes dimensões e nucleo multiplo, com numerosissimas leishmanias.

Córtex: (alcool absoluto, H. E.)—Fígado: grande numero de celulas com deposito de T. Foi encontrada uma grande celula do SRE encerrando 12 leishmanias e granulos de T.; foram estes os unicos parasitos achados. Baço: muito numerosas celulas com T., parasitos ausentens. Ganglios fortemente bloqueados pelo T., sem leishmanias. Pulmão: celulas com T., sem parasitos.

Cão T. 4—1050 gr.—Injetado em 15 e 16-IV-32 com 3 e 3,5 c.c. de T. na veia, e com sangue de cão (raça humana, 7 dias de infecção) em 21-IV-32 tambem na veia. Em 25-IV tinha tripanosomas no sangue, morrendo em 27.

Frotis: não foram encontrados parasitos nos orgãos (fígado, baço, ganglio, medula ossea). Piroplasmose.

Córtex: Fígado e baço com grande numero de celulas cheias de T. No coração, algumas celulas encerrando pequenos grãos ligeiramente corados pela hematoxilina (T. ?). Não foram vistos parasitos em nenhum córte.

Experiencias com Colargol (Silva Araujo)

Cão Colargol 1—900 gr.—Inoculado em 23-I-32 com *S. cruzi*, raça humana, foi injetado na jugular em 30-I-32 com 3 c.c. de Colargol, já com

numerosos tripanosomas no sangue. No dia imediato estava á morte, sendo sacrificado tendo decrescido ligeiramente o numero de parasitos no sangue.

Córtex: Fígado—grande numero de celulas impregnadas pelo coloide. Algumas celulas com poucos parasitos contém também Colargol; as muito infectadas não o contém. Degeneração gorda acentuada; fócios esparsos de necrose. Baço: numerosas celulas carregadas de Colargol. Raras celulas com coloide e parasitos em pequeno numero. Grandes celulas bem parasitadas encerrando gotículas de gordura. Rim: celulas dos glomerulos e dos tubulis com granulos de colargol; raras celulas parasitadas. Degeneração gorda. Coração: grandes celulas com numerosos parasitos; celulas esparsas encerrando colargol.

Cão Colargol 2—990 gr.—Inoculado em 13-V-33 com sangue de cão infectado (raça de cão, 2a. passagem). Em 27-V-33 foi injetado com 1 cc. de Colargol (injeção intracardiaca). Estava muito infectado; sacrificado (cloroformio) 15-20 minutos depois da injeção de Colargol. Orgãos fixados em alcool absoluto e formol a 10 %.

Córtex (H. E.)—Fígado: numerosas celulas parasitadas, raras das quaes encerram alguns granulos de coloide. Grande numero de celulas normais fixou o Colargol. Baço: enorme quantidade de celulas infectadas; Colargol em menor quantidade que no figado e menos discernível, distribuido por celulas não parasitadas. Coração: muito raras celulas parasitadas, Colargol ausente. Pulmão: raras celulas com parasitos, bastantes celulas com coloide, sómente (este póde ser confundido com pigmentos de origem sanguinea). Supra-renal: exame negativo para parasitos e coloide. Ganglio mesenterico: raros parasitos. Ganglio periférico: **numero-síssimos** parasitos, pequena quantidade de prata.

O deposito de Colargol é mais abundante no figado; os parasitos são mais numerosos no baço, figado e ganglio periferico. É interessante notar sua pequena quantidade no coração (raça de cão).

Cão Colargol 3—1860 gr.—Inoculado em 12-V-33 com *S. cruzi*, raça de cão, 2.^a passagem, foi injetado no coração em 8-VI-33 com 1 cc. de Colargol e morto pelo cloroformio cerca de 20 minutos depois. Material fixado em formol a 10 % e alcool absoluto.

Córtex (H. E.)—Fígado: numerosas celulas bloqueadas pelo parasito ou pelo coloide; não vi elementos encerrando a um tempo ambos agentes bloqueantes. Baço, idem, menor quantidade de colargol. Pulmão: pouco colargol, não ha parasitos. Coração: leishmanias abundantes, não vi celulas com coloide. Ganglio linfatico: enorme quantidade de celulas parasitadas.

Cão Colargol 4—1200 gr.:— Cão normal, injectado na jugular com 1 cc. de Colargol (6-VI-33) e duas horas depois com 3-4 cc. de sangue de cão infectado (raça de tatú, 3.^a passagem). Foi sacrificado em 12-VI-33, 6 dias depois, já com bastantes tripanosomas no sangue. Orgãos fixados em alcool absoluto e formol 10 %.

Córtex (H. E.)—Fígado: poucas celulas com Colargol em fórmula de grãos amarelos homogêneos (alcool absoluto); poucas celulas para-

sitadas. Baço: coloide e parasitos mais abundantes, poucas celulas com colargol. Pulmão: ausencia de leishmanias — poucas celulas com prata. Ganglio: ausencia de coloide e de parasitos, coração e supra-renal idem. Num cóрте de figado (formol) encontrámos uma celula com leishmanias e grãos de colargol.

Bloqueio local:

Cão A—950 gr.—Foi inoculado sob a pele da região inguinal esquerda com sangue de cobaia pouco infectada por *S. cruzi*, raça de tatú (dia 26-I-32). No dia seguinte foi reinoculado com sangue da mesma cobaia, subcutaneamente, na região inguinal direita e no abdomen. Em 31-I-32 foi injetado com 1 cc. de carmin a 1/3 (Ribbert) e 1 cc. de tinta da China, nos pontos inoculados com tripanosoma em 27-I-33. Em 1-II-32, 1 cc. de Colargol na região injetada em 26-I-32. Este cão teve raros tripanosomas no sangue em 30, 31 e 1.º, tendo sido sacrificado em 2-II-32, ainda com raros parasitos na circulação. Os pontos de inoculação foram fixados separadamente em alcool absoluto, formol a 10% e Zenker.

Nos córtes os parasitos eram pouco numerosos; como nas experiencias precedentes, só raras celulas encerravam ao mesmo tempo leishmanias e coloide. Neste caso, observámos celulas parasitadas contendo tinta da China ou Colargol (fig. 5). Os dados exatos sobre esta experiencia são os que acabamos de referir; na nossa publicação anterior (1932) houve certos enganos na sua exposição.

IMUNIDADE

O capitulo da imunidade na doença de Chagas oferece largo campo á pesquisa científica. Apesar de possuirmos muitos dados importantes devidos aos trabalhos de Chagas, Machado e Guerreiro, Villela, Lacorte e outros, numerosas questões estão ainda por resolver.

O estudo deste assunto, que exige certa especialização, não foi particularmente feito por nós: daremos a seguir alguns dados, na maioria confirmativos dos de outros autores, sobre a imunidade, natural ou adquirida, á infecção pelo *S. cruzi*.

IMUNIDADE ADQUIRIDA

Fáto para o qual chamou Chagas a atenção, deste suas primeiras pesquisas sobre a tripanosomiase, foi a transitoriedade da fase inicial da infecção, durante a qual os parasitos encontram-se mais ou menos numerosos na circulação. Após atingir um maximo, variavel com a vi-

rulencia do germe e a resistencia do organismo, o numero de tripanosomas vae decrescendo progressivamente, até que se tornam muito raros ou desaparecem do sangue periferico. A redução numerica dos flagelados na circulação é, segundo Chagas, devida a condições de defeza que se vão creando no organismo; a infecção passa á cronicidade, ficando os parasitos cantonados nos tecidos, de onde esporadicamente saem tripanosomas para o sangue, geralmente em numero muito reduzido. Em varios animais evolue a molestia, espontanea ou experimental, do mesmo modo que no homem, tornando-se cronica, sempre conforme a virulencia ou a quantidade dos parasitos que se introduziram no organismo e as condições de defeza organica; evidentemente, estão excluidas as infecções agudas, que tanto no homem como nos animais pôdem terminar pela morte durante a fase septicemica.

Não está esclarecida a natureza dos anticorpos existentes no sôro sanguineo do homem e dos animais infectados pelo *S. cruzi*; sua existencia no sôro pôde ser determinada pela reação de fixação do complemento, especifica em presença de antigeno adequado, devida a Guerreira e Machado (1913). Poderosas contribuições demonstrativas do valor desta reação como elemento de diagnostico são os trabalhos de J. G. Lacorte e E. Villela. Nos nossos animais de experiencia, E. Villela tem feito a reação de Machado com resultados sempre uniformes.

— O homem e os animais que sofreram a infecção pelo *S. cruzi* adquirem um certo gráu de imunidade contra este parasito. O fáto de se conseguir isolar o tripanosoma do sangue de casos cronicos de doença de Chagas, sujeitos ou não á reinfeção, e as recidivas ás vezes 'mortais já observadas em animais, (Rocha Lima, Blanchard), mostram que esta imunidade é muito relativa. As reinoculações em animais infectados demonstram entretanto uma grande resistencia ás reinfeções.

E. Brumpt, Mayer e R. Lima, foram os primeiros a verificar a insensibilidade de animais infectados a novas inoculações. Brumpt (1913) observou que camondongos que sobreviveram á infecção resistem á inoculação de uma amostra virulenta e mortal para camondongos normais. Fáto semelhante foi observado por Colier (1931) em camondongos que sofreram uma infecção por um virus atenuado pela tripaflavina.

As observações, que possuímos sobre o resultado de reinoculações são as seguintes:

— *Cobaia 1* (470 gr.)—Este animal servira para alimentar os numerosos barbeiros da criação, provenientes de Lassance e em grande parte infectados, ficando em contacto com elles durante muitos minutos. Adquiriu provavelmente a infecção, que não foi pesquisada. Em 20-X-32 foi

inoculado em varios pontos com grande quantidade de dejeções de *T. megista* muito ricas em tripanosomas metacíclicos. Examinada quasi diariamente, teve, até 14-XI-32, 19 resultados negativos. Continuou sempre negativa até 13-III-33, tendo sofrido mais duas inoculações: em 13-XII-32 (conteúdo intestinal de ninfa muito infectada) e 13-I-33 (sangue de cobaia parasitada com virus do tatú). No dia 27-I-33 foi sangrada para experiencias de proteção (ver adiante); em 10-II-33 a reação de Machado (E. Villela) foi fortemente positiva; em 3-III-33 foi retirado o baço, o que não determinou o aparecimento de tripanosomas até 13 do mesmo mês. Esta experiencia mostra a resistencia do animal tanto ás fórmias metacíclicas quanto ás fórmias sanguícolas do *S. cruzi*.

—Cobaia 4—(470 gr.)—Infectada através a pele em 11-VII-32, com dejeções limpidas de triatomas, teve exames positivos de 27-VII a 22-IX-32. Exames negativos: 4-X; 12-X-32; 13-XII-32; 1-III-33; 8-V-33. Nesta data foi inoculada com *S. cruzi* (raça de tatú); exame negativo em 13-V-33; em 19-V-33 tinha raros tripanosomas no sangue; de 22-V em diante teve numerosos exames negativos, estando ainda viva (30-X-33). Em 2-VI-33 a reação de Machado foi positiva. Foi sangrada em 3-III-33 para experiencias de proteção (ver adiante).

—Cobaia 7—(780 gr.)—Infectada por deposição de dejeções de barbeiro no olho, em 11-VII-32. Exames positivos de 28-VII a 24-X-32, negativo 10-XI-32. Em 13-XII-32 sofreu inoculação intraperitonal de conteúdo intestinal de ninfa muito infectada (material que tambem serviu para a cobaia 1), tendo exames negativos de 17-XII-32 a 4-I-33. Examinada a 27-I-33, tinha regular infecção sanguinea; morreu a 6-II-33. (Fôra sangrada no coração em 27-I-33).

—Camondongo 4—Colocada sobre a pele 1 gota de urina limpida de triatoma com numerosos metacíclicos (29-XII-32), manifestou-se a infecção 13 dias depois (exames positivos 11 e 20-I-33); foi inoculado em 27-I-33, já sem tripanosomas no sangue ao exame a fresco (mesmo resultado em 1-II-33). Raros parasitos no sangue em 3-II-33; exame novamente negativos 6, 17, 26-II-33. Morreu em 27-II-33 quando estava sendo esplenectomizado.

—Camondongo 2— Infectado através a pele por fórmias metacíclicas. Exames positivos de 12-XI a 29-XII-32 (dejeções depositadas na pele em 1-XI-32). De 2 a 20-I-33 teve 2 exames negativos e 4 positivos (em 20, positivo). Inoculado em 27-I-33: exames positivos 1 e 6-II-33, negativos 27 e 28-I, 3, 7, 17, e 26-II-33. Morreu, como o precedente, em 27-II-33.

—Camondongo 7—Infectado por via digestiva com dejeções de triatoma, em 16-XI-32. Teve sempre raros tripanosomas no sangue, de 1-XII-32 a 17-III-33, apesar de reinoculado em 27-I-33 com sangue de cão infectado (raça humana) e de ter sido esplenectomizado em 27-II-33.

— Pelo que expusemos, vê-se que nos animais que já tiveram a infecção a reinoculação do *S. cruzi*, pôde ou não determinar o reaparecimento de tripanosomas no sangue; este, nos casos em que se dá, é em geral transitorio. Algumas vezes não se pôde dizer si o reaparecimento da infecção sanguinea foi devido á nova inoculação, ou a uma recidiva dela independente (cobaia 7).

A inoculação de tripanosomas nos animais ainda com raros parasitos na circulação não modifica sensivelmente o aspeto sanguineo da infecção.

Parece que, pelo menos até certo tempo, os animais que sofreram a infecção, quer sejam ou não reinoculados, estão nas mesmas condições relativamente á existencia ou á intensidade da infecção sanguinea. De facto, si de um lado as reinoculações não modificam sua intensidade e poderão ou não faze-la reaparecer, de outro lado, no sangue de animais não inoculados novamente pôdem reaparecer tripanosomas espontaneamente.

A possibilidade de se isolar o *Schizotrypanum* do sangue, e a persistencia da positividade da reacção de Machado, de enfermos chronicos da doença de Chagas, longos anos depois de afastados das zonas de barbeiro, demonstram que a infecção humana é muito duradoura, independentemente de reinoculações.

Em doentes internados no Hospital Oswaldo Cruz no serviço do Dr. E. Villela, tem-se observado a presença de tripanosomas no sangue por inoculação em cobaia até mais de 2 anos de hospitalisação; em outros doentes (America, Teodora) isolados ha mais ou menos 10 anos, a reacção de Machado ainda é positiva.

Segundo M. Torres (1930) o homem com infecção chronica, residente nas zonas infectadas por muito tempo, não é insensivel ás reinoculações a que está continuamente exposto em condições naturais, sendo devida ás reinfecções a evolução progressiva do processo de miocardite. A susceptibilidade a reinfecções seria devida á transitoriedade da immuniidade adquirida; a permanencia de fórmulas de multiplicação nos tecidos seria tambem transitoria.

Ação protetora do sôro de animais imunes.

Mayer e Rocha Lima (1914) verificaram que o sôro de animais (ratos, cobaias e coelhos) ativamente imunizados por repetidas inoculações de *S. cruzi*, não proteje camundongos normais quando inoculado separadamente ou em mistura com fórmulas sanguicolas deste tripanosoma. A injeção de sôro 24 horas antes da inoculação de parasitos tambem não

exerce nenhuma ação protetora. Não observaram modificações na marcha da infecção nos animais experimentados. A injeção de sôro em animais muito infectados não retardou a morte.

A acção protetora de sôros de cobaias imunes, em condições que mais favoreceriam sua realização, também não foi observada em nossas experiências.

1)—Sôro de cobaia que resistiu a varias inoculações (cobaia 1) foi aquecido 1/2 hora a 45° (para matar tripanosomas porventura existentes) e posto em contacto a 37° durante 1 hora com fórmias metacíclicas (urina de *T. megista*) e sanguícolas (sangue de cão, raça humana) do *S: cruzi*. Foram inoculados 2 camondongos normaes:

Camondongo A—Inoculado (via subcutanea) com a mistura de sôro e tripanosomas metacíclicos; examinado 10 dias depois, tinha parasitos no sangue. Foi sacrificado 20 dias depois da injeção, com forte infecção.

Camondongo B—Injectado (via peritorial) com sôro e tripanosomas sanguícolas, teve infecção benigna e transitoria (exame positivo no 10.º dia, negativo no 16.º e seguintes, até mais de 1 mês depois; a esplenectomia não provocou o reaparecimento dos tripanosomas).

Antes de serem inoculados estes animais, verificámos no material injectado a presença de tripanosomas não alterados e perfeitamente móveis. A infecção foi mortal no camondongo inoculado com tripanosomas do insêto e benigna no camondongo B, injectado com fórmias sanguícolas; deste fáto nada podemos deduzir, não só porque não foram inoculados animais testemunhos, como também não avaliámos a quantidade de parasitos injectados em cada camondongo.

2)— *Sôro da cobaia 4* (v. experiencias de reinoculações) foi submetido ao aquecimento a 45° durante 1/2 hora (sôro obtido na vespera e conservado na geladeira), em 4-VIII-33. Em dois tubos foram postas 10 gotas de sôro de cão com tripanosomas em pequeno numero (raça de *cão*, 4.ª passagem) e sôro imune (40 e 20 gotas), sendo aquecidos a 37° durante 1 hora. O conteúdo de cada tubo foi injectado em 1 camondongo.

Camondongo C—(40 gotas de sôro imune + 20 gotas de sôro com tripanosoma)—Inoculação subcutanea em 4-III-33; exames negativos 1, 14 e 15-III-33 (morreu neste dia).

Camondongo D— (20 gotas de sôro imune + 10 gotas de sôro contaminado)—Inoculação subcutanea em 4-III-33; exame negativo em 12, positivo em 14-VIII-33. Nos dias 15 e 16 o exame foi negativo; positivo de 17 a 22. Morreu em 8-IX-33, tendo tido ainda varios exames positivos (25, 26, 28, 30-VIII) e negativos (23, 24, 29-VIII, 1, 4 e 8-IX-33).

Em resumo, o Camondongo C morreu sem ter tido tripanosomas no sangue 11 dias depois da inoculação; o camondongo D teve o 1º exame po-

sitivo 10 dias após, apresentando uma infecção sanguínea muito ligeira e irregular.

Em uma única experiência feita verificámos que o soro de animal imune depois de ficar em contato 1 hora a 37° com formas B (sanguícolas) e formas U (metacíclicas) de *S. cruzi*, não protege camundongos contra a infecção, quando com elas juntamente inoculado.

B. Borghi (1932) fez experiências análogas com o *T. lewisi*, confirmando a ação protetora do soro de ratos imunes e concluindo pela semelhança das propriedades antigênicas das formas B e das formas U deste tripanosoma.

Procurámos uma vez observar a ação de soro imune sobre o desenvolvimento cultural do *S. cruzi*:

Semeando 2 tubos (meio de Noguchi) com a mesma quantidade de uma cultura de *S. cruzi* e adicionando a um deles (tubo 1) algumas gotas de soro da cobaia 4, em 4-III-33, o desenvolvimento foi muito mais lento nesse tubo que no outro. No 1° dia encontravam-se críptídias mortas e raras com movimento muito lento no tubo 1; no tubo 2, numerosos flagelados vivos com mobilidade normal. Com 48 horas o exame do tubo 1 foi negativo (1 preparado a fresco); no 5° dia havia raros flagelados. Ao fim de 13 dias a parte superior do tubo 2 apresentava-se turva, continuando límpido o tubo 1, até o 17° dia. Mais tarde observa-se macroscopicamente o desenvolvimento da cultura no tubo 1, muito menor do que o tubo testemunho. 5 meses depois a turvação dos 2 tubos era igual; ao exame microscópico só foram vistos flagelados mortos. Foi verificado, assim, sensível retardamento no desenvolvimento da cultura á qual foi adicionado soro imune.

Pelos fatos que acabamos de expôr, vemos que a única propriedade nitidamente demonstrada do soro dos animais que sofreram a infecção pelo *S. cruzi* é a de desviar o complemento em presença de antígeno específico (reação de Bordet-Gengou aplicada á tripanosomíase americana, conhecida por Reação de Machado). O soro de animais imunes não têm poder protetor, embora seja possível que determine uma atenuação da infecção quando injetado depois de ter estado em contato com os tripanosomas; propriedades tripanolíticas ou tripanocidas, poder aglutinante ou de adesão, que apresentam comumente soros de animais com outras tripanosomíases, não foram ainda observadas no soro humano ou de animais infectados pelo *S. cruzi*.

Imunidade natural

Sobre a imunidade natural dos animais de sangue frio á infecção pelo *S. cruzi* publicámos uma nota (1933) que transcreveremos, quasi sem

modificações; depois diremos algumas palavras sobre a resistencia de certos animais heterotérmos á mesma infecção.

Em 1925 F. L. Niño diz ter verificado a sensibilidade de Batraquios (*Bufo marinus*) ao *S. cruzi*, mas seus resultados não foram confirmados pelos autores que depois estudaram a questão: Bruni (1926) não conseguiu infectar rãs e sapos (*Rana esculenta*, *Rana viridis*, *Bufo vulgaris*), observando-os por longo tempo, e Dios, Werngren e Perez (1929), repetindo em grande escala as experiencias de Niño, obtiveram sempre resultados negativos. Em suas pesquisas inocularam estes autores numerosos sapos (*Bufo arenarum*) com sangue de homem e de ratos brancos, e intestino de *Triatomas*, infectados pelo *S. cruzi*, controlando a negatividade dos resultados pela inoculação de sangue e órgãos dos sapos utilizados em ratos novos.

Brumpt (1927, verificando o ecleticismo alimentar dos Reduvidos transmissores do *S. cruzi*, sugere a possibilidade de serem os animais de sangue frio hospedeiros naturais deste flagelado, não obstante reconhecer ao mesmo tempo a probabilidade de serem estes animais refratarios á infecção—o que aliás afirma, em outra parte (1922).

R. V. Tállice (1929) no Uruguay pesquisou o *Schizotrypanum* no sangue de animais homeotermos, em zona onde havia exemplares infectados de *Triatoma rubrovaria*, não o encontrando. A inoculação de lagartos (*Teius teyou*) não era seguida de infecção, pelo menos até 15 dias. Este autor também verificou no laboratorio a alimentação de triatomas sobre lagartos e rãs.

Em nossas experiencias inoculámos sangue de animais infectados em repteis (*Tropidurus torquatus*, *Ameiva surinamensis*) e batraquios (*Leptodactylus ocellatus*, *Bufo crucifer*).

Em 3 *Tropidurus*, inoculados sob a pele e intraperitonealmente com sangue de cobra infectada (Raça de tatú), pudemos observar o desaparecimento dos tripanosomas e das hematias nas primeiras horas. 3 horas depois da inoculação o exsudato peritonial só continha flagelados vivos em 1 deles; em todos a fagocitose de hematias e tripanosomas era evidente. O exame do sangue destes lagartos foi negativo 3 e 24 horas depois de injetados. No 3º dia morreu 1 *Tropidurus*, sem parasitos no exsudato peritonial e no sangue; outro foi sacrificado no 7º dia com os mesmos resultados e sem fórmas de leishmanias nos musculos e tecido sub-cutaneo do ponto de inoculação. O terceiro morreu 12 dias depois, também com exame de sangue negativo.

Uma *Ameiva* foi inoculada com o mesmo material sob a pele e no peritonio; neste, pouco (mais de 3 horas após a injeção, só vimos 1 tripanosoma preso a um leucocito, já havendo desaparecido os globulos vermelhos da cobra. O sangue deste reptil teve exames negativos até 24 dias. Foi

picado por uma fêmea de *Triatoma megista* que fizera sua última refeição 14 dias antes, e por larvas do mesmo inseto que nunca haviam sugado.

Quanto aos batráquios, quasi todas as nossas observações foram feitas somente durante as primeiras horas que se seguiam á inoculação, até o desaparecimento dos tripanosomas da cavidade peritoneal, por fagocitose e por lise; apenas em 1 *Leptodactylus* foram feitos exames de sangue durante muitos dias. O ultimo exame, negativo, foi feito 35 dias após a inoculação.

Em resumo, os tripanosomas inoculados no peritonio de repteis (*Tropidurus*, *Ameiva*) e batráquios (*Bufo*, *Leptodactylus*) daí desaparecem em poucas horas por lise e fagocitose; a presença de flagelados no sangue destes animais não foi observada por exames feitos desde as primeiras horas até varios dias depois da inoculação do *Schizotrypanum*. E em conclusão, é extremamente improvavel que os animais de sangue frio possam ser reservatorios do *S. cruzi* na natureza, embora tenha sido ainda uma vez constatada a capacidade do *Triatoma megista* sobre eles se alimentar.

—De um modo geral, os animais são mais sensiveis ao *S. cruzi* durante as primeiras idades. Principalmente em certos animais a sensibilidade é muito diversa no estado jovem e no estado adulto: os ratos adultos são, segundo Regendanz (1930), imunes a amostras de *S. cruzi* que, inoculadas em ratos jovens, podem produzir infecções mortais. Com o gato e o coelho o mesmo fato pode se dar.

E' provavel que a criança seja mais sensivel á infecção pelo *S. cruzi*, do que o homem adulto; entretanto, esta conclusão não pode ser baseada simplesmente na observação de que os casos agudos da doença de Chagas são com muito mais frequencia encontrados nos individuos jovens. Não se pode fazer paralelo entre a infecção humana, contraída naturalmente, e a infecção experimental, em animais, por exemplo o rato, pois devem ser tomadas em consideração as condições de contagio, que em geral são satisfeitas desde as primeiras idades nas zonas de enfermidade endêmica, como também as condições de relativa imunidade que se estabelecem no organismo infectado, nos quais se acham quasi todos os adultos habitantes das regiões de barbeiros.

Tendo-se em vista as condições a que nos referimos, não será razoavel atribuir-se a menor incidencia de infecções agudas nos individuos adultos á sua maior resistencia natural ao *Schizotrypanum*. Segundo a opinião de M. Torres, como vimos, mesmo os doentes chronicos do mal de Chagas, que possuem um certo grau de imunidade ao *S. cruzi*, não são insensiveis a reinoculações pelos barbeiros em condições naturais.

A imunidade natural de ratos adultos foi tambem por nós verificada, em experiencias feitas com raças de *Schizotrypanum* muito virulentas para outros animais:

S. cruzi no organismo do invertebrado

1)—*Triatoma megista*

Material e tecnica.

O material de que temos nos servido para estudo do ciclo evolutivo do *S. cruzi* e para outras pesquisas é proveniente de Lassance, constando em grande parte do *Triatoma megista* Burm., o principal transmissor da doença de Chagas naquela região.

Os insetos colhidos nas cafúas são em alta percentagem portadores do parasito (Chagas), principalmente durante os ultimos estádios de sua evolução; trazidos ao laboratorio, servem como fonte de virus para as infecções experimentais e são empregados em estudos parasitologicos, experiencias de transmissão, etc. A partir dos ovos dos barbeiros infectados ou não obtem-se uma criação de insetos puros que assim se conservam por alimentação em animais normais, sendo estes insetos utilizados principalmente para estudo do ciclo evolutivo do tripanosoma e para experiencias de infectividade.

Dissecção: As grandes dimensões do *T. megista* nas ultimas fases de sua evolução muito facilitam o isolamento de seus orgãos internos, especialmente do tubo digestivo e anexos.

Para se isolar e distender o tubo intestinal prestam-se melhor os insetos com o estomago vazio ou com pouco sangue, depois de decorridos alguns dias desde a ultima refeição. Para isto, pode-se proceder da seguinte maneira:

1) Fixando o inseto por meio de uma pinça, cortar com tesoura as pernas, as asas e as partes laterais do abdomen (conexivo);

2) Abrir a cavidade abdominal por uma secção transversa praticada com tesoura na folha quitinosa dorsal, junto ao tórax;

3) Fixar o hemiptero numa placa de Petri contendo parafina sólida, espetando-se um alfinete na casca ventral do abdomen, de dentro para fóra, tendo-se o cuidado de não ferir o intestino; a folha dorsal do abdomen deve ser levantada, dobrada para trás e fixada á parafina por outro alfinete, de modo que a cavidade abdominal fica quasi inteiramente aberta pela face dorsal.

4) Abrir com uma pequena tesoura as partes laterais do tórax, introduzindo uma das laminas na massa muscular e cortando cuidadosamente até separar completamente o resto do exoesqueleto dorsal; ficarão então expostos todos os órgãos internos do barbeiro.

5) Retirar com pinça e tesoura as partes moles toraxicas e abdominais que não interessem (musculos, tecidos adiposo, órgãos genitais, vaso dorsal, traqueas...); dissecar o mais possivel até ás proximidades do orificio anal, com cuidado para não romper a empôla retal, (fig. 8).

6) Desfazer a articulação da cabeça com o tórax sem seccionar o esofago; separar das porções quitinosas vizinhas o ultimo segmento abdominal.

7) Transportar para uma lamina com algumas gotas de agua fisiologica o tubo intestinal, segurando-o pelas suas porções quitinosas terminais e distende-lo com o auxilio de agulhas e pinças histológicas, rompendo as adherencias mantidas pelos filamentos traqueais e tubos de Malpighi entre suas diversas partes.

Por esta técnica as diferentes partes do tubo digestivo ficam perfeitamente separadas, podendo-se fazer esfregaços ou córtes de cada uma isoladamente.

A fixação dos órgãos internos pôde tambem ser feita *in loco*, imergindo-se o inséto aberto no liquido fixador; a dissecção é terminada depois de fixado. Este processo convem quando o barbeiro está com o estomago ou o réto muito dilatados pelo seu conteúdo, caso em que a ruptura das paredes se dá facilmente quando se pratica a dissecção a fresco em sôro fisiologico. Para se retirar os fragmentos de quitina que quasi sempre ficam adherentes á ultima porção do réto convem tambem esperar que a peça esteja fixada, principalmente si a empôla rétal estiver distendida por dejeções.

Para se retirar as glandulas salivares o meio mais pratico é fazer-se a dissecção como foi dito, tendo-se cuidado especial na abertura do tórax. Depois de bem isolado o tubo intestinal e rompida a parte superior do anel quitinoso por onde o intestino penétra na cavidade torácica, faz-se uma ligeira tração para cima e para traz, segurando-se a cabeça do inséto com uma pinça; as glandulas salivares ficam adherentes ao

esôfago e á primeira porção do intestino médio. Barros Barreto aconselha que esse fim que se deixe o barbeiro decapitado para ser dissecado no dia seguinte; a secreção acumula-se nas glandulas, aumentando-as e facilitando a dissecção.

As dissecção das fórm^{as} jovens dos triatomas (larvas) é menos facil, não podendo ser feita com a mesma precisão. Quando se trata de larvas já de certo tamanho é possível a separação perfeita das partes principais do tubo digestivo, precedendo-se desta maneira: segurando-se o inséto pela cabeça e pelo tórax, com uma pinça curva, cortam-se as pernas e os bordos do exo-esqueleto (na junção das folhas quitinosas dorsal e ventral); depois de retirada toda a lamina dorsal, com uma agulha puxa-se o estomago para cima de uma lamina e secciona-se o tubo intestinal ao nivel do estrangulamento que separa o estomago da segundo porção do intestino médio; com esta porção faz-se o mesmo, seccionando-se junto á inserção dos tubos de Malpighi; antes de se puxar tambem o réto para a lamina deve-se lavar com agua fisiologica o interior da carcassa do inséto, para se retirar os detritos de outras partes do intestino. Por este modo obtem-se numa mesma lamina, onde se colocam préviamente tres gotas de sôro fisiologico ou outro liquido apropriado (liquido de Laveran e Mesnil, etc.) material das duas porções do intestino médio e do intestino posterior de larvas, para exame a fresco ou para coloração.

— Para o estudo do ciclo evolutivo do tripanosoma é recomendavel que se façam, juntamente com córtes seriados, esfregaços das diversas porções do tubo intestinal de inséto com o mesmo tempo de infecção. O exame a fresco emprega-se vara a verificação da infecção e de sua intensidade, observação da disposição e mobilidade dos parasitos, bem com para a pesquisa de flagelados em certos órgãos (tubos de Malpighi, glandulas salivares), etc. O exame dos córtes e dos esfregaços corados completam-se, pois os primeiros esclarecem sobretudo a disposição geral e a localização dos parasitos, e os segundos sua morfologia nas diferentes regiões do condúto intestinal. As diversas fases da evolução, por estes meios, pódem ser perfeitamente acompanhadas.

Temos empregado varios agentes fixadores para o estudo histologico e parasitologico dos órgãos dos barbeiro: sublimado alcool de Schaudinn e de Mayer, sublimado acético, alcool absoluto, liquidos de Zenker, Helly, Carnoy, Gielson, Bouin e Duboscq-Brasil. As melhores fixações que obtivemos foram pelo Carnoy, o qual muito se presta para as colorações pelo Giemsa e pela hematoxilina férrica. Os liquidos de Zenker e de Helly tambem dão boas fixações, adequadas principalmente ao estudo histologico do inséto pelas colorações pela hematoxilina-eosina; o método de Giemsa poderá ser empregado, mas não dá a reação típica e a diferenciação

Do ponto de vista da distribuição e da disposição dos parasitos nesta parte do canal intestinal, os detalhes de sua estrutura histologica não têm interesse.

O intestino posterior, proctodéum ou post-intestino, acha-se nos Triatomidéos reduzido á empôla rétal. É uma dilatação aproximadamente ovoide, de pequenas dimensões, limitada adiante pela inserção dos tubos excretorios e atrás pelo orificio anal.

Sua fórma varia tambem com o estado de repleção; quando cheio, como por exemplo pouco tempo depois da refeição, mostra-se dilatado, esférico, e vasio torna-se alongado, pirifórme.

A côr do réto é variavel segundo a qualidade das excreções nele acumuladas, sendo escura quando no seu interior ha fêses, e amarela ou branca segundo encerre urina granulosa ou hialina. Nos Hemípteros não existe o cécum rétal que alguns inséto possuem e que tem sido descrito no barbeiro, por confusão talvez com as empôlas terminaes dos tubos de Malpighi.

O conhecimento da estrutura histologica da empôla retal tem grande importancia para o estudo da evolução do *Schizotrypanum* durante as ultimas fases do ciclo, que dela se passam.

A parede do intestino posterior é forrada internamente por duas camadas muito distintas de tecido, que se reconhecem facilmente ao exame de córtes longitudinaes praticados em empôlas retaes em distenção natural pelas dejeções. Na primeira porção do réto, em contato com a região pilorica, a empôla retal é revestida por um epitélío alto, de nitida planura estriada; a porção terminal é recoberta por uma superficie quilinosa irregular que faz continuação ao epitélío e se prolonga até o anus.

Em todos os inséto a ultima porção do protodéum é revestida, bem como o stomodéum, por quilina resultante da invaginação do exoesqueleto.

A tunica muscular é bem desenvolvida ao nivel do réto. Sua conformação, analoga á do estomago, póde ser bem estudada em preparações totais em que o orgão é fixado e corado depois de aberto e distendido. Como no estomago, as fibras estriadas dispõem-se em feixes separados formando uma rêde; os feixes externos são longitudinais e os internos transversais.

A estrutura das paredes do réto permite-lhe grande extensibilidade e grande contratilidade. Quando se abre o inséto pouco depois de uma refeição encontra-se frequentemente a empôla retal muito dilatada por dejeções que nela se acumulam (fig. 9); por longo tempo o réto conserva seu intenso paristaltismo nos barbeiros abertos, embebidos em agua fisiologica.

O protodéum desempenha a função de acumular e eliminar os produtos excrementiciaes.

As dimensões das diversas partes do intestino (estomago, protodéum)

naturalmente variam muito segundo seu estado de repleção. Nos indivíduos adultos, cujo comprimento total é de 33 a 37 mm. (tomado com a probócida distendida), as dimensões oscilam em geral entre os seguintes limites:

Intestino anterior:	9-12 mm.
Estomago	10-20 mm.
Duodeno	20-40 mm.
Intestino posterior	4- 6 mm.

A porção do tubo digestivo de dimensões mais variáveis é o duodeno (porção tubular do mesenteron) e estas variações não são determinadas pelo conteúdo intestinal. O comprimento desta parte do intestino, nas imagens, não raro atinge mais de 40 mm.

Os órgãos anexos ao tubo digestivo que nos interessam são as glandulas salivares e os tubos de Malpighi.

As glandulas salivares existem em numero de 6 no barbeiro, dispostas simetricamente de cada lado do tubo intestinal. A anatomia e a histologia do aparelho salivar do *T. megista* foram estudadas por B. Barreto (1922) e seus principaes dados a respeito serão aqui sumariados.

Em cada metade do inséto distinguem-se 3 glandulas dispostas da seguinte maneira, de diante para trás: duas glandulas unidas, situadas ao nível da porção inicial do estomago, que são as glandulas principal e suplementar, e uma posterior, isolada, aderente á parede do estomago, a glandula acessoria.

A glandula principal possui uma coloração amarelo-escuro, é reniforme e, como seu nome indica, constitue o mais importante órgão produtor de saliva. As glandulas suplementar e acessoria são consideradas simples reservatórios da secreção excessiva do elemento principal, unico que possui estrutura glandular. Do par de glandulas anterior emergem dois condutos excretores, um deles unindo-o á glandula acessoria e outro indo ter a um órgão mediano situado no segmento cefalico, órgão este que tem a função de aspirar a saliva pelo canal salivar formado pelas duas mandibulas.

Os tubos de Malpighi, em numero de 4, são longos e delgados e dispõem-se irregularmente enrolados na cavidade abdominal em torno do tubo intestinal, com o qual têm adherencias por meio de ramos traqueais. A inserção dos tubos excretores no conduto intestinal marca externamente o limite entre o mesenteron e o protodéum. Os tubos de Malpighi formam na sua embocadura uma pequena dilatação através da qual as excreções passam ao intestino posterior. Ha duas dilatações dorsais e duas ventrais que se abrem imediatamente atrás do orificio pilorico; são as empôlas terminais

dos tubos de Malpighi, órgãos para os quais anteriormente chamámos a atenção (1930) como séde de localização frequente dos parasitos. Externamente estas empôlas são individualizadas; pela sua fusão, dão origem a uma cavidade interna situada entre o réto e o pilôro, por onde vão ter ao protodéum as excreções malpighianas e as féses. Esta cavidade ou «atrium» comunica-se com o réto por um orificio valvular formado por uma lamina epiteliai que deriva dos tubos excretores e que, do lado do réto, é forrada pelas celulas epiteliais de planura estriada, que descrevemos. Conforme o estado de distensão da empôla retal, este atrium fica em comunicação mais ou menos franca com a mesma. As figuras que apresentamos esclarecem melhor a constituição e as relações das porções terminais dos órgãos excretores com o intestino posterior (figs. 11 e 12, estampa 6).

As empôlas terminais dos tubos de Malpighi existem também no *Cimex*. Packard (1909) assim se refere a elas: «Em muitos inséto (*Cimex*...) os vasos se abrem em uma espécie de bexiga urinaria em conexão com o intestino». Em outros Hemipteros (*Pyrrhocoridae*, *Asopinae*, *Pentatominae*, *Alidinae*...) apresentam-se também bastantes desenvolvidas (vêr as estampas de Kuskop, 1923).

Os tubos de Malpighi são constituídos essencialmente por um sinício epiteliai secretor provido de uma camada ciliar ou de planura estriada; sobre as diversas interpretações da estrutura estriada deste epitélio, ver por exemplo Noël e Tahir (1929). Sobre os caractéres da excreção malpighiana ou urinaria daremos adiante algumas informações.

—Pelo que acabamos de expôr sobre a conformação geral do aparelho digestivo, vê-se que este apresenta todas as particularidades anatomicas comuns aos Hemipteros, que são: ausencia de proventriculo, grande extensão do intestino médio, intestino posterior reduzido á empôla retal e baixa inserção dos tubos de Malpighi.

Nos Hemipteros a ausencia de proventriculo é compensada pelo grande desenvolvimento do mesenteron que, dividido em duas porções, serve como reservatorio de alimento, camara digestiva e zona de absorção.

A anatomia do tubo intestinal do *T. megista* é muito semelhante á dos *Cimex* (ver Patton e Evans, 1929).

Ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*

Considerações gerais

Segundo Chagas o *S. cruzi*, microorganismo dotado de diferenciação sexual, sofre no *T. megista*, em certas circumstancias, um duplo ciclo evolutivo, um sexuado e outro assexuado. O ciclo sexuado realiza-se na porção anterior do intestino médio, inconstantemente, quando coexistem no sangue

ingerido os elementos sexualmente diferenciados; o fenomeno da fecundação ahi se passa entre a fôrma macho, delgada e de rapido movimento, e a fôrma femea, larga, de movimento lento.

O elemento resultante da fusão destas fôrmas sofre uma série de transformações, de que resultam tripanosomas que vão se localizar nas glandulas salivares e são transmitidos pela picada.

O ciclo assexuado ocorre constantemente nos barbeiros que sugam animais infectados, tendo como resultado final o aparecimento das fôrmas de tripanosoma no intestino posterior.

A existencia de fenomenos sexuais em varios Tripanosomidas, durante o ciclo no invertebrado transmissôr, tem sido admitida por diversos autores; entretanto a maioria, atualmente, não mais admite a ocorrencia de tais fenomenos. Em realidade, porém, o problema ha muito tempo está no mesmo pé, porque, si ainda hoje podemos repetir que «there is at present no sound evidence of conjugation in any trypanosome life-cycle so far worked out» (Miss Robertson, 1912), com mais rigor devemos acrescentar que «at the present time it is not possible either to affirm or to deny, with certainty, that sexual processes occur» (Minchin e Thomson, 1915) p. 604.

Pouco depois dos primeiros estudos de Chagas sobre o parasito que descobrira, apareceram os trabalhos de E. Brumpt, em que a evolução do *Schizotrypanum* foi estudada em diversos artrópodes e comparada á de outros flagelados.

Devido principalmente ás pesquisas de Brumpt, que descobriu as fôrmas «metacíclicas» e verificou a transmissibilidade da infecção pelas fêses do *T. megista*, o *S. cruzi* é considerado atualmente como pertencente ao grupo dos Trypanosomidas que evoluem na porção posterior do Invertebrado e são transmitidos pelo método contaminativo (vêr Wenyon, 1926). A demonstração da existencia de uma evolução na porção anterior do *Triatoma* (Chagas) colocaria o *S. cruzi* num grupo intermediario na classificação de Wenyon, de que seria presentemente o unico representante, como flagelado possuindo as duas modalidades de evolução (*anterior e posterior station*) e as duas possibilidades de transmissão (inoculativa e contaminativa).

O ciclo evolutivo do *S. cruzi*, que tem como resultado final o aparecimento das fôrmas propagativas no intestino posterior e cujos principais aspêtos morfológicos são conhecidos pelos trabalhos de Chagas e Brumpt, será por nós acompanhado em suas linhas gerais.

O desenvolvimento do *S. cruzi* no insêto transmissôr passa-se no tubo digestivo, realizando-se suas diversas fâses no intestino médio e no intestino posterior. As regiões do tubo intestinal em que se sucedem os fenomenos da evolução permitem dividi-la naturalmente em 3 fâses bastantes

características. Assim, as primeiras alterações sofridas pelos tripanosomas ingeridos na primeira porção do intestino médio constituem a *fase estomacal*; ainda no mesenteron, na sua parte tubular, realiza-se outra fase de evolução a que poder-se-á chamar *fase intestinal*; finalmente o intestino posterior é sede das ultimas transformações evolutivas, cujo conjunto constitue a *fase retal*, de que resultam as fórmulas finais do desenvolvimento no Invertebrado.

O ciclo evolutivo do *S. cruzi* realiza-se por transformações morfológicas irreversíveis através o conduto digestivo. Do ponto de vista da interpretação dos fenomenos gerais de evolução, pôde-se dizer que o ciclo deste protozario consta de tres periodos ou fases fundamentais: o periodo de regressão ao «tipo ancestral» (Minchin), o periodo de multiplicação e o periodo de evolução propriamente dita ou transformação em fórmulas metacíclicas, fases ou periodos estes que correspondem essencialmente, embora não estritamente, ás fases estomacal, intestinal e retal, respectivamente.

A' exceção dos tubos de Malpighi, que ocasionalmente podem ser invadidos por parasitos, os flagelados ficam confinados ao tubo intestinal durante todo seu desenvolvimento no inséto; a presença de fórmulas de evolução do *S. cruzi* na cavidade geral e nas glandulas salivares, de que adiante trataremos, nunca foi por nós observada em condições naturais, no *T. megista*.

Durante a fase estomacal as transformações evolutivas iniciais são pouco acentuadas e não se processam ao mesmo tempo e do mesmo modo em todos os tripanosomas sanguícolas ingeridos. Emquanto que em alguns inicia-se a migração do blefaroplasto para a parte anterior do flagelado, outros poderão sofrer alterações degenerativas ou permanecer inalterados. A intensidade dos fenomenos evolutivos e degenerativos é muito variavel, segundo condições indeterminadas; no estômago ambos os fenomenos ocorrem normalmente, podendo uns predominar sobre os outros.

Praticamente em 100 % dos barbeiros (*T. megista*) que sugam um animal infectado, estabelece-se um parasitismo duradouro, segundo as experiencias de Chagas, Brumpt e tambem as nossas. Este fato indica que os fenomenos degenerativos, que parecem constantemente ocorrer, nunca são tão generalizados a ponto de atingir a todos os tripanosomas ingeridos e impedir o estabelecimento da infecção no hematófago.

No caso do desenvolvimento do *S. cruzi* no *T. megista* não ha necessidade de se distinguirem duas séries, uma evolutiva e outra degenerativa, porquanto as alterações degenerativas parecem se dar em condições normais sómente no estomago ao mesmo tempo que as transformações evolutivas que aí se passam são relativamente de pouca importancia; aliás, seria im-

possível distinguir na massa sanguínea em digestão os tripanosomas alterados que seguiriam sua evolução normal, ou seriam destruídos.

Passando á porção intestiniiforme do mesenteron, em pouco tempo os parasitos transformam-se em criticídias que se multiplicam ativamente, geralmente por divisão binária. A fase intestinal é um periodo de multiplicação e crescimento, caracterizado por individuos criticidiomorficos de dimensões muito variadas, geralmente grandes.

No intestino posterior, criticídias de tipo menor aderem á superficie epitelial ou se insinuam entre as dobras quitinosas, continuando a se multiplicar e transformando-se em fórmulas de blefaroplasto posterior, metacíclicas.

As fórmulas parasitarias do intestino posterior e do intestino médio (porção tubular) constituem um «stock» de parasitos que mantém por tempo indefinido a infecção no inséto, sem que seja necessaria nova refeição infectante.

A quantidade de parasitos no tubo digestivo do inséto sofre variações devido a condições imprecisas, provavelmente tambem á frequencia da alimentação. O jejum prolongado do hematofago exerce influencia nefasta sobre a vitalidade dos parasitos: quando se examina a fresco o conteúdo intestinal de barbeiros nessas circumstancias, encontram-se muitos flagelados imóveis ou com mobilidade muito diminuída.

O *T. megista* na fase adulta repete a sucção de sangue com o intervalo de 15 dias mais ou menos (Neiva, 1910), emitindo dejeções durante ou pouco tempo depois da mesma.

A duração do desenvolvimento do *S. cruzi*, desde a ingestão das fórmulas sanguícolas até o aparecimento dos primeiros tripanosomas metacíclicos, está sujeita a variações, entre as quais as devidas ao estado de evolução do inséto. Nas fórmulas jovens do *T. megista* os metacíclicos começam a se formar em geral no 6º ou 7º dias; nos individuos em fase ninfal ou alados, sobre os quais não possuímos a respeito senão muito poucas observações, o ciclo evolutivo deverá se completar entre 10 e 15 dias depois da contaminação.

Os barbeiros que se infectam sugando animal doente mesmo uma unica vez, alimentando-se subsequentemente em animais normais, permanecem parasitados em geral o resto da vida (Chagas).

Considerando as relações existentes entre a frequencia das refeições do inséto e o tempo de duração da evolução cíclica do parasito; a eliminação de grande quantidade de tripanosomas infectantes pelas dejeções emitidas depois de cada repasto; a percentagem dos barbeiros que se infectam por uma unica refeição contaminante e a persistencia da sua infecção,—ve-

mos que ha perfeita adatação entre o *S. cruzi*, como protozoario de evolução «posterior» e de transmissão por contaminação, e o *T. megista*, como seu hospedador e vetor natural mais importante.

Fáse estomacal

Poucas horas depois de ingeridos com o sangue de um animal infectado começam os tripanosomas a sofrer as primeiras alterações morfológicas na porção sacular do intestino médio.

Estas alterações são muito varaveis, dando aspéctos morfológicos bastantes diversos aos parasitos. Do segundo ao quinto dia após a refeição infectante encontram-se no estomago flagelados dos seguintes tipos: 1) fôrmas sanguícolas não modificadas ou ligeiramente alteradas; 2) tripanosomas em transição para a fôrma de critidia; 3) critidias; 4) fôrmas arredondadas, com ou sem flagelo livre; 5) parasitos irregulares com sinais mais ou menos acentuados de degeneração.

Desde algumas horas depois de estarem no estomago os tripanosomas sanguícolas perdem sua mobilidade característica, mesmo antes que tenham sofrido modificações morfológicas, devido possivelmente a diferenças de tensão osmótica.

A parte essencial da evolução no estomago é a transformação dos parasitos sanguícolas em critidias, que correspondem segundo a expressão de Minchin á fôrma larvaria ancestral dos hemoflagelados. Em grande numero dos tripanosomas ingeridos esta transformação apenas se inicia no estomago, completando-se depois de sua chegada á segunda porção do intestino médio.

A fáse estomacal é uma fáse de «regressão» essencialmente, que precede a fáse de multiplicação. As divisões que sofrem alguns parasitos no estomago não têm praticamente importancia como fatôr de multiplicação, de que resultaria grande aumento numérico dos flagelados no inséto.

No estomago do *T. megista* encontram-se raramente fôrmas sanguícolas com dois nucleos e dois blefaroplastos, alterações estas que parecem traduzir antes um fenomeno degenerativo que uma divisão binaria normal. Estas fôrmas anômalas parecem ocorrer tambem no estomago do *Ornithodoros moubata*, a julgar pela figura 51 da estampa 8 do trabalho de Mayer e R. Lima (1914).

Os tripanosomas sanguícolas pôdem passar dirétamente á fôrma de critidia, ou transformar-se em organismos arredondados, *leishmanias*. Segundo Minchin (1914) o estadiô de leishmania, que ocorre por derivação diréta das fôrmas do sangue, constitue a fáse «inconstante e variavel» do ciclo do *S. cruzi*.

Durante os primeiros dias encontram-se com facilidade fórmulas do sangue que não sofreram transformações evolutivas nem degenerativas. Fórmulas de blefaroplasto posterior, embora sem flagelo e de contornos irregulares podem ser encontrados até muitos dias depois da refeição (figs. 9-10, estampa 19,-21 dias).

No estomago permanecem durante meses parasitos arredondados, flagelados, leishmaniformes, ainda depois que o inseto foi alimentado em animais normais depois de um repasto infectante. Estes parasitos ficam vivos, como em latencia, sem se multiplicar e sem evoluirem, pelo menos no estomago, em numero diminuto; a presença de grandes massas de leishmanias, que Brumpt referiu ter achado no ventriculo quilifico de um *T. megista* adulto, nunca foi por nós observada.

Parece haver uma relação entre a intensidade dos fenomenos degenerativos sofridos pelos tripanosomas no estomago e a rapidez e intensidade dos processos digestivos. Para as diferentes idades do inseto e para cada individuo, podemos julgar da intensidade e da velocidade dos fenomenos digestivos pela rapidez com que se dá a lise dos globulos vermelhos depois da refeição. Segundo seja maior a idade do inseto, a hemolise vai se tornando mais rapida: no estomago das larvas é frequente encontrar-se até o 5º dia hematias inteiras, ao passo que nos adultos já são dificeis de encontrar depois do 3º. Durante qualquer fase da evolução do inseto a velocidade da digestão, apreciada pela hemolise, é variavel para cada individuo.

Assim, num lote de hemipteros alimentados conjuntamente no mesmo animal infectado, e sacrificados ao fim do mesmo praso, o aspecto microscopico do conteúdo estomacal pode ser muito diverso, tanto quanto ao estado de sangue ingerido, como quanto ao numero e morfologia dos parasitos. De um modo geral a destruição total das hemátias se dá entre 2 e 5 dias após a sucção; casos ha entretanto, e frequentes, em que não se vêem mais hemátias intactas no estomago mesmo antes de 24 horas.

Nos insetos em que a hemolise é mais rapida a degeneração e lise dos tripanosomas é mais geral; a relação entre hemólise e tripanólise tem sido notada sob a influencia de agentes diversos, como bile, saponina, veneno de cobra etc. No *T. megista*, os fenomenos paralelos de hemólise e tripanólise parecem ser muito influenciaveis pelo desenvolvimento da flora microbiana no conteúdo sanguineo do estomago; de fato, nos casos em que estes fenomenos são precoces e intensos, a ponto de serem difficilmente encontraveis os tripanosomas ingeridos ás vêses em grande numero e que foram destruidos em massa, observa-se quasi sempre enorme quantidade

Fase retal

Nos insetos com infecção antiga os parasitos localizam-se no intestino posterior, assumindo disposições e aspéto evolutivos caraterísticos que constituem a fase retal estabelecida.

O grande acumulo de flagelados na ultima porção do tubo digestivo do *T. megista*, onde se originam as fórmas terminais do ciclo evolutivo, e a transmissão do *S. cruzi* ao vertebrado pelas dejeções do inseto, autorizam a classificação deste *Schizotrypanum* como Tripanosomida de evolução na porção posterior e de transmissão contaminativa.

A fase retal do desenvolvimento do *S. cruzi* no barbeiro é muito semelhante á da evolução do *Trypanosoma lewisi* no pulga (*Ceratophyllus fasciatus*), tal como foi descrita por Minchin e Thomson em 1915. Aplica-se em grande parte ao parasito que estudamos a descrição morfológica feita por estes autores, da fase correspondente de ciclo do tripanosoma do rato.

De um modo geral, os parasitos que se encontram permanentemente no réto dos triatomas infectados desde longo praso, pertencem a dois tipos morfológicos definidos, a fórma de critídia e a forma final de tripanosoma, ou a estadios de transição entre a primeira e a segunda.

As critídias que vão passando do mesenteron para o réto tomam um aspéto morfológico mais uniforme; são de um tipo menor, de curto flagelo ou dele destituídas, com grande tendencia a se fixarem pela extremidade anterior ás paredes dor orgão, formando um revestimento ás vezes completo de sua superficie interna. Nas visinhanças do piloro, em córtes longitudinais do réto, a superficie do epitélio estriado mostra-se inteiramente coberta por uma camada de parasitos (figs. 11-15), nos insetos com infecção antiga (est. 6-8).

Conforme referimos em uma publicação anterior (1930), a disposição dos flagelados perpendicularmente ao epitélio rétal havia sido observada, embora não descrita, por J. Gomes de Faria e O. Cruz Filho. Nesta mesma publicação assinaláramos haver encontrado no tubo digestivo do barbeiro as fórmas evolutivas do *S. cruzi* até então descritas, entre outras as fórmas intracelulares verificadas por estes autores no intestino posterior do *T. megista* (1927). Pelo exame detalhado dos córtes que tínhamos e dos que depois fizemos desta porção do intestino, chegámos á conclusão de que as fórmas parasitarias que julgáramos ser as descritas por Faria e Cruz Filho, não ocupavam de fáto situação intracelular, mas sim formavam aglomerados nos intersticios das dobras da região quitinosa da parede rétal. A confusão que fizemos, atribuindo a estes aglomerados uma situação intracelular, tomando-os portanto pelas fórmas de Faria e Cruz

Filho, foi devida a que as secções de intestino posterior que possuímos, praticadas em órgãos fixados em estado de retracção, apresentavam aspectos microscopicos dificeis de interpretar á primeira vista.

A estrutura da parede retal só poude ser por nós bem estudade depois que practicámos córtes histologicos em inséto fixados pouco minutos depois se alimentar, ocasião em que o órgão se apresenta dilatado por dejeções que se acumulam no seu interior. As paredes do réto são muito elasticas e retráteis, oferecendo apparencias bastante diversas quando cortadas nos estados extremos de distenção e de retracção. As condições são especialmente favoraveis para o exame microscopico dos córtes, tanto para o estudo da estrutura histologica, como para o da morfologica e disposição dos parasitos, quando a empôla rétal é fixada e incluída emquanto dilatada pela excreção hialina dos tubos de Malpighi.

A penetração e multiplicação do *S. cruzi* em celulas da parede do intestino foi primeiramente assinalada por Mayer e Rocha Lima (1914), que estudaram a evolução do parasito no *Ornithodoros moubata*.

Devemos dizer que nunca vimos em nenhuma porção do tubo digestivo do *T. megista* fórmãs evolutivas do *S. cruzi* a que presentemente possamos attribuir uma localisação intracelular. Embora sem excluir a possibilidade da existencia de uma fase de multiplicação intracelular no ciclo deste parasito no inséto transmissor, supomos que não represente a mesma um periodo de evolução obrigatorio, uma vez que se póde acompanhar todo o desenvolvimento na luz do intestino até finalmente a transformação de haptomonas em tripanosomas na superficie do epitélío estriado do intestino posterior.

—As fórmãs parasitarias adherentes ás paredes do intestino posterior de inséto portadores de certo flagelados, durante a fase términal de seu desenvolvimento, correspondem aos «estadios gregariniformes» de Léger e foram designadas «haptomonas» por Woodcock (1906); como termo correlativo, Minchin e Thomson (1915) propuseram o de «nectomonas» para designar os organismos critídiomórficos livres no conteúdo rétal (*Trypanosoma lewisi*). Empregando estas designações podemos dizer que na fase rétal estabelecida do ciclo evolutivo do *S. cruzi* no *T. megista*, os flagelados se apresentam sob o aspecto de tres tipos morfologicos fundamentaes, que são: 1) haptomonas, 2) nectomonas, 3) tripanosoma.

A infecção retal inicia-se com as fórmãs de critídia vindas do intestino médio, o que se dá nas larvas novas por volta do 4.º dia depois da ingestão dos tripanosomas sanguicolas.

Chegadas ao intestino posterior as critídias polimórficas (nectomonas) tendem a fixar-se ao epitélío rétal ou insinuam-se entre as dobras quitinosas, transformando-se em flagelados de tipo menor e mais unifórme

(haptomonas). Este tipo de parasito constitue a fórma de multiplicação característica da fase rétal; o fenomeno mais importante desta fase é, como dissemos, a formação de parasitos de blefaroplasto posterior, os chamados «tripanosomas metacíclicos» (Brumpt), formas terminais do ciclo no Invertebrado.

As transformações evolutivas succedem-se no réto no sentido nectomas—haptomonas—tripanosoma, normalmente. Não sabemos porém si as nectomonas pódem se transformar dirétamente em tripanosomas, o que nos parece muito provavel, nem si as haptomonas pódem voltar ao tipo nectomonas, o que não deve acontecer. Mais certo é que as fórmas de tripanosoma não são suscetíveis de regressão ao tipo precedentes de flagelados.

Segundo Brumpt os metacíclicos não são mais capazes de multiplicação no inséto.

Os parasitos localizados na empôla rétal constituem um «stock» que se mantem indefinidamente sem ser necessaria sua renovação.

Tubos de Malpighi

Conforme notificámos precedentemente (1930), os tubos excretores do *T. megista* pódem ser invadidos por fórmas evolutivas do *S. cruzi*. Fáto de observação muito comum é a localisação de critídias na embocadura dos tubos, isto é, nas suas empôlas terminais. Ocasionalmente, em individuos adultos, verificámos a invasão dos proprios vasos malpighianos por grande quantidade de flagelados, a ponto de algumas vezes ocuparem inteiramente sua luz (Fig. 14, 16).

Os parasitos são critídias relativamente grandes que se mostram fixas pela extremidade flagelar á superficie interna do órgão. O que podemos acrescentar ao que já havíamos dito sobre o parasitismo dos órgãos excretores é que o desenvolvimento dos flagelados póde chegar até á formação de tripanosomas metacíclicos, portanto que a evolução malpighiana é do tipo rétal.

A infecção dos tubos de Malpighi só tem sido por nós observada nos inséto em estado alado, em percentagem relativamente pequena.

Wenyon (1926) menciona a hipótese de fórmas parasitarias do *S. cruzi* passarem á cavidade geral e ás glandulas salivares pelos tubos excretores.

—Glandulas salivares e cavidade geral:

Nas glandulas salivares do *T. megista* (glandulas principais) foram encontradas 3 vezes por Chagas (1909) fórmas parasitarias de blefaroplasto posterior as quais representam para este pesquisador as verdadeiras

formas infectantes do ciclo do Invertebrado. Barros Barreto (citado por Marques da Cunha, 1923) achou também parasitos nas glandulas salivares. A passagem dos flagelados pela cavidade geral segundo Chagas é muito transitoria, tendo sido aí surpreendidos sómente duas vezes, em triatomas achados com infecção natural.

A invasão da cavidade geral e das glandulas salivares do *T. megista* por fórmãs de evolução do *S. cruzi* não foi assinalada por outros autores.

Como veremos adiante, as fórmãs sanguícolas do *S. cruzi* evoluem artificialmente na cavidade geral do barbeiro até a formação de tripanosomas metacíclicos; também estes pódem permanecer vivos durante alguns dias, quando aí inoculados.

Dejeções do *T. megista*.

As diversas especies de dejeções dos triatomas foram por nós (1932) anteriormente estudadas, no que respeita a seus caractéres, suas condições de eliminação e á sua importancia na transmissão da molestia de Chagas.

Como em todos os inséto, distinguem-se nos barbeiros duas especies de dejeções, as féses e a excreção malpiguiana. Esta é um liquido amarelado que séca rapidamente ao contáto com o ar; as féses, negras, são de dessecação mais lenta (Neiva).

A excreção urinaria é eliminada segundo as circunstancias sob apéto diferentes, que nos permitem distinguir duas variedades bem distintas: uma delas, tal como tem sido descrita, é um liquido amarelo, turvo, rico em cristais; a outra é incolor, transparente e fluida. Pódem respectivamente ser designadas por urina granulosa e urina hialina ou limpida.

A urina hialina é eliminada em estado de pureza pelos barbeiros durante as primeiras horas que se seguem ás refeições: em geral alguns minutos depois de terminarem a sucção, ou durante a mesma, os triatomas emitem dejeções negras ou amarelas, e pouco depois eliminam gotas de um liquido, que poderá conter ainda traços de féses ou cristais, ou ser completamente incolor e transparente, assemelhando-se a gotas d'agua. Com intervalos variaveis os inséto continuam a expulsar excreções com estes caractéres, sendo também muito variavel a quantidade total e o numero de vezes em que são eliminadas.

As urinas emitidas pelos barbeiros algumas horas depois do repasto começam a ficar novamente turvas pela presença de cristais ou de féses; durante os intervalos entre as refeições as excreções que se acumulam no réto são eliminadas ao mesmo tempo, com o aspéto de um liquido mais ou menos denso, enegrecido e rico em cristais. A urina ama-

rela (granulosa) pôde ser tambem eliminada sem ser de mistura com feses.

A excreção hialina do *T. megista* é um liquido de reação alcalina, que não contem substancias coagulaveis pelo calor, cristais nem elementos celulares. A presença de acido urico pôde ser verificada pela reação da murexida.

A urina granulosa contem numerosos cristais de urato de sódio, soluveis na potassa e na soda caustica de 10 % e insoluveis nos acidos. Segundo P. Marchal (1890) « a secreção de acido urico é um fáto geral entre os inséto e afóra pequenos grupos, sómente os Hemipteros fazem exceção »: O acido urico livre ou sob a fórmula de urato de sódio foi assinalado nas excreções do *Triatoma rubrofasciatus* por A. Lafont (1912). Brumpt e P. da Silva (1912) julgaram como sendo de guanina os pequenos granulos brancos encontrados nos excrementos de uma ninfa de *T. megista*. A urina granulosa tem reação francamente acida.

Seguindo o conselho de Dr. E. Villela, injectámos na cavidade geral de barbeiros adultos, pouco tempo depois de picarem, indicadores corados, para comprovarmos a origem malpiguiana das excreções limpidas. Os inséto inoculados com uma solução de vermelho fenol eliminavam algum tempo mais tarde urinas hialinas coradas em róseo e horas depois urina granulosa de reação acida.

Poucos minutos depois do inséto terminar a sucção a empôla rétal se apresenta fortemente dilatada pelas dejeções, que se renovam mais ou menos rapidamente após cada expulsão. Nestas condições pôde-se obter com facilidade o liquido limpido, por expressão ou percussão do abdomen do barbeiro, podendo o mesmo ser projetado a distancia bastante grande. Em condições naturais, no interior de uma cafúa em Lassance, observámos a expulsão em jacto de algumas gotas de urina limpida por uma ninfa de *T. megista* cujo abdomen percutimos levemente e que acabara de sugar um homem.

Os triatomas em todas as idades eliminam as dejeções com os diversos aspéto que enumeramos. A quantidade total de urina hialina emitida após cada refeição por adultos e ninfas de *T. megista* é relativamente muito grande.

O principal interesse das excreções limpidas dos barbeiros reside no fáto de que, quando provém de inséto infectados, contem quasi sempre flagelados em grande numero.

As unicas referencias relativas á eliminação de dejeções limpidas pelos triatomas, e á presença de *S. cruzi* nas mesmas, são as de Brumpt e Pirajá da Silva (1912), que obtiverem « um liquido excrementicial claro » pela compressão do *Conorrhinus*, e a de H. C. de Souza Araujo (1918) que observou sua eliminação natural por uma femea de *Triatoma infestans*.

Brumpt (1914), tratando da coprofagia nos Hemipteros, diz que os *Rhodnius*, depois de eliminarem suas «dejeções negras ou hialinas», aspiram-n'as completamente.

Ao exame microscopico das excreções limpidas eliminadas por barbeiros infectados pelo *S. cruzi*, os unicos elementos que se pôde distinguir são os parasitos, que são dotados de intensos movimentos, em numero e estadio evolutivo que variam segundo a idade da infecção.

As excreções de imagens e ninfas de *T. megista* portadoras de infecção antiga são quasi sempre muito ricas em flagelados, cuja grande maioria é composta pelas fôrmas metaciclicas. Em geral as critídias aí são raras, ás vezes mesmo ausentes; em certas ocasiões porém pôdem ser numerosas, isoladas, formando pequenos grupos ou em aglomerados compactos.

Os parasitos provêm da empôla rétal dos inséto, onde, como vimos, existem em grande numero, fixados ás suas paredes ou livres no seu interior. Dissecando-se triatomas com o intestino posterior dilatado pela excreção malpighiana limpida, pouco depois da sucção, e examinando-se ao microscopio evitando-se sua rúlura, pôde-se observar perfeitamente pela transparencia das paredes e do conteúdo do réto, os parasitos nele contidos, com seus ativos movimentos e por vezes em numero consideravel (obj. AA, oc. 20, Zeiss) (v. fig. 9).

O mesmo barbeiro pôde eliminar grande numero de tripanosomas todas as vezes que em seguida a uma refeição emite dejeções limpidas. Uma vez, em urinas que não eram das mais ricas em flagelados, calculámos mais de 3,500 parasitos por mm³.; como a figura 17 mostra, as dejeções de adultos infectados desde muito tempo podem conter verdadeiras massas parasitarias.

Como em regra os metaciclicos existem nas urinas limpidas de triatomas adultos em numero incomparavelmente maior que as critídias, parece que no réto é possivel que as critídias aderentes (haptomonas) tenham a capacidade de se transformar rapidamente em fôrmas de blefaroplasto posterior.

As fôrmas metaciclicas do *S. cruzi* são organismos muito moveis, delgados e alongados, de dimensões variaveis, medindo em média 17 micra de comprimento. Têm nucleo alongado, mediano ou mais proximo á extremidade posterior, blefaroplasto esférico sub-terminal, grande. O flagelo é unido ao corpo do protozoario e têm uma porção livre pequena; o protoplasma, geralmente homogêneo, apresenta ás vezes pequenas granações que não sabemos si são devidas a artificio de técnica.

Nas preparados de dejeções examinados a fresco ou após coloração, nunca vimos fôrmas metaciclicas como sinais de divisão; em *Jrottis*

de réto encontrámos uma vez um parasito tripanifórme provido de 2 nucleos e 2 blefaroplastos, que poderia ser interpretado como resultante da evolução rapida de cirlídia em divisão não terminada. Acreditamos que uma vez atingida a fôrma de tripanosoma os parasitos não sejam mais capazes de se multiplicar. (Brumpt).

Nunca encontrámos fôrmas de resistencia (quistos) no réto ou nas dejeções dos triatomas infectados.

Nas preparações coradas pelo Giemsa após fixação pelo alcool absoluto os tripanosomas mostram-se frequentemente deformados ou completamente dilacerados. Mesmo nos preparados préviamente fixados pelos vapores de tetróxido de osmio — processo recomendavel neste caso — os flagelados podem apresentar deformações.

Conseguem-se preparações boas quando os esfregaços são delgados; deixando-se o material secar sobre a lamina sem ser bem distendido, embora tenha sido antes exposto aos vapores de acido ósmico e seja depois fixado pelo alcool absoluto, os parasitos sofrem alterações, perdendo seus detalhes morfologicos.

A fixação em estado humido exige que a urina seja misturada a um liquido albuminoso (póde-se empregar sem inconveniente o proprio liquido da cavidade geral do barbeiro).

—Numa urina conservada á temperatura ambiente em uma pipeta fechada na ponta, observámos a sobrevivencia de parasitos até 48 horas depois de sua eliminção. Quando as dejeções ficam em pequena quantidade expostas á dessecação os flagelados imobilizam-se e morrem em pouco tempo, antes mesmo que a evaporação tenha sido completo.

Material muito apropriado para certos estudos são as excreções hialinas do *T. megista*, peia sua riqueza em fôrmas parasitarias. Além de constituirem o melhor material para experiencias de transmissão, prestam-se muito para o estudo da resistencia dos metaciclicos e das critídias a diversos agentes (dessecação, temperatura, agua distilada, sais biliars, etc., isolamento de fôrmas de evolução para inoculações e culturas, experiencias de tropismos, etc. Todos estes estudos estão por ser feitos.

—A eliminção de grande numero de fôrmas de evolução do *S. cruzi*, tripanosomas metaciclicos em grande concentração e ás vezes em estado de pureza quasi completo, em certas dejeções do barbeiro, nas ocasiões em que o hematofago se aproxima do Vertebrado, é já uma indicação do papel destas dejeções na transmissão da doença de Chagas. A verificção das propriedades biologicas das fôrmas metaciclicas, principalmente penetrabilidade, pela obtenção de infecções experimentais por meio de tais fôrmas através tegumentos integros de animais, demonstram a realidade do método contaminativo da transmissão desta tripanosomíase.

Infectividade das fôrmas evolutivas do *S. cruzi* no inséto.

Em varias especies de tripanosomas que têm uma evolução ciclica no Invertebrado transmissor, os parasitos ingeridos pelo hematofago em pouco tempo perdem a infectividade, como foi estabelecido para certos tripanosomas transmitidos por Glossinas e para o *Trypanosoma lewisi*, não sendo reinoculaveis aos animais sensiveis senão depois de decorrido um prazo mais ou menos longo, durante o qual passam-se fenomenos evolutivos de que resultam as fôrmas propagativas finais.

Esta « incubação » mostra que os insétoes vectores de certas tripanosomiasas não são simples portadores do germen, mas verdadeiros hospeda-dores intermediarios nos quaes os parasitos evoluem, tornando-se nova-mente aptos a infectar o hospedador Vertebrado.

O *T. lewisi*, que é um flagelado mais próximo do *S. cruzi* que os tripanosomas patogenicos transmitidos por tsétsés, pouco tempo depois de ingerido pela pulga (*Ceratophyllus fasciatus*) perde a capacidade de infec-tar ratos, por inoculação ou por ingestão do inséto, para só a recuperar quando no intestino posterior tenham aparecido as fôrmas terminais do ci-clo evolutivo, os tripanosomas metaciclicos. Assim, os flagelados encontrados no tubo intestinal da pulga, de 1/2 a 1 hora até o quarto dia pelo menos, não infectam ratos quando neles inoculadas; no ciclo do *T. lewisi* as fôrmas finais, unicas infectantes, aparecem ao fim de um prazo minimo de 5 dias no réto do inséto (Minchin e Thomson, 1915).

Os tripanosomas sanguicolas introduzidos com o sangue do rato no estomago da pulga, perdem a infectividade para o roedor mesmo antes de sofrerem as primeiras alterações evolutivas; o *T. lewisi* na fase de criticidia tambem não é infectante.

Para verificar o poder infectante das fôrmas de evolução do *S. cruzi* no intestino do inséto, fizemos uma série de experiencias com o *T. megista*, em condições variadas, e algumas com *Cimex lectularius*.

1)—*T. megista* (adultos)—Um lote de barbeiros provavelmente já in-fectados, que haviam sugado uma cobaia normal 17 dias antes, foi alimentado em 29-X-32 sobre cão bastante infectado pelo *S. cruzi* (13º dia de in-fecção obtida por inoculação de dejeções hialinas com numerosos tripanoso-mas). A diversos prazos depois da refeição infectante fizemos a disseccção de barbeiros deste lote, inoculando em cobaia, separadamente, as duas por-ções do mesenteron (isoladas de modo a evitar a rutura do reto). As ino-culações foram feitas por via peritonial.

As experiencias estão esquematizadas neste quadro:

QUADRO 5

Cobaia nº.	Horas de infecção	Orgão inoculado	Data da inoculação	Novembro 1932								Incubação	
				5	7	8	9	10	12	14	16		
1	3-4	E	29-X	-	+								8-9 dias
2	3-4	EI	29	-	-	-	-	-	-	-	+		15-16 "
3	18	E	30	-	-	-	+	-	-	-			10 "
4	18	EI	30	-	-	-	-	-	-	-		+	16-17 "
5	48	E	31	-	-	-	-	-	-	-		+	15-16 "
6	48	EI	31	†									

E — 1ª. porção do intestino médio (estomago)
 EI — 2ª. porção (estomago intestiniforme), duodeno.

2)—Grupo de fôrmas jovens de *T. megista* (1a. idade, nascidas no laboratorio) foi alimentado pela primeira vez em cobaia infectada (raça de tatú, 29º dia) em 11-I-33. Cada dia, de 12 a 18-I-33, portanto do 1.º ao 8º dia de infecção, dissecavamos uma larva e injetávamos o tubo digestivo macerado em agua fisiologica em uma cobaia, por via sub-cutanea.

As cobaias inoculadas com larvas no 1º, 4º, 5º e 8º dias de infecção morreram antes do prazo necessario á observação.

As inoculações de larvas 2 e 3 dias depois de infectadas foram positivas; os periodos de incubação foram respectivamente de 15-17 dias e de 23-25 dias.

A cobaia injetada com material de larva no 6º dia, examinada espaçadamente, não apresentou tripanosomas no sangue.

3)—Inoculações totais de tubo digestivo de larvas novas de *T. megista* em camonodongos brancos, por via subcutanea.

Sugaram cobaia infectada, em 18-II-33; inoculações diarias do 4º ao 8º dia de infecção, todas positivas (quadro 6).

Pelos resultados destas experiencias vimos que os inséto dissecados desde poucas horas após a sucção de animal infectado, até 8 dias, injetados em animais sensiveis, são capazes de determinar a infecção. Portanto, durante toda a evolução do *S. cruzi* no *T. megista*, ha fôrmas infectantes para o Vertebrado, antes que comecem a se formar os tripanosomas metacíclicos (6-7 dias) no intestino posterior. A inoculação positiva de larva no 6º dia de infecção, que conseguimos na experiencia 3 e falhou na experiencia 2, já havia sido obtida por Chagas (1909).

QUADRO 6

Camon- dongo no.	Dias de infecção	Data da inoculação	Março 1933							Incubação	
			5	8	9	10	11	12	13		
1	4	22-II-33	—	—	+						15 dias
2	5	23	.	+							13 « Mx.
3	6	24	.	—	—	—	—	—	+		17 «
4	7	25	.	—	—	—	—	—	+		16 «
5	8	26	.	—	—	—	—	—	+		15 «

Nota : Os exames dos dias 11 e 12 - III - 33 não foram muito demorados.

No que diz respeito á infectividade para o vertebrado de estádios evolutivos dos flagelados nos inséto, que precedem as fórmulas propagativas finais, existe nitida diferença, em vista destes resultados, entre o que se passa com o *S. cruzi* no *T. megista* e o *T. lewisi* na pulga do rato, segundo as verificações de Minchin e Thomson.

Quaes serão os parasitos infectantes para o vertebrado, existentes no intestino do *T. megista* durante todo o periodo de evolução anterior ao aparecimento das fórmulas metacíclicas do *S. cruzi* ?

Os resultados das experiencias que referimos poderiam ser interpretados como demonstrativos de que este parasito, em todas as fases de evolução no inséto, conserva a capacidade de infectar o Vertebrado, quando nele inoculado. Entretanto, o fato que verificámos e que já assinalámos precedentemente, da persistencia de fórmulas sanguícolas do *S. cruzi* sem sofrer alterações evolutivas ou degenerativas no intestino médio do barbeiro, não justificaria tal interpretação, porquanto a positividade das inoculações de inséto nos primeiros dias poderia correr á conta da persistencia tambem do poder infectante dos tripanosomas sanguícolas ingeridos, á exclusão da participação incriminavel de outras fórmulas parasitarias.

Acompanhando a evolução do *Schizotrypanum* nas diversas regiões do tubo digestivo observámos que no intestino médio do *T. megista* encontram-se até varios dias depois da sucção, flagelados com os caractéres das fórmulas do sangue do Vertebrado; a presença destas fórmulas foi constatada até muitos dias no estomago e até 6 dias no duodeno, isto é, em todo o intestino médio, durante pelo menos o prazo suficiente para que os tripanosomas metacíclicos comecem a se formar no intestino posterior. Por estes fatos compreende-se a permanente infectividade por inoculação dos tripanosomas, que é devida nos primeiros dias aos tripanosomas não evoluídos, e mais tarde aos tripanosomas metacíclicos.

Como já foi dito anteriormente, na porção tubular do mesenteron

encontram-se fôrmas de blefaroplasto posterior sómente nos primeiros dias de infecção; depois, os unicos flagelados aí existentes tem a morfologia de critidia, fâse evolutiva que caracteriza esta região do intestino médio. Baseados nestas verificações, continuámos a fazer experiencias com o fim de esclarecer as propriedades infectantes do Schizotrypanum em diversas fâses de sua evolução, inoculando separadamente em animais as duas porções do mesenteron e verificando o resultado destas inoculações:

4)—Foi inoculado subcutaneamente um camondongo com macerado da porção intestinforme do mesenteron (EI) em agua fisiologica, no dia 12-VIII-33; de larva de *T. megista* 5 dias depois de sugar um cão infectado pela raça de tatú do *S. cruzi*.

Na lamina preservada do material inoculado encontrámos numerosas critidias, e fôrmas sanguicolas mais ou menos conservadas. O camondongo apresentou parasitos no sangue em 26-VIII-33, tendo tido exames negativos até a vespera (incubação 14 dias).

Por esta inoculação ficou verificada a existencia de fôrmas infectantes no intestino médio (duodeno, porção tubular) até o 5º dia de infecção. ⁶

5)—2 camondongos foram inoculados com material de larva de *T. megista* que 19 dias antes havia sugado um cão infectado (raça de cão). O camondongo A foi injectado com o estomago e o B com o duodeno (retirados sem haver rutura do réto e diluidos em agua fisiologica). Na lamina preservada do E (estomago) havia tripanosomas pouco alterados e fôrmas arredondadas; na do EI (duodeno) só vimos critidias, numerosas. Inoculações feitas em 30-VIII-33:

QUADRO 7

1933 — IX										X						XI							
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	2	5	7	9	10	12	14	16	20	22	26	31	6	11
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	.	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	sc	+	+	++	++	†	†

Como se vê, o camondongo inoculado com estomago infectou-se rapidamente; o inoculado com EI (critidias) não se infectou, adquirindo uma infecção mortal quando injectado com fôrmas sanguicolas do *S. cruzi* (Sc). 19 dias depois da refeição infectante existem no estomago de larvas de *T. megista* parasitos patogenicos para o Vertebrado, não os havendo na porção

⁶ Todas as experiencias de inoculação feitas com larvas utilizamo-nos de insectos nascidos e criados no laboratorio.

intestiniforme (EI) do mesenteron; a este tempo a inoculação do conteúdo retal seria seguramente infectante, devido á presença de tripanosomas metacíclicos.

No quadro que resume os resultados das inoculações dos camondongos A e B não estão representados todos os exames: entre os dias 20-IX- e 2-X foram feitos 7 exames, com os mesmos resultados dos dias precedentes. O camundongo A morreu com exame de sangue negativo mas no liquido obtido por punção do peritoneo havia tripanosomas no dia da morte.

O animal inoculado com conteúdo intestinal rico em criticídias (larva, 19º dia) não teve infecção sanguínea aparente até 46 dias depois da injeção; não mostrou resistencia á inoculação de *Schizotrypanum* (sangue de cão, raça de tatú, infecção no 11º dia, 11a. passagem), morrendo infectado em 21 dias.

A positividade da inoculação de estomago 19 dias depois da refeição infectante é por nós atribuída a fórmias de blefaroplasto posterior provenientes do sangue, que não passaram ao duodeno e permaneceram ligeiramente alteradas no E até este tempo; as figuras 9 e 10 da estampa 19 representam tripanosomas encontrados no estomago de uma larva 21 dias após a refeição contaminante.

Fizemos novas inoculações parciais de intestino médio de insetos, a tempos muito variados depois da ingestão de sangue infectado. Em algumas experiencias os barbeiros depois de infectados foram alimentados em animais normais; as larvas eram puras, nascidas e crescidas no laboratorio, tendo sido alimentadas uma só vez em cães infectados, e o adulto era portador de infecção antiga.

O quadro 8 da pag. 66 reúne os principais dados sobre esta série de inoculações e seus resultados.

As porções do intestino médio eram retiradas cuidadosamente e transportadas para uma lamina, onde eram desmanchadas em gotas de sôro fisiológico; depois de aspiradas por meio de uma seringa para ser feita a inoculação, o restante do material sobre a lamina era fixado e corado (lamina preservadas). A parte mais delicada da dissecação é a separação do duodeno do intestino posterior; a secção deve ser feita um pouco aquem da inserção dos tubos excretores, evitando-se a lesão do réto. Quando este se rompia, ou quando havia suspeitas de tal, o material era desprezado.

O estomago deve ser retirado em primeiro lugar, em seguida o duodeno, ficando o réto no seu lugar, intácto.

Segue-se o resultado dos exames das laminas preservadas das larvas inoculadas, segundo o numero dos camondongos que figuram na tabéla:

- 1—Tripanosomas arredondados, leishmaniformes.
- 2—Critidias.
- 3—Não foram achados parasitos.
- 4—Critidias.
- 5—Leishmanias.
- 6—Critidias.

O material do adulto (inoculado nos camondongos n^o 7 e 8) foi examinado sómente a fresco. Esta experiencia de inoculação de EI não póde ser levada em conta porque os tubos de Malpighi, que estavam repletos de flagelados, foram cortados junto com o intestino tubular, ocasionando a mistura de parasitos de ambas as porções: sabendo-se que a evolução malpighiana é do tipo retal, a positividade da inoculação em questão foi seguramente devida a tripanosomas metaciclicos. No estomago deste adulto foram vistos raros flagelados critidiomórficos, sendo de notar que o órgão estava vasio, retraído, escurecido na sua parte posterior por conteúdo de aspéto semelhante ao do duodeno; a presença de leishmanias não foi constatada em estado fresco.

Nestas experiencias incorremos em um erro elementar por termos conservado todos os camondongos juntos, num recipiente pequeno, durante todo o tempo de observação. Os resultados das inoculações de que podemos dizer com segurança são os dos camondongos n^o:

3: Inoculação positiva de estomago 73 dias depois da refeição infectante e 19 dias depois da alimentação em animal normal. (raça de cão).

5: Inoculação positiva de estomagos de larvas 32 dias depois da sucção de animal infectado e 19 da de animal são. (raça de cão).

6: Resultado negativo da inoculação da 2a. porção do intestino médio das larvas da experiencia precedente, cujos estomagos foram infectantes para camondongo (n^o 5).

Os camondongos n^o 2 e 7, que tiveram exames de sangue positivos respectivamente 50 e 48 dias depois de inoculados, com muita probabilidade adquiriram a infecção contaminando-se com o sangue dos que já estavam com tripanosomas na circulação desde muitos dias antes.

O camondongo n^o 8 infectou-se com material de duodeno e tubos de malpighi de um adulto muito infectado. A infecção deverá ter sido devida a tripanosomas metaciclicos dos vasos excretorios.

Para a devida averiguação de certos pontos obscuros deixados por estas experiencias e confirmação de seus resultados, fizemos nova série de inoculações parciais em circunstancias mais diversas e condições melhores, de que posteriormente daremos conta.

Presentemente, em vista dos resultados das experiencias que referimos, julgamos adquiridas as seguintes noções:

a) — No tubo digestivo do *T. megista* existem fôrmas do *S. cruzi* infectantes para o Vertebrado por inoculação desde as primeiras horas até tempo indefinido depois da refeição contaminante.

b) — No estomago do barbeiro permanecem por muitos dias (73) parasitos que, inoculados ao Vertebrado, produzem a infecção. Estes parasitos são nos primeiros dias fôrmas sanguícolas e mais tarde fôrmas arredondadas (leishmanias) delas dirétamente derivadas.

c) — No duodeno (estomago intestinoforme) as fôrmas responsaveis pela positividade das inoculações desta região durante os primeiros dias (5) são provavelmente tripanosomas sanguícolas não evoluídos, porque as inoculações feitas depois que só existem critídias, ás vezes muito numerosas, não são positivas (19 e 32 dias; 8 dias?).

Correspondendo estes fátos sempre á realidade, podemos, de um modo geral, dizer o seguinte da condição infectante dos parasitos nas diversas porções do tubo digestivo:

Estomago: Contem fôrmas infectantes por inoculação desde o inicio até muito tempo depois da ingestão dos tripanosomas sanguícolas. Póde-se assegurar que o estomago permanece indefinidamente infectante por inoculação, nos inséto regularmente alimentados em animais infectados. A permanencia de parasitos vivos e infectantes foi constatada mesmo depois que o inséto sugou animal normal, após muitos dias o repasto infectante. Os parasitos patogenicos são fôrmas sanguícolas mais ou menos alteradas ou leishmanias.

Duodeno: Infectante durante os primeiros dias pela persistencia de fôrmas de blefaroplasto posterior (sanguícolas); infectividade verificada até o 5º dia. Mais tarde perde a capacidade de infectar o Vertebrado por inoculação, apresentando então sómente critídias no seu interior (19 dias; 8 dias?). Nunca se encontram fôrmas metacíclicas no intestino médio.

Intestino posterior: Não infétante nos primeiros dias, antes que se formem os tripanosomas metacíclicos (6-7 dias nas larvas, 10-15 nos adultos). Estabelecida a fásé rétal esta porção do intestino mantem-se infectante indefinidamente.

—As fôrmas metacíclicas são os verdadeiros parasitos infectantes do ciclo evolutivo, por serem propagadas naturalmente (Brumpt); além

de eliminadas em numero colossal pelas dejeções, (Brumpt, Dias), têm propriedades de resistencia e penetrabilidade que facilitam seu papel etiologico.

—As experiencias que acabamos de descrever tendem a demonstrar que o *S. cruzi* no organismo do inséto transmissor, sob a morfologia de critidia, não tem a capacidade de evoluir no vertebrado quando nele inoculado. Estes experiencias estão naturalmente sujeitas a variações de resultados, devido a certas circunstancias com as quais temos que contar mas que são inevitáveis, além de causas de erro eventuais que poderão ocorrer durante a manipulação. De fáto, para demonstrar a não infectividade das critídias, inoculamos uma região do intestino médio compreendida entre duas outras onde sabemos existem fórmias infectantes do parasito, que são o estômago e o réto. A dissecação deve ser além de perfeita, executada com muita delicadeza, para que não passe para o duodeno nada do conteúdo das outras porções. Devemos contar também com o parasitismo dos tubos de Malpighi, devido ao qual uma de nossas inoculações foi positiva; especialmente nos adultos de *T. megista*, é muito difícil a separação do duodeno sem se romper os vasos excretores. A possibilidade de se obter resultados positivos pela inoculação da 2.^a porção do mesenteron, muitos dias após a refeição infectante, existirá realmente, independentemente das causas de erro que enumerámos, pelo fáto de que poderão passar fisiologicamente a esta região fórmias parasitarias virulentas presentes no conteúdo estomacal. Assim pois, as infecções obtidas por inoculação do duodeno, não poderão ser desde logo atribuidas aos organismos critidomórficos do *S. cruzi*, tendo-se em mente os fatos que acabamos de citar; os resultados demonstrativos nestas experiencias de inoculação parcial são os negativos, no caso do duodeno, pela verificação de que pôde-se inocular grande quantidade de critídias sem se conseguir a infecção. No caso do estômago os resultados positivos são indicação segura de que no interior deste órgão permanecem por longos dias parasitos infectantes.

Em vista dos resultados que conseguimos consideramos a fórmula de critidia no *S. cruzi* no barbeiro como não infectante; Chagas (1909), considerando-a estadio terminal do ciclo asexuado, já afirmara este fáto. Brumpt (1922) também é da mesma opinião, assegurando embora que « as critídias, chegadas a um certo estágio de evolução, são infectantes » (Blanchard, 1912). Conforme outros autores indicaram, experiencias decisivas sobre a infectividade de fórmias evolutivas de flagelados devem ser feitas pelo isolamento individual das mesmas por meio de pipetas capilares e posterior inoculação em animal sensível; no caso do ciclo evolutivo do *S. cruzi* no *Triatoma*, acreditamos éntretanto que conclusões definitivas poderão ser baseadas também em experiencias de inoculações

parciaes de tubo intestinal, feitas em maior numero e em condições mais variadas.

Ponto interessante a ser pesquisado é o referente ao resultado das inoculações de intestino anterior de triatomas infectados, para a indagação da possibilidade da existencia de fórmias infectantes nesta porção.

Por emquanto, o fáto mais importante adquirido por nossas experiencias, talvez o unico definitivo, é o da permanencia de fórmias infectantes no estomago por muito tempo. Mais além voltaremos novamente a este fáto.

2) — *Cimex lectularius*.

A evolução do *S. cruzi* em artrópodes que não são seus transmissores ou portadores habituais foi verificada primeiramente por E. Brumpt (1912), que experimentou com *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* e *Ornithodoros moubata*.

As conclusões mais gerais de Brumpt foram confirmadas por Mayer e Rocha Lima (1914) e B. Blacklock (1914): ficou demonstrado que o *S. cruzi* evolue no tubo digestivo do *C. lectularius*, que a evolução se dá facilmente e que os percevejos permanecem infectados por longo tempo.

—A disposição anatomica geral do tubo digestivo deste Hemiptero é muito semelhante á do *Triatoma*⁸: O intestino médio divide-se em duas porções bem differentes, o estomago, ampular, e o duodeno, tubular, alongado. O intestino posterior é reduzido á empôla rétal, separada do mesênteron pela embocadura dos tubos excretores. Não ha proventriculo; o intestino médio serve como reservatorio de alimento e órgão de digestão, (estomago) e região de absorção (duodeno). As dejeções acumulam-se no réto e são eliminadas pelo anus; após a sucção os percevejos emitem pequenas gotas de liquido limpido, provavelmente de origem malpigiiana.

—O material que serviu para nossos estudos sobre a evolução do *Schizotrypanum* no percevejo constava de cerca de 200 exemplares de *Cimex lectularius* adultos que nos foram mandados pelo Dr. Octavio Magalhães⁹ de Belo Horizonte, onde foram colhidos n'uma habitação infestada. Não encontrámos flagelados no tubo digestivo dos individuos dissecados antes de serem expostos á infecção experimental.

—Nas diversas partes do condúto intestinal processa-se o desenvolvimento do *S. cruzi* no percevejo do mesmo modo que no barbeiro, sucedendo-se as fases estomacal, intestinal e á rétal com os aspétos morfológicos que lhes são peculiares.

⁸ Ver Patton e Evans, 1929.

⁹ A quem muito agradecemos o obsequio.

No estomago as fôrmas sanguícolas sofrem as primeiras fâses da transição para critíδια ou transformam-se em organismos arredondados, providos ou não de flagelo. Fôrmas parasitarias pôdem aí permanecer por muitos dias, com a morfologia de tripanosoma sanguicola até 7 dias pelo menos e de leishmania durante varias semanas; pelos quadros apresentados por B. Blacklock (1914) vê-se que este autor encontrou parasitos no estomago até 42 dias depois da alimentação sobre animal infectado. A hemolise ao correr dos processos digestivos do percevejo é em geral completa em 3 dias.

Para o duodeno passam flagelados em transição para critíδια, tripanosomas e critídias completamente formadas. Nesta região dominam parasitos critidiomórficos de diversos tipos, que se multiplicam intensamente.

As primeiras fôrmas parasitarias foram por nós encontradas no réto 48 horas depois do repasto; Brumpt refere havel-as achado ao fim das primeiras 24 horas. As critídias continuam a se dividir no intestino posterior e no 5.º ou 6.º dia começam a se transformar em tripanosomas metacíclicos.

Nas nossas experiencias nunca observámos grande acúmulo de fôrmas metacíclicas no proctodoeum, onde as critídias sempre predominavam.

Segundo Brumpt e Mayer e Rocha Lima o tubo intestinal do *C. lectularius* constitue ótimo meio de desenvolvimento para o *S. cruzi*, dando-se a infecção em quasi 100 % dos inséto que sugam animal infectado. Nas nossas observações a percentagem da infecção foi bastante inferior, como o foi nas de Blacklock, como pôde ser deduzido das tabélas do seu trabalho. A intensidade do parasitismo é muito diversa nos exemplares que sugam o mesmo animal, ao fim do mesmo prazo.

Transmissão ao Vertebrado:

Fizemos inoculações de conteúdo intestinal de percevejos durante os primeiros dias de infecção, conforme passamos a referir:

I.)—*Cimex* alimentados em cobaia infectada foram dissecados, triturados em agua fisiológica e o conteúdo do tubo digestivo inoculado no peritonio de cobaias sãs do 3.º ao 8.º dia de infecção. As inoculações feitas depois de comprovada a existencia de flagelados, tiveram resultados positivos (6.º e 7.º dia de infecção, periodo de incubação dos animais inoculados respectivamente 22 e 21 dias) e resultados negativos (3.º e 4.º dia).

Os animais injetados com *Cimex* no 5.º e 8.º dias morreram 13 e 12 dias depois da inoculação.

2)—Tubo digestivo de percevejos alimentados em cobaia infectada

(raça de tatú) inoculado em cobaias normais durante os 6 primeiros dias. Resultados:

Positivos: 3.º e 6.º dias (incubação 25-30 e 18-20 dias resp.).
Negativo: 2.º dia.

O resultado das outras inoculações não pode ser observado por morte dos animais antes de prazo suficiente.

— Blacklock fez inoculações de *Cimex* infectados também com resultados inconstantes: em 32 animais inoculados (camondongos e cobaias) obteve 9 resultados positivos, com percevejos de 21 horas a 77 dias depois de sugar sangue parasitado. As inoculações positivas obtidas com *Cimex* antes do tempo necessário á formação de metacíclicos foram com 21 e 72 horas após a sucção.

Antes de proceder á injecção o autor verificava a presença de parasitos no material, observando em 3 percevejos inoculados com resultado positivo a existencia de fórmulas semelhantes ás « blood-forms » que não eram senão tripanosomas metacíclicos. As incubações médias foram de 22 dias para camondongos e 25 dias para cobaias. O autor não pode chegar a conclusão quanto ás formas responsáveis pela infecção.

Meyer e Rocha Lima obtiveram inoculação positiva de percevejo, no qual só viram formas de critídiã, alimentado 9 dias antes em animal parasitado. Ao fim deste prazo é muito provavel que já existissem fórmulas metacíclicas no réto, cuja exclusão não póde ser feita pelo exame de esfregaços.

Segundo Brumpt as fézes dos percevejos são infectantes desde 8 a 10 dias depois de contraída a infecção.

— Como acabámos de ver, as experiencias de inoculação de percevejos infectados dão resultados comparaveis ás feitas com triatomas, distinguindo-se apenas pela inconstancia dos resultados positivos. Estes, quando obtidos com percevejos antes do 5.º dia (conseguidos com 21 e 72 horas por Blacklock e com 3 dias por nós) devem ser attribuidos a fórmulas do sangue não evoluídas, como acontece no caso dos barbeiros com mais frequencia.

A inconstancia dos resultados positivos das inoculações de *Cimex* infectados, antes ou depois de estabelecida a infecção, mostra que o *S. cruzi* não encontra condições de evolução tão favoraveis neste Hemiptero quanto no *T. megista*.

Mayer e R. Lima tentaram sem resultado a transmissão do *Schizotrypanum* a animais naturalmente, isto é, sem inoculação, alimentando sobre eles percevejos infectados.

Em 28 experiencias análogas Blacklock conseguiu 1 vez a infecção em cobaia. Este autor observa que os *Cimex* defecam comumente sobre o animal, em muitos casos contendo as dejeções numerosos parasitos e sendo infectantes por inoculação; conclue que « embora os percevejos sejam capazes de conservar parasitos infectantes por longo tempo, não se consegue em geral transmitir a infecção a animais sãos, mesmo nas melhores condições de transmissibilidade ».

A. Robertson (1929) verificou a evolução do *S. cruzi* isolado da gambá no *Cimex rotundatus*, observando a eliminação de formas metacíclicas no liquido limpido eliminado pelo inséto após a sucção (« secreção malpighiana? »). Brumpt (1913) tendo conseguido facil desenvolvimento do parasito neste Hemiptero, chegou a supôr que na natureza o *C. rotundatus* exercesse como transmissor papel tão consideravel quanto o do *T. megista*.

Nas habitações de Lassance e arredores nunca encontrámos percevejos portadores de flagelados, mesmo nas cafúas em que os barbeiros se apresentavam em alta percentagem infectados pelo *S. cruzi*. A suposição de Brumpt não encontra apoio nos fatos experimentais ou de observação.

— Brumpt (1914) fazendo *C. lectularius* sugar dejeções de *T. megista* ricas em metacíclicos (em mistura com sangue desfibrinado de boi) verificou que em 3 dos 14 insétos em experiencia a infecção se estabeleceu; não observou modificações nas formas metacíclicas ingeridas, attribuindo o desenvolvimento a critídias existentes nas dejeções, que teriam passado despercebidas.

— Não foi observada a transmissão hereditaria da infecção no *Cimex*.

TRANSMISSÃO DO *S. CRUZI* ENTRE OS INVERTEBRADOS

Ha tres possibilidades para a realização da transmissão de parasitos digenéticos entre os hospedadores invertebrados: a transmissão por herança, de uma geração a outra através os ovos, e a transmissão de individuo a individuo dirétamente, pela subtração do conteúdo gastrico através o exoesqueleto (canibalismo), ou indirétamente, pela ingestão de dejeções (coprofagia).

Desde suas primeiras pesquisas Chagas verificou que larvas de *T. megista* nascidas no laboratorio nunca se apresentavam infectadas pelo *S. cruzi* e que permaneciam indenes quando sempre alimentadas em animais normais. Mayer e Rocha Lima (1914) não conseguiram a infecção em camondongos pela inoculação de óvos provenientes de *T. megista* infectado; neste inséto Torres (1915) em numerosas observações tambem não ve-

rificou a transmissão hereditaria do parasito, assim como Lafont (1912) não a havia notado no *T. rubrofasciata*. A' exceção de Mayer (1922) todos os autores que têm investigado esta questão só tem tido observações negativas.

As experiencias que fizemos a respeito, tambem com resultado negativo, são as seguintes:

1) — 25 larvas novas de *T. megista*, de menos de 15 dias de idade e nunca alimentadas, foram trituradas em agua fisiologica e inoculadas no peritonio de uma cobaia, em 26-VII-32. Estas larvas nasceram de ovos de femeas infectadas; do mesmo lote foram dissecadas outras 7 e examinadas a fresco, não tendo sido encontrados flagelados. A cobaia inoculada teve exames de sangue negativos até 24-XI-32.

2) — 30 ovos postos por *T. megista* infectados foram inoculados após maceração no peritonio de uma cobaia, depois de ter sido feito o exame a fresco de material com resultado negativo. A inoculação foi feita a 26-VII-32; a cobaia teve exames negativos até 20-XI-32 e inoculada neste dia com macerado de percevejo no 6.º dia de infecção, apresentou-se infectada em 12-XI-32.

Em resumo, pela inoculação em cobaia de 25 fôrmas jovens de *T. megista* nascidas no laboratorio e de 30 ovos de barbeiros infectados, não constatámos a transmissão hereditaria do *S. cruzi* neste inséto.

O canibalismo foi observado pela primeira vez em inséto do genero *Triatoma* por A. Machado (*T. megista*, *T. sordida*), tendo sido depois verificado por Brumpt em outras especies (*T. infestans*, *T. chagasi*) e no *Rhodnius prolixus*.

M. Torres (1915) observou no laboratorio a pratica do canibalismo nas espécies *T. megista* e *T. sordida* durante a 1.ª e 2.ª fásse larvaria, com muito maior frequencia neste Hemiptero que naquele. Segundo Torres este meio de alimentação é absolutamente excepcional em condições naturais e não pôde ser invocado para explicar a generalidade do parasitismo natural dos barbeiros; as larvas que praticam a refeição canibal alimentam-se não do sangue mais ou menos digerido que se encontra no estomago, mas da hemolinfa, onde não existem fôrmas de evolução do *S. cruzi*. Outra observação em que apóia sua conclusão é a de que na natureza o *T. megista* é raramente parasitado durante as primeiras fáses de sua evolução, justamente naquelas em que unicamente se tem observado o canibalismo.

Em diversas experiencias que fez no laboratorio Torres não conseguiu a transmissão do *Schizotrypanum* de inséto a inséto por este meio. Excetuadas as circunstancias em que as larvas exercem um hematofa-

gismo indireto pela sucção do sangue ingerido de pouco por outro barbeiro, este pesquisador nunca observou a punção do tubo digestivo, enchendo-se a larva canibal de liquido celômico e não de conteúdo intestinal.

Em experiencias feitas recentemente pelo Dr. Chagas foi verificada a transmissão da infecção a larvas de *T. megista* que praticaram o ato canibal em ninfas do mesmo inseto, havendo nós mesmo tambem conseguido este resultado.

A coprofagia foi assinalada por Brumpt (1914) no *Rhodnius prolixus*, não o tendo sido ainda nas especies do genero *Triatoma* (Brumpt, Torres). A possibilidade do *S. cruzi* transmitir-se de um inseto a outro por intermedio das dejeções foi primeiramente entrevista por Lutz (citado por Chagas, 1909); este autor tambem não observou o coprofagismo.

Por duas vezes encerrámos larvas famintas de *T. megista* em placas de Petri contendo dejeções limpidas do inseto adulto, não havendo nenhuma delas aspirado o liquido.

A demonstração experimental de que flagelados do intestino do inseto pódem evoluir e determinar a infecção em outro foi dada por Brumpt (1914), fazendo percevejos ingerir dejeções infectadas de *T. megista* misturadas com sangue desfibrinado de boi. Brumpt verificou que dentre 14 *Cimex* experimentados, a infecção se estabeleceu em 3, em percentagem muito inferior portanto á que verificára em insetos da mesma especie alimentados sobre animal infectado pelo *S. cruzi*.

Este autor não observou em percevejos sacrificado pouco tempo depois de ingerir os flagelados das dejeções (20 horas) alterações morfológicas nos tripanosomas metacíclicos que indicassem sua regressão ao tipo crítdia, admitindo que os parasitos desta categoria existentes nas dejeções e que passaram despercebidos ao exame imediato é que tenham proliferado e evoluído em tres dos percevejos que exerceram artificialmente o coprofagismo.

Com o *S. cruzi* fizemos apenas 1 experiencia análoga, utilizando-nos dejeções hialinas de *T. megista* ricas em fórmãs de tripanosoma, misturadas com sangue desfibrinado de camondongo, e de um exemplar adulto de *T. sordida*. O material foi colocado em um tubo estreito e sugado por este através pele fresca de camondongo. No estomago e no duodeno do inseto sacrificado 4 dias depois encontrámos raros tripanosomas metacíclicos não alterados; no intestino posterior havia numerosos flagelados, certamente devido a infecção antiga.

—Quaes as fórmãs de evolução do *S. cruzi* capazes de transmitir a infecção entre os Invertebrados?

A resposta em parte a esta questão é dada pelas seguintes palavras de Chagas (1909): «... os estádios de crítdias, no *Conorrhinus*,

nenhuma significação têm para a infecção do Vertebrado; representam talvez, um retrocesso á condição larvaria primitiva, devido ás influencias do meio, podendo ainda servir, caso haja infecção pelos excrementos, para manter a vida do protozoario nas gerações sucessivas de conorrínos » (p. 58).

De fáto, as critídias são o tipo de flagelado proprio do inséto, e a elas deve ser atribuida a transmissão, quando possível, do parasito entre os Invertebrados.

Caracteristica de grande importancia do ciclo evolutivo de Tripanosomidas de Vertebrados (*Tripanosoma*, *Schizotripanum*) no hospedador intermediario é que as fórmãs finais, propagativas, são do tipo tripanosoma.

Estas fórmãs, como em geral é admítido, não mais se multiplicam no invertebrado (Brumpt), sendo aptas unicamente a transmitir a infecção ao Vertebrado. Conforme experiencias que descreveremos adiante é muito provavel que os metacíclicos não possam voltar ao tipo de flagelado que o precede, critidiomórfico, o que também as experiencias de Brumpt, com percevejos, tendem a demonstrar. As fórmãs de tripanosoma que fecham o ciclo do Invertebrado são portanto verdadeiramente «metacíclicas» (Brumpt), pois sendo reais as propriedades que enumerámos, serão em consequencia incapazes de evoluir em cultura e de transmitir a infecção entre os inséto, só podendo infectar o hospedador Vertebrado.

Entre os Tripanosomidas destes generos e os outros, proprios de Invertebrados, monogenéticos, ha pois esta diferença fundamental concernente ás fórmãs terminais do ciclo evolutivo, que nestes são quistos pelos quais se propagam os flagelados, e naqueles são fórmãs metacíclicas adaptadas exclusivamente a infectar o Vertebrado. Não se poderá dizer com Brumpt (1913) que «os metacíclicos ficam numa *phase d'attente* comparavel ás fórmãs enquistadas dos flagelados de inséto, eliminadas pelas fézes» . . . e muito menos que «este fáto demonstra que a doença do Vertebrado é um phenomeno accidental e estes tripanosomas são ainda mal adaptados». A doença do Vertebrado, ou melhor seu parasitismo, constitue phenomeno indispensavel á sobrevivida das fórmãs metacíclicas do transmissôr, que são lançadas com as dejeções no mundo exterior e inaptas á evolução em outro inséto; no caso do *S. cruzi* a transmissibilidade por contaminação encontra condições o quanto possível favoraveis que são, principalmente, como vimos, a eliminação de grande numero de fórmãs infectantes nas ocasiões em que o inséto procura o Vertebrado e o grande poder de penetração que possuem estes parasitos. Conhecendo-se além disso os habitos estritamente domiciliarios do *T. megista*, o principal transmissôr do *S. cruzi*, não se poderá achar razões para dizer que a doença humana também é um accidente, sendo o homem «um hospedador tão favoravel quão accidental» (Brumpt).

A existencia de fôrmas de leishmania no ciclo do *S. cruzi*, quer pela fâse de evolução em que aparecem, quer pelas propriedades infectantes de que gosam, não pôdem servir de argumento a favor do proximo parentesco entre este parasito e os flagelados do genero *Crithidia* e *Herpetomonas* (*Leptomonas*).

A permanencia de fôrmas infectantes no estomago por longo tempo, por nós observada, terá alguma significação para a transmissão do *Schizotrypanum* ? Esta é uma questão de grande interesse teorico. As hipóteses do papel destas fôrmas na transmissão ao Vertebrado (infecção pela picada, por regurgitamento do conteúdo estomacal) e na transmissão entre os Invertebrados (canibalismo) deverão ser consideradas, e verificadas suas possibilidades por experiencias numerosas.

Considerando-se a função dos quistos e a dos metacíclicos, portanto também suas propriedades, não poderão ser comparados uns e outros elementos parasitarios; por uns o flagelado se propaga entre artrópodes, (quistos) não sendo eles inoculaveis ao Vertebrado; por outros, ao contrario, a infecção se transmite exclusivamente ao Vertebrado (metacíclicos).

Deixaremos assinalado que os fâtos da incapacidade dos metacíclicos eliminados com as dejeções serem incapazes de manter a infecção entre os invertebrados, no caso dos Tripanosomidas de evolução posterior, e a não transmissão entre os invertebrados dos Tripanosomidas que evoluem na porção anterior, são fatos que poderão ser com mais facilidade interpretados si o Vertebrado fôr considerado o nospedador primitivo destes flagelados (theoria de Minchin); tanto mais que considera-se a evolução posterior mais primitiva e a evolução anterior mais incompleta ou mais recente em relação ao invertebrado.

Não queremos entrar nestas debatidas questões de filogenia de Tripanosomidas.

Para concluir, não julgamos que se possa dizer que o *S. cruzi* é um banal flagelado intestinal primitivo do inséto, acidentalmente transmitido ao Vertebrado (Brumpt): por todas as suas propriedades biologicas o *S. cruzi* é um parasito digenético bem adaptado a ambos os hospedadores.

Transmissão do *S. cruzi* do invertebrado ao vertebrado

A transmissão experimental do *S. Cruzi* de inséto infectado a animais sensíveis tem sido conseguida por tres maneiras:

- 1)—Por inoculação do conteúdo intestinal ou das dejeções.
- 2)—Por ingestão do Invertebrado ou de suas excreções.
- 3)—Por alimentação dos transmissôres sobre os animais.

A transmissão por inoculação foi obtida desde os primeiros estudos sobre o *Schizotrypanum* (Chagas). A inoculação de dejeções limpadas foi feita primeiramente por Brumpt e Pirajá da Silva (1912) e depois por Souza Araujo (1918), que infectaram, aqueles, camondongos por inoculação intraperitoneal de liquido de uma ninfa de *T. megista*, este, uma cobaia com dejeções de um exemplar de *T. infestans*. Nós mesmo temos conseguido infecções intensas e mortais por injeção de excreções hialinas de *T. megista* sob a pele ou no peritoneo de animais (cão, camondongo, cobaia).

O aspecto novo da transmissão por inoculação é o que referimos a respeito das inoculações parciais do tubo digestivo de *T. megista*, que demonstraram a longa permanencia de fórmulas infectantes no estomago e que são até certo ponto, atualmente, demonstrativas da não nifectividade das crítidias.

A transmissão do *S. cruzi* entre animais silvestres póde-se dar por ingestão do inséto infectado, sendo com muita probabilidade o que acontece com os tatús e os macacos (*Chrysothrix*). No laboratorio observámos tatús devorarem exemplares adultos de *T. megista*, quando permaneciam juntos num recipiente de um dia para outro. Brumpt (1919) julga muito importante este método de propagação natural entre ratos e camondongos; só-

mente agora, depois dos trabalhos de Kofoid e Donat (1933) entrevê-se a probabilidade de serem ratos do mato (*Neotoma fuscipes*) hospedeiros do *S. cruzi*, na California.

Por este processo ou pela ingestão de dejeções infectadas conseguem-se facilmente infecções experimentais em cobaias e camundongos brancos; em ratos, dada sua maior resistencia, os resultados são muito mais incertos.

A transmissão da infecção a um *Callithrix* foi a primeira verificação, feita por Oswaldo Cruz, em barbeiros que lhe enviára Chagas, da patogenicidade dos flagelados que este pesquisador encontrára no tubo digestivo do *T. megista*; foi verificada a transmissibilidade por meio da sucção do Vertebrado pelo Hemiptero.

Sobre o mecanismo verdadeiro da transmissão natural divergem as opiniões dos autores. Atualmente ha duas escolas, a de Chagas, que admite a transmissibilidade pelo proprio áto da picada, por meio de fórmulas infectantes localizadas nas glandulas salivares, que seriam inoculadas durante a sucção, e a de Brumpt, segundo a qual a propagação se faz exclusivamente pelas dejeções, onde ha grande numero de tripanosomas meta-ciclicos provadamente infectantes.

Consideraremos em primeiro lugar os dados experimentais existentes sobre a transmissibilidade pela picada.

Magarinos Torres (1915), colocando-se em boas condições de experimentação, verificou a infectividade da picada de barbeiros parasitados. Os insetos eram colocados dentro de tubos onde não poderiam se virar e sugavam o animal através uma gaze, tendo com ele contáto unicamente pela probócida.

Na primeira experiencia fez com que 6 adultos e 13 ninfas de *T. megista* sugassem um gato de 1 mês, colocando 1 em cada tubo fechado com gaze, em 28-VI-13; no dia 21-VII-13 o gato apresentou ao exame a fresco tripanosomas no sangue. Na segunda, um gatinho de 4 dias de idade infectou-se pela picada de 13 larvas de *T. megista* (exame positivo 8 dias depois). Obteve 3º resultado positivo em cobaias sugada por 7 barbeiros adultos, na qual encontrou fórmulas parasitarias no musculo cardiaco ao exame histológico, tendo a infecção sanguinea sido inaparente. Esta experiencia durou de 30-VI-13 a 8-IX-13.

Torres não encontrou flagelados na cavidade celomica de triatomas infectados, nem nas glandulas salivares. Nestes órgãos, como já o dissemos, B. Barreto, citado por M. da Cunha, encontrou fórmulas parasitarias.

Além das experiencias de Chagas, não se acham na literatura mais referencias a resultados positivos obtidos pela propria picada do *T. megista*. Nossas experiencias e seus resultados serão dados adiante.

A transmissão pelas dejeções foi primeiro constatada por Brumpt (1912), que colocou fézes de *T. megista* infectadas na mucosa ocular de um macaco (*Cercopithecus ruber*), depois na mucosa bucal e retal de camondongos novos (1913). Mais resultados positivos por contaminação por parasitos das dejeções através as mucosas íléas foram obtidos por Mayer e Rocha Lima, Neiva, Torres etc. recentemente por nós mesmo (1932) e Kofoid e Donat (1933). A penetrabilidade de fórmias infectantes do *S. cruzi* através a pele intata de camondongo brancos recém-nascidos (de 2 dias de idade) foi verificada por Brumpt (1913), deixando os animais suspensos em atmosfera humida durante 3 horas para evitar a dissecação das dejeções: obtive 1 resultado positivo em 11 camondongos experimentados.

Nossas primeiras experiencias de transmissão são as seguintes, já em parte publicadas (1932):

A)—Por picada: Utilisámo-nos de exemplares adultos de *T. megista* que haviam sugado 25 dias antes uma cobaia no 40º dia de infecção, mas provavelmente de infecção muito mais antiga.

Foram alimentados em 3 cobaias:

nº 1—370 gr.—sugada por 3 barbeiros

nº 2—475 gr.—sugada por 2 barbeiros

nº 3—445 gr.—sugada por 2 barbeiros.

Os animais eram amarrados de barriga para cima sobre uma prancha e colocados em um canto menos iluminado do laboratorio, sendo as experiencias feitas com 1 animal de cada vez. Soltávamos os inséto perto dele e assistiamos á sucção: os barbeiros ficavam sobre a prancha, em contacto com a cobaia sómente pela tromba. Esperavamos que terminassem a refeição (que ás vezes era interrompida por bruscos movimentos, mas logo recomeçada) após a qual os hematofágo procuravam afastar-se, sendo então recolhidos. Nestas experiencias nenhum barbeiro defecou durante ou imediatamente após a sucção.

B)—Por deposição de dejeções hialinas sobre a pele.

A técnica empregada foi a seguinte: As cobaias eram amarradas, barriga para baixo, e os pêlos de pequena região dorsal cortados a tesoura não muito rente; aí colocavamos o liquido infectante, esperando até que secasse completamente, o que requeria alguns minutos. A região dorsal, proxima da nuca, não podia ser lambida pelo animal depois de solto, evitando-se assim a possibilidade da contaminação pela mucosa digestiva—possibilidade essa aliás duvidosa depois do secamento. Nenhuma precaução foi tomada para evitar a dessecação natural.

Foram submetidas á experiencia 3 cobaias:

nº 4—470 gr.—Foi depositada sobre a péle 1 pequena gota limpida, proveniente da 4a. eliminação de um dos barbeiros que sugaram a cobaia nº 1; 1 hora depois foi pósta nova gota, de um inséto, que sugou a cobaia 2.

nº 5—410 gr.—foram depositadas, a intervalos, 5 gotas de urinas eliminadas pelos triatomas que se alimentaram nas cobaias nº 1, 2 e 3.

nº 6—380 gr.—servimo-nos do 2º liquido eliminado por um dos barbeiros da cobaia nº 2, que continha numerosos parasitos e ligeiros traços de fézes. Em menos de 15 minutos havia secado.

C)—Por deposição do liquido hialino sobre a mucosa ocular: Cobaia nº 7, 780 gr.—Instilámos em um dos ólhos uma pequena gota do mesmo liquido que servirá para a cobaia nº 6.

O exame a fresco do sangue da cobaia nº 7 foi feito diariamente, antes de começarmos a examinar o sangue das outras (o que deveriamos ter feito). O 1º exame positivo da cobaia 7 foi obtido 16 dias depois da instilação no globo ocular; neste dia examinámos o sangue de todas as outras, com o seguinte resultado: Positivo, cobaias nº 4 e 5; negativo, cobaias nº 1, 2, 3, e 6. O animal no sangue do qual os tripanosomas eram mais numerosos nesse dia, era o nº 5. No 18º dia a cobaia nº 6 teve o 1º exame positivo. As cobaias nº 1, 2 e 3 foram examinadas, sempre com resultados negativos, até 1 mês depois que as outras apresentaram parasitos no sangue, continuando em observação depois da publicação desta parte das experiencias, com os resultados que agora daremos.

Nessa mesma ocasião fizemos uma tentativa de transmissão por picada em condições muito especiais: a cobaia nº 3 foi sugada novamente ao fim de 8 dias por 1 triatoma adulto (*T. megista*) que havia sido inoculado na cavidade geral com dejeções hialinas muito ricas em tripanosomas metaciclicos, 8 dias antes, quer dizer; no mesmo em que foram iniciadas as experiencias e com liquido dos barbeiros que sugaram as cobaias 1, 2 e 3.

Todas as cobaias foram conservadas na mesma gaiola, separadas de outros animais, durante os primeiros 18 dias de observação, tendo sido então retiradas as infectadas.

Em resumo, os resultados que demos anteriormente foram que 3 cobaias adultas foram sugadas por 8 *T. megista* alados (um dos quais havia sido 8 dias antes inoculado com fórmias infectantes na cavidade geral), nenhuma tendo se infectado. Dejeções hialinas desses mesmos barbeiros foram infectantes para 1 cobaia através a mucosa celular e para 3 cobaias adultas através a pele normal.

Os resultados das observações que se seguiram a estas conclusões são os seguintes:

Cobaia n.º 1—Esta cobaia, além de ter sido sugada por 3 barbeiros em 11-VII-32, foi sugada novamente por

3	T. megista,	em	14-X-32
6	”	”	1-XI-32
3	”	”	1-XII-32
4	”	”	12-XII-32
5	”	”	14-XII-32
11	”	”	17-XII-32

Em 6 meses alimentou, portanto, 35 barbeiros infectados. Dos 11 que a sugaram em 17-XII-32, 2 haviam sido inoculados no celoma, 5 dias antes, com urina infectada de *T. megista*.

Esta cobaia foi observada de 11-VII-32 a 27-I-33, tendo tido ao todo 50 exames a fresco de sangue negativos. Para contróle positivo, procurei infecta-la através a pele com dejeções, em 20-I-33, mas o animal morreu em 29-I-33 antes que o resultado pudesse ser verificado. O coração foi examinado microscopicamente, não tendo sido encontradas formas de multiplicação do *S. cruzi*. Em resumo, 1 cobaia picada por 35 exemplares adultos de *T. megista* infectados, não adquiriu a infecção.

Cobaia n.º 2—Picada por 2 triatomas em 11-VII-32 teve exames negativos até 5-IX-32. Em 6-IX-32 puz liquido hialino infectado sobre a pele, continuando os exames negativos até 12-X-32. Em 13-X-32 tentei novamente a infecção através a pele intacta, obtendo exame positivo em 24-X-32, tendo tido ultimo exame negativo em 20-X-32. Este animal morreu em 18-XII-32, com ultimo exame positivo em 13-XII-32. «Uma cobaia não se infectou por duas picadas de *T. megista* infectados; a tentativa de infecção através a pele falhou uma vez, tendo sido conseguida em outra».

Cobaia n.º 3— Sugada em 11-VII-32 por 2 adultos infectados e em 19-VII-32 por 1 triatoma infectado e inoculado na cavidade geral com formas metaciclicas, foi esta cobaia ainda submetida ás seguintes provas: Em 13-X-32 foi colocado liquido infectante sobre a pele (exames negativos até 24-XI-32, em numero de 39); em 13-XII-32 foi inoculada no peritônio com conteúdo intestinal de ninfa infectada, (ex. neg. até 13-I-33). Nesta data (peso 660 gr.) foi inoculada com sangue de uma cobaia n.º infectada pelo *S. cruzi*, tendo sido exames negativos até 2-I-33 e 1.º resultado positivo a 25-I-33. A infecção foi verificada até 1-III-33, tendo desaparecido os parasitos do sangue em 6 e 13-III-33.

A cobaia n.º 3 não se infectou pela picada de 3 *T. megista* infectados (um dos quais inoculado na cavidade geral), nem pela deposição de dejeções limpidas sobre a pele; mostrou-se infectada 41 dias depois de injetada no peritônio com intestino de barbeiro parasitado e 10 dias de-

pois de inoculada com sangue de cobaia infectada. Teve reação de Machado fracamente positiva em 17-II-33.

Cobaia n.º 4—Infectada através a pele, em 11-VII-32. Exames positivos de 27-VII-32 a 22-IX-32, negativos de 4-X-32 a 13-V-33 (6 exames). Em 8-V-33 foi inoculada subcutaneamente com sangue de cão (raça de tatú); exame positivo 19-V; de 22-V a 29-IX-33 teve 24 exames negativos. Reação de Machado positiva em 2-VI-33. Este animal ainda vive (24-XI-33), não tendo tido depois mais exames positivos (v. pag. 31).

Cobaia n.º 5— Infectada pela pele em 11-VII-32, adquirindo infecção mortal (30-VIII-32).

Cobaia n.º 6—Infectada pela pele, ex. pos. 29-VII-32 (líquido na pele em 11-VII). De 2-VIII-32 a 13-XII-32 teve 12 exames negativos. Infecção benigna, fugaz.

Cobaia n.º 7—Infectada pela mucosa ocular (11-VII-32); ex. pos. de 27-VII a 24-X-32; ex. neg. 10-XI-32. Em 13-XII-32 foi inoculada com conteúdo intestinal de ninfa infectada (que serviu para a cobaia n.º 3): exame neg. até 4-I-33 (10 exames). Em 27-I-33 estava bastante infectada; morreu em 6-II-33 (v. pag. 31).

Temos ainda as seguintes observações de cobaias picadas por *Triatomas* infectados (*T. megista*, adultos):

a)—2 cobaias sugadas por varios T. (em 9-VI-33) (5 ou 6) que não defecaram sobre as mesmas. Foram examinadas regularmente, com resultados negativos, morrendo uma em 18-IX-33 e outra em 22-IX-33. Exame microscópico do coração de ambas, negativo.

b)—cobaia sugada por 4 T. em 23-V-33. Até Novembro teve sempre exames negativos, estando ainda viva.

c)—2 barbeiros foram alimentados em 1 cobaia, em 2-VI-33; até agora (XI-33) não teve infecção aparente. Vive.

d)—1 barbeiro sugou 1 cobaia, sendo suas dejeções inoculadas em outra, em 10-VI-33. A que foi sugada não teve a infecção, morrendo em 27-X-33 (coração sem leishmanias); a inoculada com as dejeções teve tripanosomas no sangue em 29-VI-33.

e)—Cobaia na qual foram alimentados 4 T. em 3-VII-33, morrendo em 12-X-33. Coração negativo, sangue também sempre negativo.

f)—8 barbeiros sugaram 1 cobaia em 25-VIII-33. Exames negativos quasi diários até este mês (Novembro). Ainda vive.

g)—Cobaia picada por 3 T. em 20-IV-33.

”	”	”	4	”	”	23-V-33
”	”	”	2	”	”	2-VI-33

Estas cobaias ainda vivem, não infetadas.

h)—Infecção durante o ato da picada, por contaminação pelas fezes: uma cobaia foi sugada por varias ninfas em 10-IV-33, tendo as dejeções escorrido pelas paredes dos tubos que as continham e atingido a pele do animal através a gaze. O 1.º exame de sangue foi feito 17 dias depois, positivo.

i)—Uma cobaia adulta foi sugada em 8-V-33 por 1 *T. megista* que havia sido inoculado no celoma com metacíclicos 13 dias antes. Depois foi sugada por mais triatomas naturalmente infectados e não inoculados:

Em 3-VIII-33 por 10 *T. megista*
„ 12-VIII-33 „ 5 „ „

Teve numerosos exames negativos até 25-IX-33; neste dia foram colocados em seus olhos dejeções de barbeiro infectado. Os exames foram negativos até 7-X-33 e positivo a 9 do mesmo mês. O animal morreu infectado em 7-XI-33. Não se infectou pela picada de 16 *T. megista* infectados pelo *S. cruzi*, um dos quais inoculado com formas infectantes na cavidade geral, tendo depois adquirido uma infecção mortal quando 1 vez foram colocadas excreções nas mucosas intactas dos olhos.

Em algumas experiencias que fizemos obtivemos tambem facilmente infecções de camondongos brancos adultos, pondo gotas de dejeções limpidas de *T. megista* infectados sobre a pele. Os pêlos não eram aparados nem raspados, não havendo tambem tomado precauções para retardar o dessecamento, sendo o liquido posto numa das regiões inguinais. Em 4 experiencias o periodo de incubação variou de 9 a 13 dias.

Um camondongo infectou-se por via gastrica (incubação 15 dias).

Não conseguimos infectar 2 ratos pela deposição de excreções sobre a pele nem fazendo 1 rato comer 1 triatoma, mas este animal não se presta para estas experiencias.

A infecção de camondongos brancos colocando-se sangue de animal infectado sobre a pele intacta não foi por nós conseguida (2 experiencias).

A respeito da penetrabilidade do *S. cruzi* através os tegumentos ilésos, verifica-se, como no *T. lewisi*, uma maior capacidade de penetração das formas parasitarias infectantes do inseto (metacíclicas) do que as do sangue. No caso do *T. lewisi* as formas metacíclicas penetram pelas mucosas facilmente, ao passo que as formas sanguícolas não o fazem (ver B. Borghi, 1932); No caso do *Schizotrypanum*, os tripanosomas têm maior poder de penetração; as formas sanguícolas passam por certas mucosas de modo mais ou menos constante (Brumpt, Mayer e Rocha Lima,

Nattan-Larrier), e as metacíclicas as atravessam facilmente, bem como á pele normal de camundongos recém-nacidos (Brumpt) e de cobaias e camundongos adultos (Dias). A passagem das formas sanguícolas do *S. cruzi* não foi também verificada por Mayer e R. Lima (1914) nem por Nattan Larrier (1921).

Esta propriedade dos metacíclicos mostra sua adaptação ao modo de transmissão do flagelado e á vida parasitaria. É provável que estas formas sejam exclusivamente adaptadas á transmissão da infecção ao Vertebrado, incapazes de evoluir em outro inseto e no mundo exterior, por não terem a propriedade de se multiplicar nem de se transformar novamente em crídiã.

Em vista dos resultados experimentais que temos exposto a transmissibilidade do *S. cruzi* pelas formas parasitarias das dejeções, através de tegumentos intactos, tem sido um fato muito mais vezes verificado que o da transmissão pela propria picada. A raridade que constitue o achado de formas de tripanosomas nas glandulas salivares e na cavidade geral fala ainda a favor de que a propagação da infecção pela picada é um fato excepcional (Brumpt).

Nos raros casos em que se tem conseguido a transmissão pela picada, não poderá a mesma ser devida ás formas que no estomago do barbeiro permanecem por muito tempo, infectantes?

A verificação da possibilidade de um regurgitamento durante o ato da picada, pelo qual o conteúdo do estomago poderia em parte atingir as porções anteriores do stomodéum, tornaria muito provável esta hipótese. A constatação dessa possibilidade seria um fato biologico de grande importância no estudo da transmissão dos Tripanosomídeos; aliás, a realidade das formas infectantes do estomago, por nós demonstrada, pôde servir de base a considerações teóricas muito interessantes a este respeito.

Estas formas poderiam ser interpretadas como um vestigio de modo de transmissão inicial do *Schizotrypanum*, porquanto são formas não evoluídas, infectantes, derivadas diretamente das formas sanguícolas ingeridas; a transmissão primitiva seria mecânica, ou aciclica, e teria passado, pela adaptação progressiva do flagelado ao Invertebrado, á evolução na porção posterior e ao método contaminativo de transmissão. Nos Tripanosomídeos em geral, a evolução na porção anterior do tubo digestivo denota pouca adaptação, ou antes, recente adaptação ao Invertebrado, traduzindo a evolução na porção posterior uma adaptação mais estricta, existindo gradações entre um e outro tipo de evolução no transmissor¹⁰. O *S. cruzii* seria um flagelado que, atualmente bem adaptado á trans-

¹⁰ Ver Adler, 1933.

missão por contaminação, apresentaria ainda no seu ciclo reminiscências de sua evolução e método de propagação iniciais. Não devemos avançar tanto no domínio das considerações teóricas; queremos apenas deixar esboçadas levemente algumas idéas, que mostram a nossa tendencia a adotar a doutrina de Minchin sobre a origem dos tripanosomas, segundo a qual o hospedador inicial seria o Vertebrado.

Cultura in vitro e na cavidade geral

Cultura

O *S. cruzi* cultiva-se facilmente (Chagas). Sobre sua evolução *in vitro*, que é análoga á do inseto (Chagas), não entraremos em detalhes. Assinalaremos fatos esparsos que temos observado.

O aparecimento das formas metacíclicas nem sempre é facil de ser verificado, parecendo-nos que de regra começa a se dar entre o 7.º e 9.º dia. Segundo Galliard (1929) em certas condições dar-se-ia mesmo antes (5 dias).

Observa-se nas culturas fato semelhante ao que assinalamos no barbeiro, a saber, permanecem no tubo tripanosomas sem sinais de evolução ou de degeneração até varios dias, até 8 pelo menos. Chamaram a atenção para este fato M. e Mme. Delanoe (1912), que viram tripanosomas inalterados até 4 e 5 dias depois de semeados. Esta circunstancia, compreende-se, dificultará sem duvida a próva de que os metacíclicos possam se formar muito precocemente (5 dias).

Outro fato que também observamos nas culturas, depois de o termos constatado no estomago do *T. megista*, foi o de que dentre os tripanosomas sanguícolas semeados muito raros pódem, ainda sob seu aspecto morfológico característico, mostrar sinais de divisão, como duplicidade de nucleo, de flagelo, etc., algumas horas depois de serem semeados.

Não fizemos experiencias para verificar a infectividade das culturas, mas, pelos resultados de inoculação de barbeiros e pelos fatos análogos de evolução que se observam *in vitro* (permanencia de formas de blefaroplasto posterior durante alguns dias, durante o tempo bastante para que as formas metacíclicas comecem a aparecer), quasi poder-se-ia garantir que as inoculações são positivas desde as primeiras horas até

muitos dias. Aqui também a infectividade seria a princípio devida às formas sanguícolas e depois aos metacíclicos.

A infectividade permanente das culturas, assim, não poderá demonstrar a infectividade de todas as formas evolutivas do *S. cruzi*.

A respeito da questão da infectividade das fases evolutivas das culturas as opiniões são divergentes. Segundo Torres (1922) todas as formas de evolução seriam infectantes para o Vertebrado, baseado em que inoculações de culturas recentemente semeadas transmitem a infecção quando inoculadas. Entretanto H. Halliard (1929) contra esta demonstração já argumentou que o aparecimento precoce dos metacíclicos constitue causa de erro difícil de afastar; de outro lado, a circunstancia a que já nos referimos, da persistencia de tripanosomas inalterados no meio de cultura (que Galliard aliás acha pouco provável) impede a interpretação dos resultados das inoculações, que com certeza serão positivos.

Segundo W. Nöller (1920), nas culturas de tripanosomas, só as formas metacíclicas são infectantes. Além destas, a nosso ver, temos que considerar formas mais ou menos modificadas, derivadas diretamente das do sangue (leishmanias?), que no caso do *S. cruzi* existem no estomago do hematófago e que com muita probabilidade ocorrerão também na evolução *in vitro*.

A infectividade das culturas do *S. cruzi* já foi verificada depois de muito tempo, através numerosas passagens. Nöller (1931) refere que Nöller e Haupt observaram a presença de parasitos no sangue de camundongos injectados com amostra de uma cultura que em 7 anos sofrera 79 passagens.

Na seção de Protozoologia do Instituto existe uma amostra de *S. cruzi* (raça humana) atualmente com mais de 110 passagens em meio de Noguchi, feitas em média cada 25 dias; a cultura original foi obtida em 1927.

Com um tubo desta cultura (110a passagem, ultima repicagem em 24-IV-33) inoculei em 13-V-33 tres camundongos brancos adultos, com 1 a 2 cc. de meio semi-sólido cada um. 2 dos animais morreram pouco tempo depois; o restante teve exames negativos quasi diários até 8-VI-33, tendo nós visto 1 tripanosoma no seu sangue em 12-VI-33. Inutilmente procurámos tripanosomas, desde o dia seguinte, no sangue periférico deste camundongo, até 18-VII-33. Morreu em 15-VIII-33, ainda negativo. Ou a infecção foi muito ligeira e fugaz (1 exame positivo) ou, o que é pouco provável, houve troca de animais.

A inoculação desta mesma amostra em cobaia, depois de mais 2 ou 3 repicagens, foi negativa.

Inoculando culturas recentes e virulentas em camundongos brancos,

não pudemos verificar a invasão precóce e intensa da cavidade peritoneal pelos parasitos, tal como foi descrita por H. Galliard (1929).

Pelo quadro abaixo vemos que nestas experiencias o apparecimento de tripanosomas no sangue precedeu o do peritoneo, nos animais injetados sob a péle.

Em alguns casos, depois de estabelecida a infecção sanguinea, é mais facil encontrar-se flagelados no liquido peritoneal que na circulação, mas deve-se considerar que é muito maior a diluição dos parasitos na torrente circulatoria que no exsudato peritoneal. Ao decair da infecção sanguinea os tripanosomas pôdem ser achados no peritoneo e serem inaparentes no sangue.

Camondongos inoculados com cultura de *S. cruzi*, raça de talú, meio de Noguchi, 17 dias depois de semeada (sangue de cão infectado).

Nos frottis foram encontrados poucos metaciclicos.

Inoculações feitas em 24-VIII-33:

QUADRO 9

Nº. do animal, ponto de inoculação, quantidade inoculada	Resultados											
	VIII-33					IX						
	25	26	28	29	30	1	4	8	11	16	19	
Camondongo 1 Pele do abdomem. 1/2 cc.	S	-	-	-	+	+	+	++	+	†		
	P	-	-	-	-	-	+	+	++			
	Pc	-	-	-	-	-	+	+				
Camondongo 2 Peritonio 1 cc.	S	-	-	-	+	+	+	++	+	.	+	+
	P	-	-	+	+	+	+	++	+	.	+	++
	Pc	-	+	+	+	+	+	+	.	.	+	+
Camondongo 3 Pele do dorso. 1,5 cc.	S	-	-	-	+	+	+	++	+	+		†
	P	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
	Pc	-	-	-	-	-	+	+	.	.		
Camondongo 4 Pele do dorso. 1 cc.	S	-	-	-	+	+	+	++	++	†		
	P	-	-	-	-	-	+	++	++			
	Pc	-	-	-	-	-	+	+	.			

S—sangue, P—peritonio, Pc—peritonio (corado).

No dia 26 os parasitos encontrados nos esfregaços corados do camondongo 2 eram fórmias arredondadas, intracelulares. Todos os outros sinais positivos indicam fórmias de tripanosoma extracelulares. As primeiras fórmias a aparecer no sangue foram as fórmias finas (jovens).

A infecção foi rapidamente mortal nos camondongos inoculados subcutaneamente; o infectado no peritonio ainda vive, já com exame negativo do sangue (28-XI-33).

—Por duas vezes tentámos isolar o *S. cruzi* diretamente do tubo intestinal do *T. megista*, pelo processo de sementeiras em placas com agar-sangue (Nöller), não tendo conseguido.

—Semeando tubos de Noguchi com dejeções hialinas de barbeiros contendo grande quantidade de fôrmas metacíclicas, observámos a diminuição progressiva das mesmas, até seu desaparecimento completo.

Na maioria das vezes ha contaminação do meio, a qual não permite que a observação se prolongue por muitos dias; não obstante consegue-se acompanhar os tripanosomas até 3 e 4 dias depois de semeados, conservando os mesmos sua mobilidade. Em um tubo vimos fôrmas metacíclicas até o 3º dia, desaparecendo depois sem que tenha havido contaminação; o tubo permaneceu esteril e sem parasitos por longo tempo.

Para se fazer estas experiencias em boas condições deve-se separar o inséto em placa esterilizada, esperando-se que elimine 1 ou mais vezes excreções limpidas para depois fazerem-se as sementeiras.

Embora não tenhamos conseguido culturas com este material, é provavel que se possam obter quando haja critídias em mistura com os metacíclicos, o que acontece quasi sempre embora sejam elas em numero geralmente muito menor.

Parece que á fôrma metacíclica do *S. cruzi* não é cultivavel, apenas sobrevivendo por alguns dias nos meios de cultura.

Evolução na cavidade geral do *T. megista*.

Sobre este assunto temos uma publicação anterior (1932) em que referimos as nossas primeiras experiencias que serão agora novamente expostas, seguidas de outras que ainda não foram publicadas.

Com o fim de verificar o que se passava com o *S. cruzi* na cavidade geral do inséto transmissor, quando aí artificialmente introduzido, inoculámos exemplares adultos de *T. megista* a principio com fôrmas sanguícolas e depois com fôrmas metacíclicas deste parasito provenientes de dejeções infectadas.

Nas primeiras experiencias servimo-nos de parasitos obtidos do sangue de um cão bastante infectado, pouco antes da morte (19º dia, raça de tatú).

Para que o material a ser injetado contivesse muitos parasitos em volume pequeno e fosse o mais possivel livre de outros elementos, faziamos a centrifugação do sôro, após a coagulação do sangue do cão colhido por punção cardiaca. Pequena quantidade de liquido era então injetada na hemocéle de triatomas adultos por meio de seringa graduada em centésimos e munida de agulha fina.

Fazemos a inoculação pela face ventral do inséto, ao nivel de uma

das ultimas articulações dos anéis abdominais, a igual distancia da linha mediana e do conexivo. A agulha deve ser mantida obliquamente de trás para diante, e penetrar pouco de maneira a ser evitada a lesão dos órgãos internos do Hemiptero, o qual deve estar com o estomago bem vazio.

A quantidade de liquido injetada deverá ser pequena, não tendo excedido a 0,15 c.c. nas nossas experiencias. As diversas operações de sangria do animal, enriquecimento dos tripanosomas e inoculação deverão ser feitas nas melhores condições possiveis de asepsia: algumas vezes tem-nos ocorrido o fáto de morrerem inséto pouco tempo depois de inoculados apresentando numerosas bacterias na hemolinfa, tendo desaparecido os parasitos.

Nos barbeiros sacrificados 24 horas depois da injeção o exame a fresco do liquido celomico mostra tripanosomas com seu movimento habitual, o mesmo se observando depois de 48 horas. A este tempo as modificações morfologicas dos parasitos não vão além do alongamento transversal do blefaroplasto e de sua aproximação do nucleo; encontram-se muitos tripanosomas não modificados, não tendo sido observadas, então, leishmanias nem fórmulas intracelulares.

No 7º dia a hemolinfa apresenta flagelados com aspectos diversos: critidias de diferentes dimensões, corpusculos leishmaniformes e parasitos de blefaroplasto posterior (ainda proximo ao nucleo) e de nucleo alongado; entre estas fórmulas e as de critidia notam-se estádios intermediarios. Tanto as leishmanias como as critidias podem mostrar sinais de divisão.

Ao lado destas fórmulas livres, móveis ou imóveis, encontram-se na linfa parasitos arredondados englobados por alguns dos seus elementos celulares; as leishmanias não são numerosas dentro de cada celula e parecem não se multiplicar, apresentando-se com aspecto normal ou um pouco alterado.

Em todas as nossas experiencias o liquido celomico foi colhido com todo o cuidado para não se ferir o tubo intestinal: cortavam-se as pernas do hemiptero junto á inserção e procedia-se a delicada expressão de seu abdomen, caso o liquido não brotasse espontaneamente como em geral se observa. Nunca encontrámos em mistura com a linfa assim colhida vestígios de conteúdo intestinal.

Em dois barbeiros sacrificados ao fim de 2 e 7 dias as glandulas salivares, examinadas em córtex, estavam livres de parasitos.

Por esta experiencia foi visto que o *S. cruzi* é capaz de se desenvolver quando introduzido na cavidade geral do barbeiro; esta parte de nossas pesquisas a respeito já havia sido publicada, devendo ser procurada essa publicação para melhor esclarecimento do que descrevemos por causa das illustrações que a acompanham e que não serão aqui reproduzidas.

No dia 25-XI-31 foi colhido soro sanguíneo de um cão infectado (raça humana), e, inoculado após centrifugação na cavidade celômica de 4 *T. megista* adultos (3 fêmeas e 1 macho).

Em 2-XII-31 só estava viva 1 fêmea que foi alimentada em cobata normal, tendo eliminado dejetões infectados. O tratoma foi sacrificado em 10-XII-31, 15 dias depois de inoculado e 8 dias após a última refeição.

A hemolinfa não continha flagelados ao exame a fresco, apresentando-se rica em células, sem bactérias. Pelo exame do vaso dorsal dissociado em água fisiológica encontramos alguns flagelados móveis.

Exame dos estregagos (ácido ôsmico, alcool absoluto; Giemsa): Em 2 preparados de hemolinfa só encontramos 1 crítdia livre, atípica. Vaso dorsal: formas arredondadas parecendo alteradas. Ovario: 1 célula com 2 leishmanias em degeneração; 1 leishmania livre; várias crítdias perfetas ou em transição para metacíclico, algumas mais ou menos alteradas; metacíclicos muito finos; crítdias e leishmanias parecendo em degeneração avançada; algumas células com parasitos apenas reconhecíveis.

Na lamina obtida esfregando a face interna da folha dorsal do abdômen encontramos uma célula com 4 parasitos, entre os quais uma forma parecendo em transição para metacíclico; célula com formas monstrosas arredondadas; metacíclico muito delgado.

Froth's da lamina ventral do abdômen: acham-se com facilidade metacíclicos finos bem corados, crítdias delgadas e formas intermediárias. As glândulas salivares não foram examinadas. Na pequena gota colhida na extremidade da tromba do inseto ao ser sacrificado, não foram encontrados parasitos.

Verifica-se por esta experiência que os tripanosomas sanguíneos inoculados na cavidade geral do *T. megista* evoluem até à forma metacíclica final. Flagelados deste tipo permanecem vivos até 15 dias depois da inoculação, ao lado de crítdias e outras formas. As leishmanias quasi sempre mostram sinais de degeneração, parecendo não haver, de regra, evolução intracelular; o desenvolvimento, para o qual as condições não parecem ser ótimas, é análogo ao do *Schizotrypanum* em cultura ou no tubo digestivo do inseto. Difere um pouco da evolução cultural pelo aparecimento mais tardio das primeiras transformações evolutivas, sendo em ambos o mesmo prazo para a formação dos primeiros tripanosomas metacíclicos. (7-9 dias).

A hemolinfa do *T. megista* não é nociva à forma sanguícola do *S. cruzi*, permitindo sua sobrevivência e evolução quando introduzida na cavidade geral. Os fenômenos degenerativos ocorrem em varias fases da evolução no celoma, sendo bastante frequentes ao fim de alguns dias.

A invasão da cavidade geral dos insetos infectados nunca foi em condições naturais por nós observada.

Seguindo a mesma técnica das experiencias precedentes e com o mesmo fim, fizemos tambem inoculações na cavidade geral de dejeções hialinas ricas em flagelados.

1)—Barbeiro adulto inoculado em 11-VII-32 (com liquido eliminado por um dos inséto que sugou a cobaia 1). Foi alimentado na cobaia 3, 8 dias depois de inoculado, não transmitindo a infecção. Foi sacrificado em 22-VII-32 (11 dias): exames a fresco de linfa, vaso dorsal, ovarios, glandulas salivares negativos, não tendo sido tambem encontrados parasitos em esfregaços corados (v. experiencias de transmissão).

2)—Exemplar adulto inoculado com dejeções e sacrificado 6 dias depois. Nos *frottis* de varios órgãos (ovarios, vaso dorsal, tecido adiposo) encontram-se tripanosomas, critídias de fórmias variadas e tipos de transição. Predominam os tripanosomas metaciclicos, que são de diversas dimensões. Critídias em divisão. Aglomerados parasitarios em que os metaciclicos são mais numerosos que as critídias; num deles os parasitos formavam uma rosácea, dispondo-se com os flagelos voltados para a periferia. Encontrámos fórmias de divisão interessantes, parecendo mistas de critídia e metaciclico; este fáto indicaria a possibilidade da transformação em metaciclico durante o processo de divisão de critídias. Em uma destas fórmias o corpo era unico, provido de 1 flagelo, e em outra as duas extremidades eram flageladas:

—Não encontrámos parasitos intrecelulares, leishmanias, nem fórmias metaciclicas típicas em divisão. Póder-se-á supôr que as critídias existentes no liquido inoculado tenham se multiplicado e se transformado em metaciclicos; muitas destas fórmias inicialmente inoculadas teriam permanecido vivas. Possivelmente os ovarios são órgãos de predileção dos parasitos inoculadas na cavidade geral, pelo maior quantadidde de flagelados que apresentam.

3)—*Triatoma* inoculado, sacrificado no 11.º dia: nos *frottis* de ovarios, hemolinfa e tecido adiposo não foram achados parasitos.

4)—Foram inoculados 3 adultos em 12-XII-32. Um, sacrificado 48 horas depois, não tinha tripanosomas na hemolinfa nem no vaso dorsal, ao exame a fresco, não tendo sido tambem achados nas laminas coradas (tecido adiposo, vaso dorsal, linfa, ovarios, glandulas salivares). Os dois restantes sugaram a cobaia n.º 1 em 17-XII-32 juntamente com outros barbeiros, com resultado negativo (v. experiencias de transmissão); um deles, sacrificado nesse dia, não tinha flagelados na linfa nem nos órgãos. O outro perdeu-se.

5)—Em 29-XII-32 foram inoculados 2 *T. megista*, um logo depois de se alimentar, outro com o estomago vazio: O primeiro, sacrificado 24

Pesquisas in natura

Schizotrypanum de morcegos

Fizemos quatro viagens a Lassance, duas em 1931¹¹ e duas em 1933, demorando-nos de cada vez cerca de 1 mês. Daremos apenas o relatório da nossa terceira estadia, de 21 de Março a 12 Abril deste ano, seguido de algumas observações.

O relatório que apresentámos ao Dr. Chagas em 18 de Abril de 1933 foi o seguinte:

Pesquisa de tripanosoma no sangue do homem e dos animais:

Exames a fresco:

Crianças:	62
Animais:	83
Total:	<u>145</u>

Idade das crianças:

0-2 anos	29	examinadas
3-5 "	15	"
6-10 "	15	"
11-15 "	3	"
Total	<u>62</u>	

Animais examinados:

Morcegos	25
Cães	19
Gatos	27
Tatús	8
Coelhos	3
Preá	<u>1</u>
Total	83

¹¹ Em companhia do Dr. Carlos Chagas Filho.

Exames positivos:

Morcegos	5
Tatús	4
Cães	2
Crianças	0
Gatos	0
Coelhos	0
Preá	0
Total	11

Inoculações: Com sangue de animais infectados foram inoculadas 11 cobaias, 1 cão e 1 sagui. Foram isoladas raças novas do *S. cruzi* do tatú e do cão.

Prosségue a identificação de um tripanosoma encontrado no sangue de morcegos (*cruzi*?).

Excursões: Localidades percorridas—Santa Rita, Capão, Barreiro, Têlhas, Santa Maria, Capão d'Anta, Engenho Velho, Jaboticaba, Gentio (situadas nas circunvizinhanças de Lassance).

Numero de cafúas visitadas: 63, num percurso total de cerca de 30 léguas.

Foram capturados numerosos barbeiros no interior de habitações infestadas, na grande maioria *T. megista* na fase ninfal e adulta (mais de mil), *T. sordida* e 1 exemplar femea de *T. geniculata* (que penetrára á noite, atraído pela luz).

Colhemos e examinámos numerosos percevejos (*Cimex lectuarius*) de algumas cafúas, com resultado negativo.

Ambulatorio: Foram fichados 180 doentes.

A época em que foi realizada esta nossa excursão não foi favoravel ao encontro de casos agudos da doença de Chagas. Como se vê por este relatório, não achámos tripanosomas no sangue pelo exame a fresco de 60 crianças, quasi todos residentes em cafúas infectadas, suspeitas ou não da enfermidade. Segundo Chagas os casos agudos começam a apparecer em Setembro, sendo mais abundantes nos meses quentes e depois diminuindo até ficarem muito escassos ou inexistentes.

Em geral examinavamos sómente 1 preparado, em condições nada propicias para um exame muito demorado. Encontrámos numerosos adultos e crianças com sináís típicos de varias fórmas clinicas da enfermidade de Chagas, principalmente da fórma cardiaca.

Da ultima vez que lá estivemos trouxemos alguns doentes que foram internados no Hospital Oswaldo Cruz, no serviço do Dr. Villéla. Entre as inoculações de sangue de 6 doentes em cobaia, foram positivas 3, dos quais todos tinham reação de Machado fortemente positiva. São doentes de fórmula cardíaca do mal de Chagas (cujos nomes são Venancia, Edeltrudes e Augusto). Esta percentagem de resultados positivos de inoculações é a maior que tem se observado, em doentes cronicos daquela região.

—Das primeiras vezes que fomos a Lassance foram achados tambem com infecção natural, além de tatús e cães, gatos. Todos estes animais já tinham sido encontrados na mesma região com infecção natural pelo *S. cruzi*, por Chagas e seus colaboradores.

A infecção natural do cão foi observada ha longo tempo por Chagas, referindo-se a ela Villela em 1924. Este fáto do parasitismo natural do cão foi tambem verificado na Argentina (S. Mazza, 1926) e no Panamá (Clark e Dunn, 1932).

Os cães infectados que achámos em Lassance na nossa penultima viagem eram um adulto e outro ainda pouco crecido. Este (cafúa do Argemiro, Capão) morreu em poucos dias com numerosos tripanosomas na circulação; o outro morreu 3 meses depois de encontrado, tendo tido exame de sangue negativo pouco tempo depois de trazido para o Rio.

—Inoculámos em cobáia 5 ninfas cheias de *Rhipicephalus sanguineus* colhidas sobre o cão da cafúa do Argemiro, com resultado negativo (ver Neiva, 1913).

Em cerca de 10 exemplares de mocós (*Cherodon rupestris*) que caçámos na Serra do Cabral (onde Brumpt e Gomes descobriram o *Triatoma chagasi* com infecção, atribuindo ao redôr o papel de reservatório do virus na natureza), não encontrámos tripanosomas pelo exame a fresco.

Torres (1915) tambem não observou flagelados no sangue nem formas de multiplicação do *S. cruzi* nos tecidos deste Vertebrado.

Entre os inimigos naturais do *T. megista*, além do *Telenomus jariai* microlepidoptero que parasita os óvos dos triatomas (Costa Lima), póde-se contar uma pequena aranha, que é frequente nas habitações infestadas por barbeiros. Encontrámos exemplares desta aranha devorando larvas e ninfas de barbeiros.

—Fáto que sempre chama a atenção de quem percorre as regiões mineiras assoladas pela tripanosomíase é a quantidade extraordinária de triatomas que infesta as habitações humanas, os quais em muito alta percentagem estão infectados pelo *S. cruzi* (Chagas, Torres, etc.). As viziñhanças e os próprios leitos dos individuos servem de abrigo aos hemipteros, apresentando-se as cobertas e travesseiros quasi sempre salpicadas

por quantidade impressionante de dejeções dos barbeiros. Esta circunstancia é de grande importancia para a compreensão do mecanismo da transmissão por contaminação da doença de Chagas. Observámos também nas cobertas e nas roupas dos individuos manchas de sangue produzidas pelo esmagamento do inséto depois de cheio, assim como fomos informados da frequencia desta ocorrencia.

Fáto importante para a transmissão e que complica a profiláxia da molestia de Chagas é o da eliminação pelo mesmo inséto de varias dejeções, que pódem ser sempre muito ricas de fórmas infectantes; existe assim a possibilidade da infecção de diversos individuos pelo mesmo hemiptero, por contaminação pelas excreções através a péle ou as mucosas.

—Como vimos, segundo Torres, a principal fonte de infecção dos Hemipteros na natureza é constituída pelos Vertebrados. Tanto os animais com infecção sanguinea aparente, como aqueles que já não apresentam parasitos no sangue pódem ser considerados como capazes de infectar o Invertebrado que sobre eles se alimenta; pelo menos teóricamente, pódese admitir a possibilidade da infecção dos barbeiros pelas fórmas de multiplicação do *S. cruzi* existentes no tecido sub-cutaneo, analogamente ao que parece acontecer nas leishmanióses ¹².

Schizotrypanum de morcêgos

—A existencia de tripanosomas parasitos do sangue de morcêgos do Brasil foi assinalada ha muito tempo.

Recentemente A. Carini (1931) encontrou em esfregaços de sangue de morcêgos (*Phyllostomus hastatus*) enviados de Minas Gerais e de Goiaz um tripanosoma que, baseado em dados morfológicos, julgou provavelmente identico ao *Trypanosoma vespertilionis* (Battaglia) ou ao *Trypanosoma phyllostomae* (Cartaya), encontrado este no sangue de *Phyllostoma perspicillatum*.

Quando estivemos em Lassance em Abril deste ano encontrámos no sangue de morcêgos que hoje sabemos ser da mesma especie que os de Carini (*Phyllostomus hastatus* Pallas), um flagelado de que demos noticia em recente publicação, (1933), demonstrando tratar-se de um *Schizotrypanum*. Recordaremos o que dissemos nesta publicação e acrescentaremos a seguir os novos dados que conseguimos sobre o assunto depois de outra viagem a Lassance.

Os primeiros morcêgos que examinámos foram apanhados no fôrro da casa que habitávamos, em numero de 22, tendo sido achados 5 com

¹² Ver Wenyon, 1932.

infecção pelo flagelado (22,7 %). Estes Cheiropteros foram classificados no Museu Paulista¹³ como *Phyllostomus hastatus* Pallas.

Em um unico exemplar os parasitos eram numerosos no sangue, sendo nos outros muito ligeira a infecção sanguinea.

O tripanosoma sanguicola é morfológicamente muito semelhante ao *S. cruzi*, como já o assinaláram alguns autores no caso de hemoflagelados de Cheirópteros de outros paizes. Méde cerca de 20 micra de comprimento, possúe blefaroplasto grande junto á extremidade posterior, nucleo oval, mediano ou mais próximo ao extremo anterior. Não vimos parasitos em divisão no sangue periférico. Ao exame a fresco algumas fórmas têm movimentos mais rapidos que outras; não observámos as grandes fórmas assinaladas por Sargent (1905) e Nicolle e Comte (1908) no sangue de morcêgos de outras regiões infectados pelo *T. vesperfilionis*.

Fizemos o exame histológico de órgãos (coração, baço, fígado, pulmão, rim, intestino, cerebro, musculo estriado) de 3 *P. hastatus* infectados; em 2 deles, que tinham raros tripanosomas no sangue, não encontramos fórmas de multiplicação nos tecidos. Num exemplar muito infectado (n.º 3) encontramos no pulmão e no intestino delgado duas celulas com numerosos parasitos sob á fórma de leishmanias mais ou menos alongadas (Estampa 12).

As celulas são relativamente grandes, de nucleo esférico central, unico, e membrana celular nítida, pouco espessa. No pulmão (fig. 20) a celula está localizada no proprio parenquima do órgão e no intestino (fig. 21) em plena camada muscular, não havendo sináís de reação inflamatória.

Estas celulas médem $43 \times 27 \mu$ (pulmão) e $72 \times 50 \mu$ (intestino) e segundo Torres, que examinou nossos preparados, são semelhantes aos gigantocitos quisticos por ele e Penna de Azevedo (1939) descrito nos tatús infectados pelo *S. cruzi*. Comparem-se as figuras 20, 21, e 6 deste trabalho.

Inoculações: Com sangue de morcego pouco infectado fizemos inoculações em 2 cobaias: uma morreu no dia seguinte e outra 15 dias depois, sem tripanosomas no sangue.

2 cobaias foram inoculadas em 10-IV-33 com sangue de morcêgo bastante infectado (n.º 3):

Cobaia 1—examinada quasi diariamente até o dia da morte, em 23-VI-33, sem ter tido infecção sanguinea aparente e com exame histológico de coração, baço e rim negativo. A reação de Machado foi negativa em 9 26-V-33, e em 2-VI-33.

¹³ Por intermédio do Dr. Lauro Travassos, a quem agradecemos.

Cobaia 2—Os exames a fresco do sangue, repetidamente feitos durante 30 dias, foram também negativos; inoculada em 9-V-33 com *S. cruzi* (amostra recentemente isolada de cão), adquiriu a infecção em prazo normal. Neste mesmo dia, antes de ser inoculada, fizemos passagem de 3 a 4 c.c. de seu sangue para cobaia nova, que morreu em 30-V-33 sem ter tido tripanosomas no sangue periférico e sem formas parasitárias do coração. A cobaia 2 teve reação de Machado (feita, como na precedente, pelo Dr. Villela) foi negativa em 9-V-33, antes de ser inoculada com *S. cruzi*, e positiva em 26-V e 2-VI-33 (Villela); morreu em 30-VI-33, infectada, com leishmanias no coração.

Voltando novamente a Lassance, em Julho deste ano, examinámos o sangue de numerosos morcegos, dos quais apenas 3 ou 4 eram *P. hastatus*. Só encontrámos um pequeno morcego infectado: *Miotis nigricans* (Wied). Os outros, examinados desta vez, pertenciam ás seguintes especies, segundo classificação que devemos ao Museu Paulista:

Lonchoglossa ecaudata Wied.
Diphylla ecaudata Spix.
Histiotus velatus Geoffr.
Nyctinomus macrotis Gray.
Desmodus rufus Wied.
Phyllostoma hastatus Pallas.
Mofossus sp.

Examinámos 15 morcêgos em Belo Horizonte¹⁴ também com resultado negativo; um unico exemplar foi encontrado nesta cidade e que não tinha sido achado em Lassance: *Nyctinomus macrotis*.

O exemplar de *Miotis nigricans* achado infectado em Lassance (nº 4) tinha infecção sanguinea bastante intensa. Seu sangue foi inoculado em 1 rato branco e 1 camondongo branco, adultos, em 6-VII-33. O rato foi examinado até Novembro, sempre negativo.

O camondongo teve exames também negativos até 9-VIII-33, quando foi inoculado com *S. cruzi* (sangue de cão, raça de cão, 4a passagem), morrendo infectado em 13-VIII-33. Antes da inoculação do *S. cruzi* fizemos passagem do sangue deste camondongo para outro, que até agóra (XI-933) não teve tripanosomas no sangue.

As tentativas de transmissão de tripanosomas de morcegos a animais de laboratorio têm sido negativas á exceção das de Battaglia (1914) que conseguiu infectar cobaias e coelhos, não havendo experiencias confirmativas das deste autor. Os irmãos Sergent (1905) inocularam sangue de mor-

¹⁴ Graças ao obséquio do Dr. Octavio Magalhães.

cegos infectados (*Vespertilio kuhli*, *Myotis murinus* Schreber) em camondongos brancos, ratos brancos e coelhos, não conseguindo a infecção.

Nos tecidos do *Miotis nigricans* infectado não encontramos formas de multiplicação do flagelado (coração, pulmão, intestino, baço).

Clark e Dunn (1932) inocularam sangue de animais infectados pelo *S. cruzi* em morcegos, encontrando raros parasitos no sangue dos Cheiropteros inoculados.

Em 11 morcegos capturados em Belo Horizonte, com exames de sangue negativos, inoculámos sangue de cão infectado pelo *S. cruzi* (raça de tatú), em 20-VII-33. 6 dias depois só restavam 2 vivos, que foram sacrificados: 1 *Histiopus velatus*, sem parasitos na circulação nem no ponto de inoculação, e 1 *Nyctinomus macrotis*, em cujo sangue encontravam-se tripanosomas com facilidade e tinha formas de leishmania no tecido subcutâneo do ponto de inoculação.

Ao partirmos de Lassance, em 13-VII-33, semieamos em 2 tubos de Noguchi e 1 de agar-sangue, gotas de sangue de um *P. hastatus* que tinha sido examinado a fresco com resultado negativo.

Examinados alguns dias mais tarde, estes tubos estavam estéreis.

Em 26-X-33 um tubo Noguchi continha numerosas formas de evolução (critídias e tripanosomas) de um flagelado; os outros tubos estavam contaminados.

Infelizmente não poderemos dar no presente trabalho os caracteres culturais deste *Schizotrypanum*, o que faremos posteriormente, comparando-os o quanto possível com os dados de Chatton e Courrier (1921) sobre o *Schizotrypanum pipistrelli* isolado do *Vesperugo pipistrellus*, e os de Nicolle e Comte (1908) sobre o *T. vespertilionis*, obtido do *Vespertilio kuhli*; segundo Chatton e Courrier ha diferenças na evolução cultural destes hemoflagelados de Cheiropteros. O que podemos dizer por enquanto é que entre as culturas de *S. cruzi* e as do *Schizotrypanum* por nós isolado do sangue do *P. hastatus* em Lassance, ha certas diferenças.

Cultura deste *Schizotrypanum* em meio de Noguchi, com 106 dias, foi misturada com sangue desfibrinado de camondongo e pósta num pequeno tubo, e ingerida através péle fresca de camondongo por larvas de *T. megista virgens*, em 4-XI-33. 4 destas larvas, que se encheram bastante, foram sacrificadas e examinadas 10 dias depois, não tendo sido encontrados flagelados no conteúdo intestinal.

Esta experiencia parece indicar que o *Schizotrypanum* do morcego não evolúe no transmissôr do *S. cruzi*. Este resultado, confirmado, será de grande valôr para a distinção definitiva entre estes flagelados.—As culturas que possuímos tambem não são infectantes para camondongos brancos: 4 destes animais inoculados em 9-XI-33 ainda não tiveram parasitos no san-

gue (até 29-XI-33). Inoculações de culturas de *T. vespertilionis* foram também feitas por E. Pringault (1914) em camundongos, cobaias e coelho jovem, com resultados negativos.

Os tripanosomas de Cheiropteros, são ainda muito mal estudados, o que não nos permite a identificação do *Schizotrypanum* dos morcegos de Lassance com as espécies já descritas.

Nossas experiências tornam muito provável a hipótese de tratar-se de um parasito não patogênico, possivelmente do *T. vespertilionis* Battaglia 1904, o primeiro tripanosoma descrito em Cheirópteros.

Chatton e Courier (1921) denominaram *Schizotrypanum pipistrelli* um hemoflagelado de morcego, de que descreveram formas de multiplicação « intratissulares »: grandes quistos cercados por delgada membrana, contendo numerosos parasitos criticidiomórficos e algumas vezes restos nucleares (que fazem supôr uma localização inicialmente intracelular). Estes quistos desenvolvem-se no tecido conjuntivo de varios órgãos como estomago e intestino (mucosa e submucosa) vesicula biliar, rim, bexiga, baço, ovário, útero, epididimo, attingindo ás vezes 200 de diametro. Os referidos autores não encontraram quistos no pulmão nem na tunica muscular do intestino.

Considera-se hoje o *S. pipistrelli* identico ao *T. vespertilionis*, que ficará assim conhecido como *S. vespertilionis*.

G. Franchini (1921) encontrou no figado e principalmente no pulmão de *Vesperugo pipistrellus* infectados parasitos leishmaniformes e formas jovens (tripanosomas), nunca tendo visto formas de criticidia. Os exames de frottis de baço, testiculo, bem como nos de conteúdo e parêde de estomago e intestino, não revelaram a presença de parasitos. As celulas parasitadas que encontramos no pulmão e no intestino de *P. hastatus* são bem diferentes dos quistos descritos por Chatton e Courier, como se pôde ver comparando-se as nossas figuras com as destes autores.

Recentemente, Clark e Dunn (1932) observaram a infecção de varias espécies de morcegos do Panamá por um tripanosoma, conseguindo transmitir a infecção a rato branco por inoculação de sangue de 3 *Artibeus jamaicensis jamaicensis* (exame a fresco do sangue negativo). O parasito foi depois inoculado a outros animais, concluindo aqueles pesquisadores ser o mesmo o *S. cruzi*, que naquêla região é bastante espalhado.

Clark e Dunn não referem a existencia de formas parasitárias nos tecidos dos morcegos nem dos animais infectados com sangue destes.

Para concluir, acreditamo-nos com elementos suficientes para assegurar que o hemoflagelado que isolámos de morcêgos de Lassance não é o *S. cruzi*. Poderá ser o *Schizotrypanum vespertilionis* ou um novo *Schizo-*

Trypanum, distinguível do *S. cruzi* principalmente pela sua não-infectividade para os animais de laboratório.

Sendo os Cheiropteros sensíveis á infecção pelo *S. cruzi*, poder-se-á dar o caso destes mamíferos se apresentarem naturalmente infectados por este parasito nas zonas onde êle existe, como parecem ter verificado Clark e Dunn no Panamá. Nestas zonas dever-se-á sempre proceder á inoculação em Vertebrados sensíveis ao *S. cruzi*, para se distinguir deste parasito o flagelado próprio dos morcegos.

Terminaremos como no nosso trabalho anterior: a possível coexistência dos dois parasitos tão próximos, *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 e *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia 1904), como parece acontecer em Lassance e provavelmente em outras regiões, mostra a importancia e a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a biologia dos tripanosomas dos morcegos.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, S. 1933—Mode de transmission des Protozoaires sanguicoles et particulièrement des Leishmanioses. Bull. Soc. Pat. Ex. XXVI, 207.
- BARRETO, A. B. 1919—Nótas entomológicas. Estudos sobre a anatomia do genero Triatoma. Probócida e tubo digestivo. Brasil Médico, 21, 161.
- BARRETO, A. B. 1923—Nótas entomológicas. Estudos sobre a anatomia do genero Triatoma. Aparêlho salivar. Mem. Inst. Osw. Cruz, XV, 127.
- BATTAGLIA, M. 1904—Alcune ricerche sopra due Trypanosomi (Tryp. vespertilionis, Tryp. lewisi): Ann. Med. Nav., 10, 517.
- BATTAGLIA, M. 1914—Biologische Differentialcharaktere fuer einige Trypanosomen. Centr., f. Bakt., Orig., 72, 582.
- BLACKLOCK, B. 1914—On the multiplication and infectivity of *T. cruzi* in *Cimex lectularius*. Brit. Med. Jour., 1, 912.
- BLANCHARD, M. 1912—Sur un travail de M. le Dr. E. Brumpt intitulé: Étude expérimentale de la Trypanosomiase américaine de C. Chagas. Bull. Acad. Méd. Paris, 67, 24.
- BLANCHARD, M. 1912—Marche de l'infection à *Schizotrypanum cruzi* chez la cobaye et la souris blanche. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 598.
- BORGHI, B. 1932—Bestehen bei *Trypanosoma lewisi* Unterschiede zwischen den Formen aus dem Blute und solchen aus

- dem Uebertrager? Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 113, 490.
- BRUMPT, E. e Da Silva, P. 1912—Existence du Schizotrypanum cruzi à Bahia (Matta de São João). Biologie du Conorrhinus megistus. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 22.
- BRUMPT, E. 1912—Schiz. cruzi à différentes phases de son cycle évolutif. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 261.
- BRUMPT, E. 1912—Le Trypanosoma cruzi évolue chez Conorrhinus megistus, Cimex lectuarius, Cimex boueti et Ornithodoros moubata. Cycle évolutif de ce parasite. Boll. Soc. Path. Ex., 5, 360.
- BRUMPT, E. 1912—Pénétration du Schizotrypanum cruzi à travers la muqueuse oculaire saine. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 723.
- BRUMPT, E. 1913—Évolution de Trypanosoma lewisi, duttoni, nabiasi, blanchardi, chez les puces et les punaises. Transmission per les déjections. Comparaison avec T. cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 6, 167.
- BRUMPT, E. 1913—Immunité partielle dans les infections à T. cruzi. Transmission de ce trypanosome par Cimex rotundatus. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. Bull. Soc. Path. Ex., 6, 172.
- BRUMPT, E. 1914—Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (Rhodnius, Triatoma) pour la conservation des trypanosomas pathogènes en dehors de l'hôte Vertébré. Bull. Soc. Path. Ex., 7, 702.
- BRUMPT, E. 1914—Le xénodagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. Bull. Soc. Path. Ex., 7, 706.
- Brumpt, E. 1919—Maladie de C. Chagas, au Brésil. Mode de transmission, origine, conditions qui déterminent sa répartition actuelle. Bull. Acad. Méd. Paris, 81, 251.
- BRUMPT, E. 1922—Précis de Parasitologie, 3.e éd., Paris, Masson.
- BRUMPT, E. 1927—Précis de Parasitologie, 4.e éd., Paris, Masson.
- Brumpt, E. 1927—Éclécticisme alimentaire des Réduvidés vecteurs du Trypanosoma cruzi. Prêsse Méd., 35, 1161.
- BRUMPT, E., e Gomes, J. F. 1914.—Description d'une nouvelle espèce de

- Triatoma (T. chagasi), hôte primitif du Trypanosoma cruzi Chagas. Ann. Paul. Med. e Cir., 3,73.
- BRUNI, N. 1926—Observations et recherches sur Trypanosoma lewisi et Schizotrypanum cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 19, 791.
- BUCHNER, P. 1921—Tier und Pflanzen in intracellulärer Symbiose. Berlin.
- BUCHNER, P. 1922—Hematophagie und Symbiose. — Die Naturwiss., 10, 703.
- CARINI, A. 1931—Sobre um trypanosoma do sangue de um morcêgo do Brasil. Séptima Reunión Soc. Arg. Patol., Reg. del Norte, Tucmán, Octubre 1931.
- CARPANO, M. 1932—Localisations du Trypanosoma theileri dans les organes internes des Bovins. Son cycle évolutif. Ann. Parasit., X, 305.
- CHAGAS, C. 1909—Nóva tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi. n. gen., n. sp., agente etiológico de nóva entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, I, fasc. 2.
- CHAGAS, C. 1911—Le cycle évolutif de Schizotrypanum cruzi chez l'homme et les animaux de laboratoire. Bull. Soc. Pat. Ex., 4, 467.
- CHAGAS, C. 1912—Sôbre um tripanosoma do Tatú, Tatusia novemcincta. Possibilidade de ser o tatú um depositário do Trypanosoma cruzi no mundo exterior (nóta prévia). Brasil Méd., ano 26, n.º 30, p. 305.
- CHAGAS, C. 1927—Quelques aspects évolutifs du Trypanosoma cruzi dans l'insecte transmetteur. C. R. Soc. Biol., 97, 829.
- CHAGAS, C., VILLELA, E., e ROCHA LIMA, H. da, 1929—Amerikanische Trypanosomenkrankheit, Chagas-Krankheit. In C. Mense, Handb. der Tropenkrankh., 3. Auf., 5, 673.
- CLARK, H. C., e DUNN, H. L.—Experimental Studies on Chagas' Disease in Panamá. Am. Jour. Trop. Med., XII, 49.
- COLLIER, W. A. 1931—Ueber Immunität bei der Chagas-Krankheit der weissen Maus. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 112, 88.
- CUNHA, A. M. 1923—Doença de Chagas (O Schizotrypanum e sua transmissão). Folha méd. ano IV, p. 17.
- DELANOE, M., et Mme. 1912—A' propos du Schizotrypanum cruzi. Bull. Soc. Path. Ex., 5, 599.

- DIAS, EMMANUEL. 1930—Da presença de fôrmas de evolução do Trypanosoma cruzi Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. Mem. Inst. Osw. Cruz, XXIV, 183.
- DIAS, E. 1932—O Trypanosoma cruzi p6de evoluir na cavidade geral do Triatoma megista. Mem. Inst. Osw. Cruz, XXVI, 83.
- DIAS, E. 1932—Le Trypanosoma cruzi pendant les premi6res phases de l'infection exp6rimentale: C. R. Soc. Biol., CX, 203.
- DIAS, E. 1932—Le Trypanosoma cruzi et ses rapports avec le Syst6me r6ticulo-endoth6lial. C. R. Soc. Biol., CX, 206.
- DIAS, E. 1932—Sur les d6j6ctions du Triatoma megista. Aspects du Trypanosoma cruzi que l'on y rencontre. C. R. Soc. Biol., CXI, 486.
- DIAS, E. 1932—Exp6rience sur la transmission du Trypanosoma cruzi de l'Insect au Vert6br6. C. R. Soc. Biol., CXI, 490.
- DIAS, E. 1933—Immunit6 naturelle des animaux 6 sang froid vis-6-vis de l'infection par le Trypanosoma cruzi. C. R. Soc. Biol., CXII, 1474.
- DIAS, E. 1933—Sobre um Schizotrypanum de um morc6go do Brasil. (N6ta preliminar). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, XXVII, 139.
- DIOS, WERNGREN e PEREZ, 1929—Sensibilidad del sapo al T. cruzi. Rev. Soc. Arg. Biol., n.º 8-9, 621.
- FARIA, J. G. e CRUZ FILHO, O. 1927—Sobre a ocorrencia de um est6gio intracelular de desenvolvimento do Trypanosoma cruzi no Triatoma megista Burm. Bol. Inst. Bras. Sc., 3, 375.
- FARIA, J. G. e CRUZ FILHO, O. 1927—Sur l'existence d'un stade 6volutif intracellulaire du Trypanosoma cruzi dans le Triatoma megista Burm. C. R. Soc. Biol., 97, 1355.
- FRANCHINI, G. 1921—Trypanosome de la Chauve-souris en Italie. Formes visc6rales et stades de d6veloppement chez un acarien gamaside, le Leiognathus laverani, n. sp. Bull. Soc. Path. Ex., XIV, 542.
- FREUND, R. 1932—Das Problem des reticulo-endothelialen Systems. (Ein Beitrag zur Partialfunktion der Zelle). Virchows Arch., 286, 526.
- GALLIARD, H. 1929—Remarques sur la culture de Trypanosoma cruzi Chagas. Ann. Parasit., VII, 367.
- GALLIARD, H. 1929—Envahissement pr6coce et intense de la cavit6 abdominale chez la souris au cours des infections 6 Trypanosoma cruzi. Ann. Parasit., VII, 377.

- GALLIARD, H. 1930—Infections à *Trypanosoma cruzi* chez les animaux splenectomisés. Bull. Soc. Path. Ex., XXIII, 188.
- GUERREIRO, C., e MACHADO, A. 1913—A reacção de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como elemento de diagnóstico. Brasil Méd., 23, 225.
- GUGLIELMO, G. 1933—Sistema reticulo-endotheliale. In A. FERRATA, Le Emopatie, 1, 438. Milano.
- HARTMANN, M. 1910—Notiz ueber eine weitere Art der Schizogonie bei Schizotrypanum cruzi Chagas. Arch. f. Protistenk., 20, 361.
- ITURBE, J. e GANZÁLEZ, E. 1916—Un nuevo trypanosoma de Vampirops lineatus. Revista Vargas, Carácas.
- KOFOID, C. A. e DONAT, F. 1933—Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from intestine of Cone-nose Bug, *Triatoma protracta*. Proc. Soc. Exp. Biol a Med., 30, 489.
- KOFOID, C. A. e DONAT, F. 1933—The experimental transfer of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected *Triatoma protracta* to Mammals in California. Bull. Soc. Path. 26, 257.
- KRITSCHIEWSKI, I. e SCHWARZMANN, 1928—Die Bedeutung des reticulo-endothelialen Apparates bei Infektionskrankheiten. Zeitschr. f. Immunitaetsforsch., 56, 322.
- KUROTCHKIN, J. T. e CHUNG, H. L. 1930—Kala-Azar infection as a Biological method of blocking the Reticulo-endothelial-systems. The Nat. Med. Jour. of China, XVI, 43:
- KUSKOP, M. 1923—Bakteriensymbiosen bei Wanzen (Hemiptera Heteroptera). Arch. f. Protistenk., 47, 350:
- LACORTE, J. G. 1926—A reacção d odesvío de complemento na moléstia de Chagas. Tése de doutoramento, Rio de Janeiro.
- LACORTE, J. G. 1927—A reacção do desvío de complemento na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, XX, 197.
- LAFONT, A. 1912—*Trypanosomide* d'un Réduvide (*Conorrhinus rubrofaciatus*) inoculable à la souris. Ann. Inst. Pasteur, 26, 893.
- LAVERAN e MESNIL 1912—*Trypanosomes* et *Trypanosomiasés*, 2e édition.
- LAVERAN, 1917—*Leishmaniosés*. Masson et Cie., Paris.
- LIMA, A. da Costa, 1927—Notas sobre o *Telenomus fariai*, novo Scelionideo, parasito endóphago dos óvos de *Triatoma megista* Burm. Sciencia Méd. 5, 450.

- MARCHAL, P. 1890—L'acide urique et la fonction renale chez les Invertébrés. Mem. Soc. Zool. France, 111, 31.
- MAYER, M. 1922—Ueber die Vererbung von Schizotrypanum cruzi im Zwischenwirt. Münch. Med. Woch., 40, 1444.
- MAYER, M. e ROCHA LIMA, H. da 1912—Zur Entwicklung von Schizotrypanum cruzi in Säugetieren. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., 16, 376.
- MAYER, M. e ROCHA LIMA, H. da 1914—Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., 18, Beih., 257.
- MAZZA, S. 1926—Observación de infección espontánea del perro por el Schizotrypanum cruzi. Primera Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. del Norte, Jujuy.
- MINCHIN, E. A. 1914—The development of Trypanosomes in Invertebrate Host. Nature, 94, 406.
- MINCHIN, E. A. e THOMSON, J. D. 1915—The Rat-trypanosome, Trypanosoma lewisi, in its relation to the Rat-flea, Ceratophyllus fasciatus. Quart. Jour. Microsc. Science, 60, 463.
- NATTAN LARRIER 1921—Infections à trypanosomes et voies de pénétration des virus. Bull. Soc. Path. Ex., 14, 537.
- NEIVA, A. 1910—Informações sobre a biologia do Conorrhinus megistus Burm.-Mem. Inst. Osw. Cruz, 2, 206.
- NEIVA, A. 1913—Transmissão do Trypanosoma cruzi pelo Rhipicephalus sanguineus. Brasil Méd., 46, 498.
- NEIVA, A. 1914—Contribuição para o estudo dos Reduvidos hematofagos. Mem. Inst. Osw. Cruz, 6, 35.
- NICOLLE, C. e Comte, 1908—Sur un trypanosome d'une Chauve-souris, Arch. Inst. Past. Tunis, 3, 69.
- NICOLLE, C. e COMTE 1909—Contribution à l'étude du Trypanosoma vespertilionis, Arch. Inst. Past. Tunis, 4, 202.
- NIESCHULZ, O. e RONTOE, F. K. W. 1930—Ueber den Einfluss der Milzextirpation bei Infektionen mit Trypanosoma gambiense und Schizotrypanum cruzi. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 65, 312.
- NINO, F. L. 1925—Ensaíos de infección experimental del Bufo marinus (sapo) con Schizotrypanum cruzi. Prensa Méd. Arg. XI, 1154.
- NOEL, R. e TAHIR, E. 1929—Des prolongements dits ciliformes des cellules de l'épithélium des tubes de Malpighi chez Bombix mori. Arch. Anat. Micr., XXV, 586.

- NOELLER, W. 1917—Blut- und Insektenflagellatenzuchtung auf Platten. Arch. F. Schiffs- und Trop.-Hyg. 21, 53.
- NOELLER, W. 1920—Neuere Forschungen auf den Gebiete der Trypanosomenzüchtungen. Arch. f. Schiffs- u. Trop. Hyg., 24, 168.
- NOELLER, W. 1931—Die Züchtung der parasitischen Protozoen. In Handb. der Path. Protozoen, V. Prowazek, Bd. 3, 1815.
- PACKARD, A. 1909—Text-book of Entomology, p. 186.
- PATTON, W. S. e EVANS, A. M. 1929.—Insects, Ticks, Mites and venomous animale of medical and veterinary importance. 1, 589.
- PINTO, C. 1930—Tratado de Parasitologia. IV—Arthropodes parasitos e transmissores de doenças. Bibliotéca Científica Brasileira.
- PITTALUGA, G. 1927—Die «Blockierung» des reticulo-endothelialen-Systems bei vizeraler Leishmaniose (Kala-azar) Arch. f. Schiffs- u. Tropen. Hyg., 31, 340.
- PRINGAULT, E. 1914—Non pathogenicité du Trypanosoma vespertilionis (Battaglia) pour les animaux de laboratoire. C. R. Soc. Biol., 76, 883.
- REGENDANZ, P. 1930—Der Verlauf der Infektion mit Schizotrypanum cruzi (Chagas) bei jungen Ratten und über die Unempfänglichkeit erwachsener Ratten für Schizotrypanum. Centralbl. f. Bakt., Orig., 116, 256.
- RIBBERT, H. 1904—Die Abscheidung intravenös injizierten gelösten Karmins in den Geweben. Zeitschr. Allg. Physiol., 4, 201.
- ROUBAUD, E. 1919—Les particularités de la nutrition et la vie symbiotique chez les mouches Tsétsés. Ann. Ins. Pasteur, 33.
- SCHILLING, A. 1904—Über die Tsetsekrankheit oder Nagana Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh., 21, 476.
- SERGENT, Ed. e Et. 1905—Sur des trypanosomes des Chauves-souris. C. R. Soc. Biol., 58, 53.
- SOUZA CAMPOS, E. 1929—Studies upon a neurotropic strain of Trypanosoma cruzi. Jour. Techn. Meth. a. Bul. Internat. Ass. Med. Museum. XII, 146.
- SOUZA CAMPOS, E. 1929—Alterações pathológicas do tecido adiposo na molestia de Chagas congenita experimental. Bol. Biológico, 15-16, 75.
- SOUZA CAMPOS, E. 1929—Córpos intranucleares nas celulas do reticulo endotelial do ganglio limfático parasitado pelo Schi-

- zotrypanum cruzi. Nota prévia. Bol. Biológico, 15-16, 99.
- SZENT-GYORGYI, A. 1921—Kataphoreseversuche an Kleinlebewesen. Bioch. Zeitschr., 113, 29.
- TALICE, R. V. 1929—Parasitisme de Triatoma rubrovária par un Sporozoaire. Ann. Parasit., VII, 257.
- TORRES, C. M. 1915—Alguns fatos que interessam á epidemiologia da moléstia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, VII, 120.
- TORRES, C. M. 1918—Observação sobre a infecção sanguínea em animais inoculados com o Trypanosoma cruzi. Anais do VIII Congresso Bras. de Med., Vol. 1, 1925, p. 411.
- TORRES, C. M. 1922—Cultura do Schizotrypanum cruzi, Chagas, 1909, em meio liquido. Influencia da concentração dos ions H sobre a cultura. Verificação precóce do Schizotrypanum no sangue. Brasil Méd., ano 36, 317.
- TORRES C. M. 1930—Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas. Quinta Reunión Soc. Arg. Pat. Regional del Nórte, Jujuy, 2, 902.
- TORRES, C. M. e PENNA DE AZEVEDO, A. 1930—Celulas con membrana quística encerrando el Trypanosoma cruzi. Quinta Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. del Nórte, Jujuy, Octubre 1929, 2, 868.
- VIANNA, G. 1911—Contribuição para o estudo da anatomia patológica da da Molestia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, 3, 276.
- VIANNA, G. 1914—Parasitismo da célula muscular lisa pela Leishmania brasiliensis. Mem. Inst. Osw. Cruz, 6, 40.
- VILLELA EURICO 1924—Molestia de Chagas. Ann. 2º Congr. Bras. Hyg. Belo Horizonte, p. 103.
- VILLELA, E. 1925—Variação do poder pathogenico do Trypanosoma cruzi (raça neurotrópica). Sciencia Méd., ano 3, p. 147.
- VILLELA, E. 1930—Da occurrencia da doença de Chagas nos hospitais de Belo Horizonte e na população de seus arredores. Folha Méd., 20, 229.
- VILLELA, E., e TORRES, C. M. 1926—Estudo histopathológico do systema nervoso central em paralyasia experimental pelo Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Osw. Cruz, 19, 175.
- VILLELA, E. e VILLELA, EUDORO 1932—Elemento do Systema nervoso central parasitados pelo Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Osw. Cruz, 26, 77.

- VOLTERRA, M. 1927—Ricerche sul Sistema reticolo istiocit rio. Lo Spirimentale, ano 81, 319.
- WENYON, C. M. 1926—Protozoology.
- WENYON, C. M. 1932—The transmission of Leishmania infections. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hgy., XXV, 319.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1929—Digestion in the Tsetse-fly: a study of structure and function. Parasitology, 21, 288.
- WOODCOCK, H. M. 1906—The Haemoflagellates. Quart. Jour. Microsc. 50, 151.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS 1—12

ESTAMPA 1

- Fig. 1—*S. cruzi* no sangue periférico de cobaia esplenectomizada, em divisão incompleta. 2 nucleos, 2 flagelos, blefaroplasto volumoso situado a igual distancia da extremidade posterior e do nucleo. Alcool absoluto, Giemsa.
- Fig. 2—Ponto de inocula o de cão injectado com *S. cruzi*, raça humana, 5 dias depois da inocula o. Tecido subcutaneo com numerosos histiocitos parasitados. Zenker, H. E. (C. R. Soc. Biol., CX, 1932).

ESTAMPA 2

- Figs. 3-4—Ganglio linfatico superficial de cão, próximo ao ponto de inocula o. Numer sos elementos parasitados, celulas gigantes. *S. cruzi*, raça humana, 12^o dia de infec o. Zenker, H. E. (Fig. 4—C. R. Soc. Biol., CX, 1932).

ESTAMPA 3

- Fig. 5—Celulas do tecido sub-cutaneo de cão inoculado sob a p le em varios pontos com *S. cruzi* e dias depois injetado nos mesmos lugares com colóides. A, célula com parasitos e tinta da China. B, celula contendo leishmanias (1) e colargol (11). (C. R. S. B. idem).
- Fig. 6—Gigantocito quistico do cora o do tat  com infec o natural. Zenker, H. E. 1100 vezes.

ESTAMPA 4

- Fig. 7—Tubo digestivo de *T. megista* adulto, femea. O intestino anterior corresponde   tromba e   porão esbranquiçada que se segue   cabeça. O intestino médio mostra nitidamente suas duas porões, a

anterior, sacular, cheia de sangue em digestão, e a posterior, alongada, tubular, confinando com a empôla retal que é arredondada e de côr branca. A notar o grande desenvolvimento do intestino médio e a baixa inserção dos tubos de Malpighi. Material fresco, aumento pouco mais de 1 vez.

Fig. 8—Exemplares adultos de *T. megista* abertos pela face dorsal (5º tempo de dissecação), para mostrar a disposição natural dos órgãos internos na cavidade abdominal. A lamina quitinosa dorsal foi destacada, dobrada para trás e fixada por um alfinete á parafina. Material fresco. Aumento cerca de 2 vezes.

ESTAMPA 5

Fig. 9—Intestino posterior de larva de *T. megista* sacrificada poucos minutos depois de se alimentar. Empôla retal fôrtemente distendida pelas dejeções limpidas. Material fresco, entre lamina e laminula. No interior vê-se acumulada certa quantidade de cristais de uratos, junto ao ultimo anel abdominal. Fotografia tirada com a lamina mantida em posição vertical. 7 vezes.

Fig. 10—Córte de duodeno de *T. megista* com infecção antiga. Critidias numerosas. Zenker, Giemsa.

ESTAMPA 6

Fig. 11—Córte longitudinal quasi mediano de intestino posterior de *T. megista* adulto. Carnoy, Giemsa.

- 1)—porção terminal dos tubos de Malpighi.
- 2)—epitélio do intestino médio junto ao pilóro.
- 3)—formação epitélial derivada das empôlas terminais.
- 4)—epitélio estriado retal.
- 5)—camada de parasitos aderentes ao epitélio retal.
- 6)—porção quitinosa do réto com numerosos parasitos.
- 7)—tubo de Malpighi.

Fig. 12—Córte da mesma região do mesmo inséto.

- 1)—empôlas terminais com alguns parasitos.
- 2)—epitélio rétal estriado.
- 3)—camada parasitaria.
- 4)—zona quitinosa com parasitos.
- 5)—tubos de Malpighi.
- 6)—intestino médio.

ESTAMPA 7

Fig. 13—Epitélio rétal do mesmo inséto, recoberto por densa camada de parasitos (haptomonas). Vêm-se também parasitos na empôla terminal e no início, da zona quitinosa do réto, onde o epitélio parece destacado. 310 vezes.

Fig. 14—Parede rétal (A) e tubo de Malpighi (B) parasitados (haptomonas). A fig. A é semi-esquemática.

ESTAMPA 8

Fig. 15—Córte longitudinal de tubo digestivo de *T. megista* adulto.

A—Intestino médio.

B—Região pilórica, embocadura dos tubos de Malpighi (atrium).

C—Empôla rétal regularmente distendida por dejeções:

1—epitélio do mesênteron.

2—camada muscular.

3—divertículo junto ao orifício pilórico.

4—epitélio das empôlas terminais dos vasos excretôres.

5—epitélio rétal.

6—haptomonas.

7—parêde quitinosa do réto (lesada em certos pontos acidentalmente).

8—prolongamento do epitélio das empôlas terminais.

9—camada muscular rétal.

10—tubo de Malpighi.

ESTAMPA 9

Fig. 16—Tubos de Malpighi de *T. megista* adulto, com numerosas critídias. (Mem. Inst. Osw. Cruz, XXIV, 1930).

ESTAMPA 10

Fig. 17—Primeiras dejeções lípidas de *T. megista*, contendo traços de fêses. Formas metacíclicas numerosíssimas. 225 vezes. Alc. absoluto, ácido ósmico; Giemsa. (C. R. Soc. Biol., XC1, 1932).

Fig. 18—Tripanosomas metacíclicos das dejeções hialinas. 1.200 vezes. Mesma técnica. (idem).

ESTAMPA 11

Fig. 19—Fórmãs evolutivas do *S. cruzi* no tubo digestivo do *T. megista*.

1- 2	estomago,	24 horas	(adulto)
3- 8	”	4 dias	(larva)
9-10	”	21 dias	”
11-16	”	36 dias	(ninfa)
17-21	duodeno	48 horas	(larva)
22-27	”	5 dias	(larva)
28-29	”	5 dias	(adulto)
30-34	”	36 dias	(ninfa)
35-48	réto—	(infecções antigas, ninfas e adultos).	

Fixação pelo acido ósmico e alcool absoluto. Giemsa.

ESTAMPA 12

Células parasitadas de *Phyllostomus hastatus* Zenker, H. E.

Fig. 20—Célula do pulmão. 950 vezes.

Fig. 21—Célula do intestino delgado. 440 vezes. (Mem. I. O. C., XXVII, 1933).

(x)—Todas as figuras são originais. Algumas, conforme a indicação que as acompanha, já foram anteriormente publicadas.

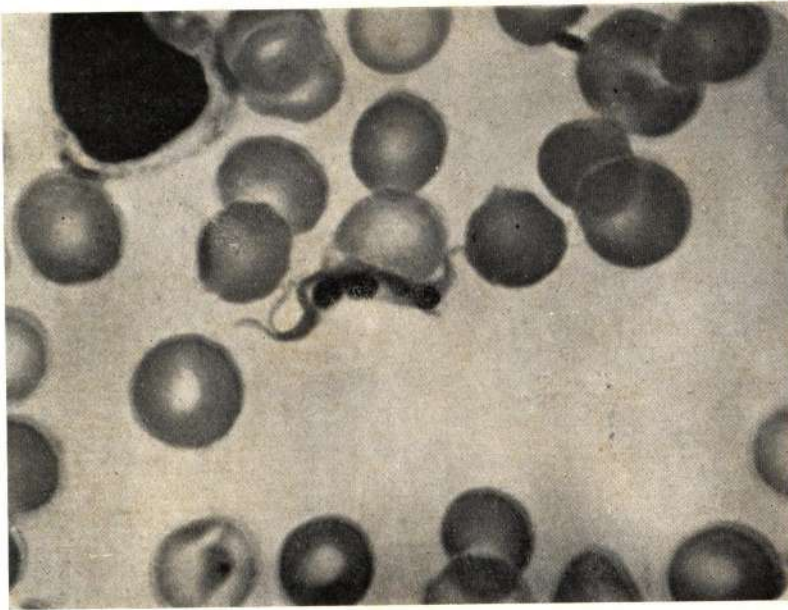


Fig. 1



Fig. 2

Emmanuel Dias: Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.



Fig. 3

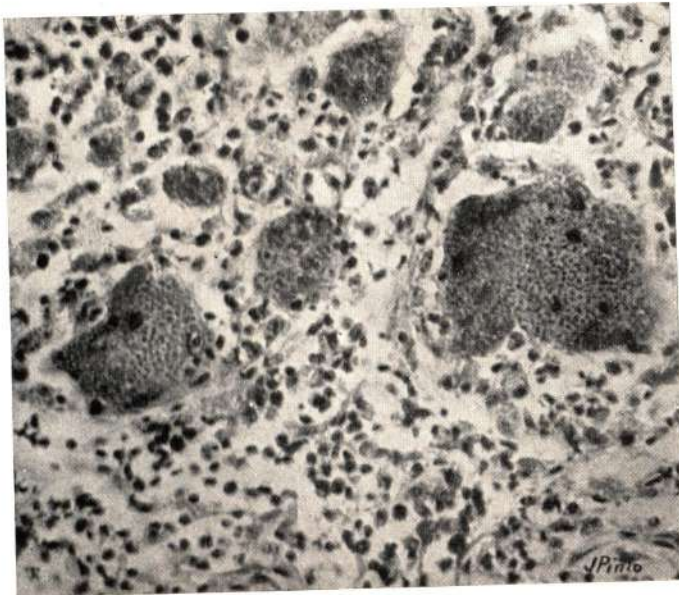


Fig. 4

Emmanuel Dias: Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.

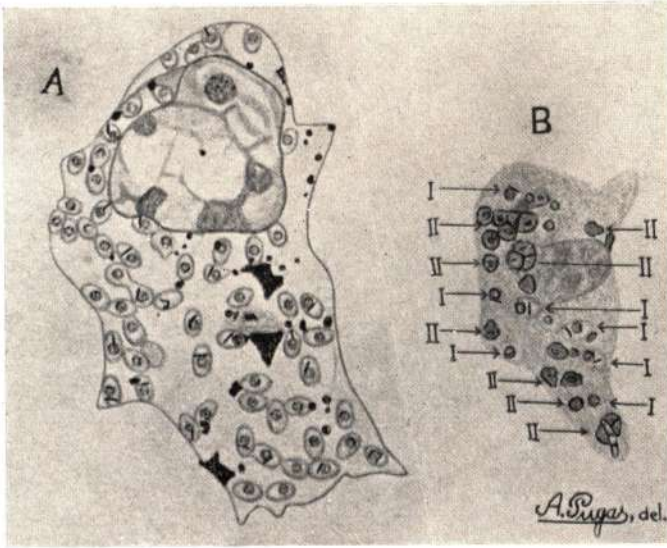


Fig. 5

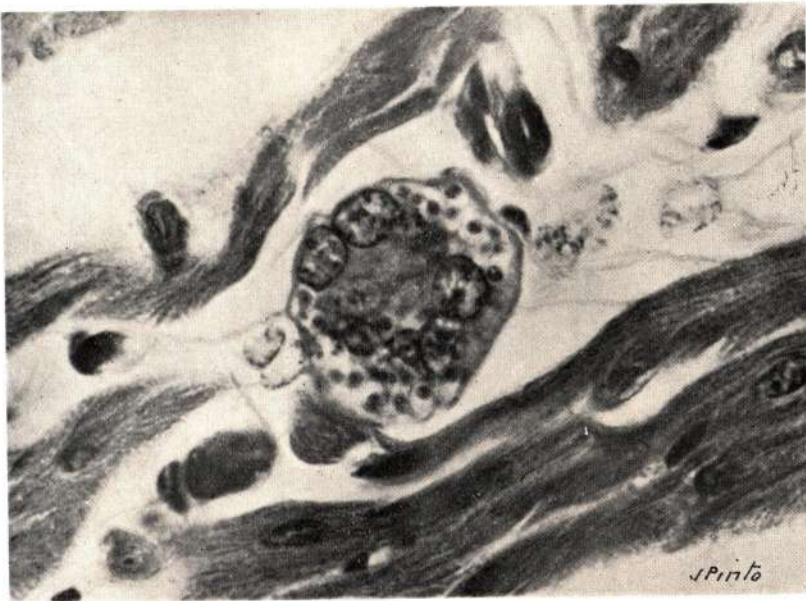


Fig. 6

ESTAMPA 4

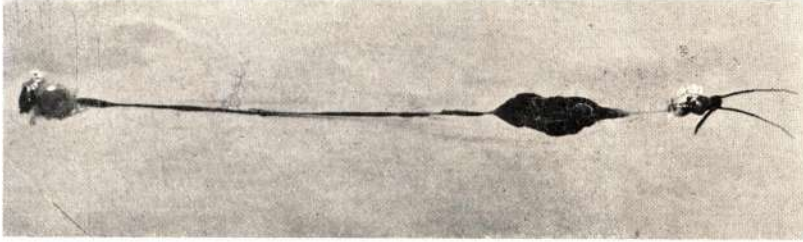


Fig. 7

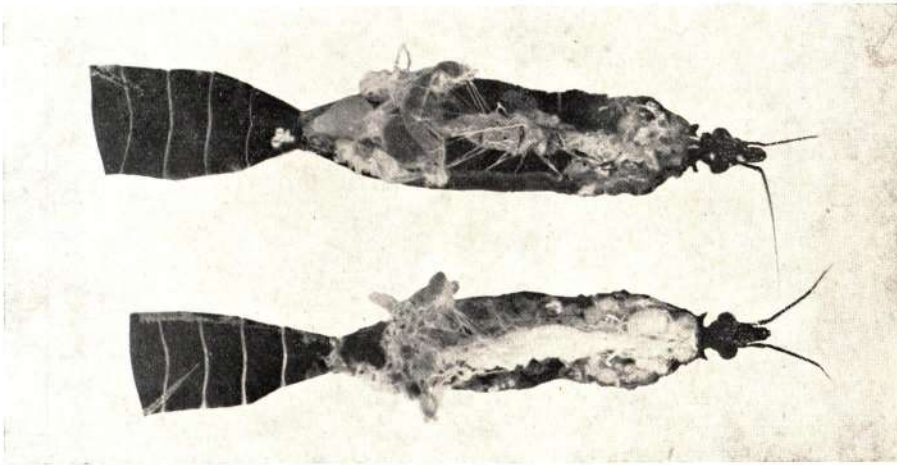


Fig. 8



Fig. 9

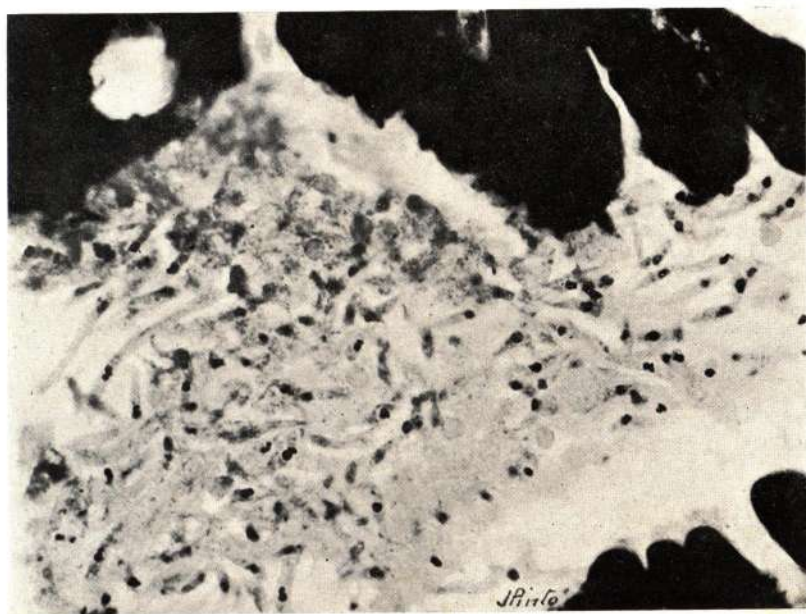


Fig. 10

Fotomicro de J. PINTO

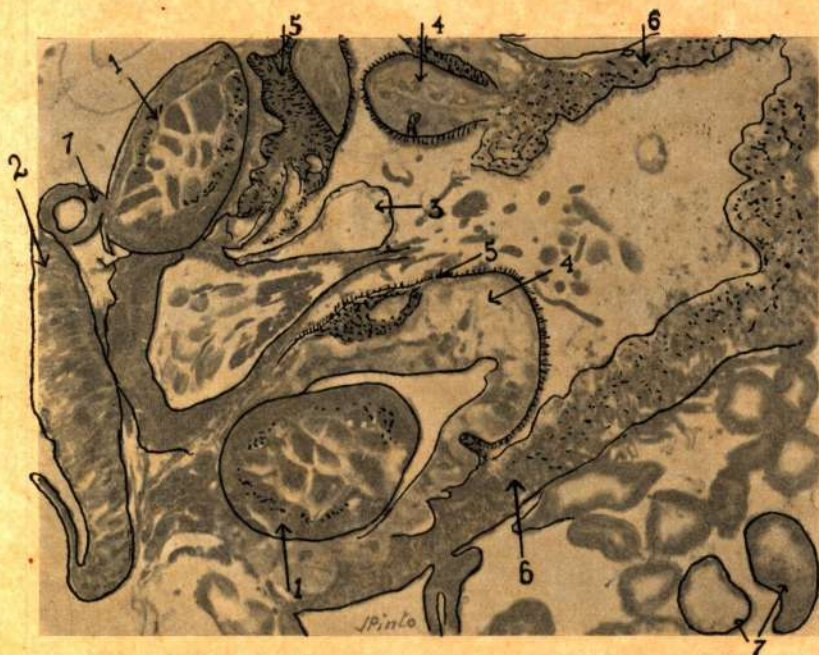


Fig. 11



1 Fig. 12

Fotomicro de J. PINTO

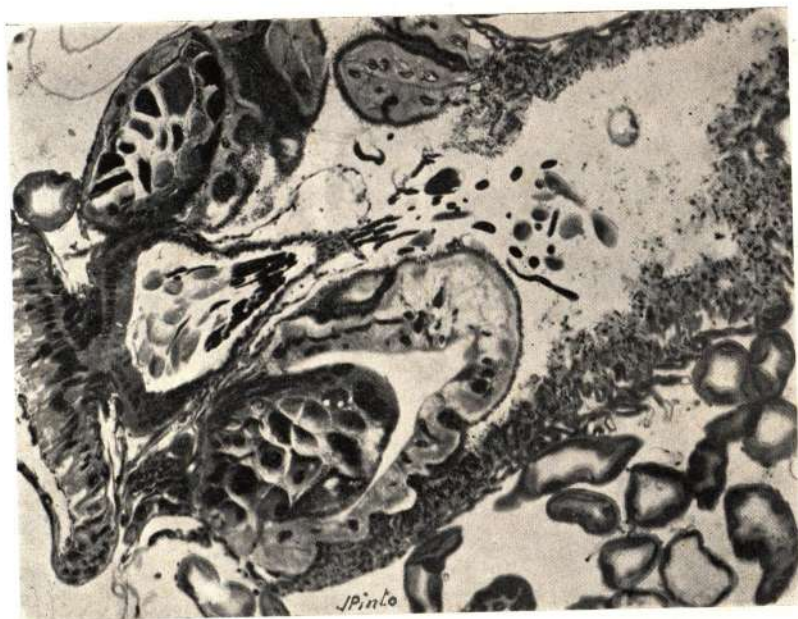


Fig. 11



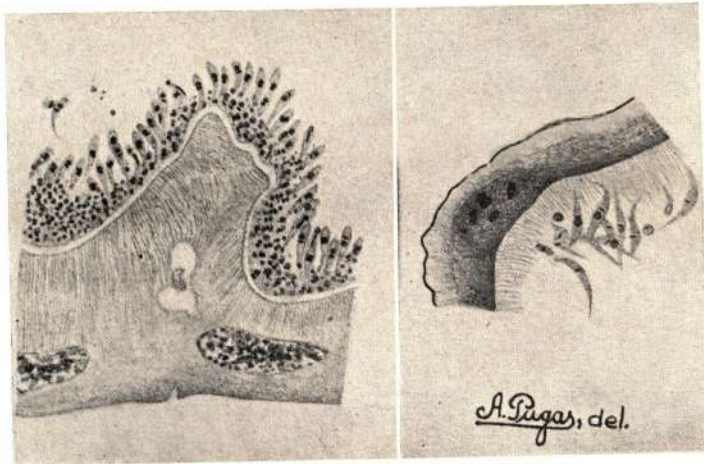
Fig. 12

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 13

Fotomicro de J. PINTO



A

Fig. 14

B

Emmanuel Dias: Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.

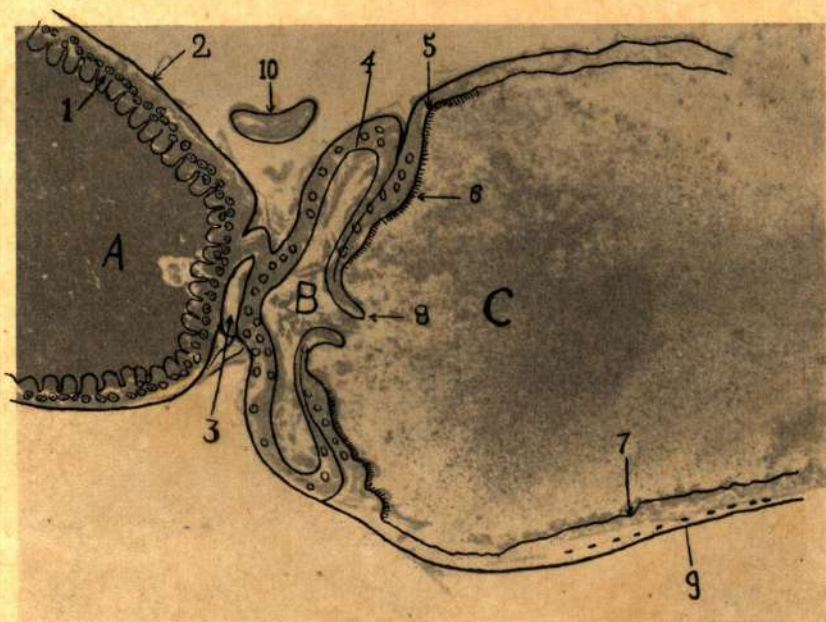


Fig. 15

Fotomicro de J. PINTO

ESTAMPA 8

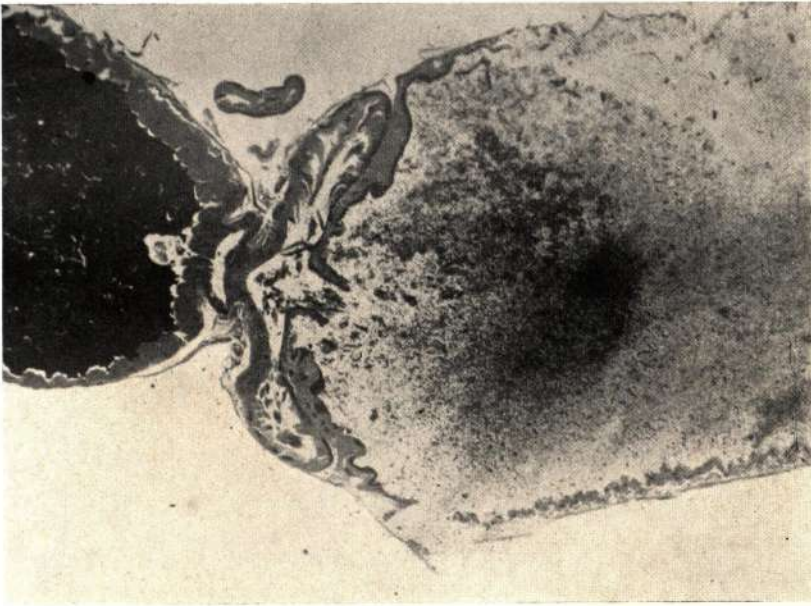


Fig. 15

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 16

Fotomicro de J. PINTO

Emmanuel Dias : Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.



Fig. 17

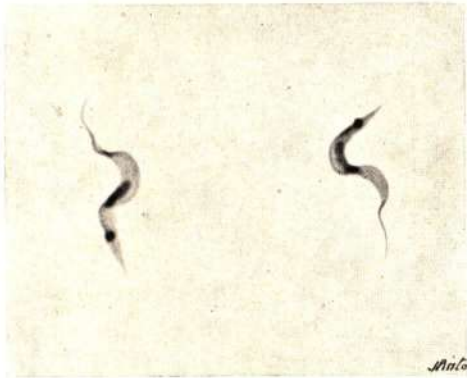


Fig. 18

Fotomicro de J. PINTO

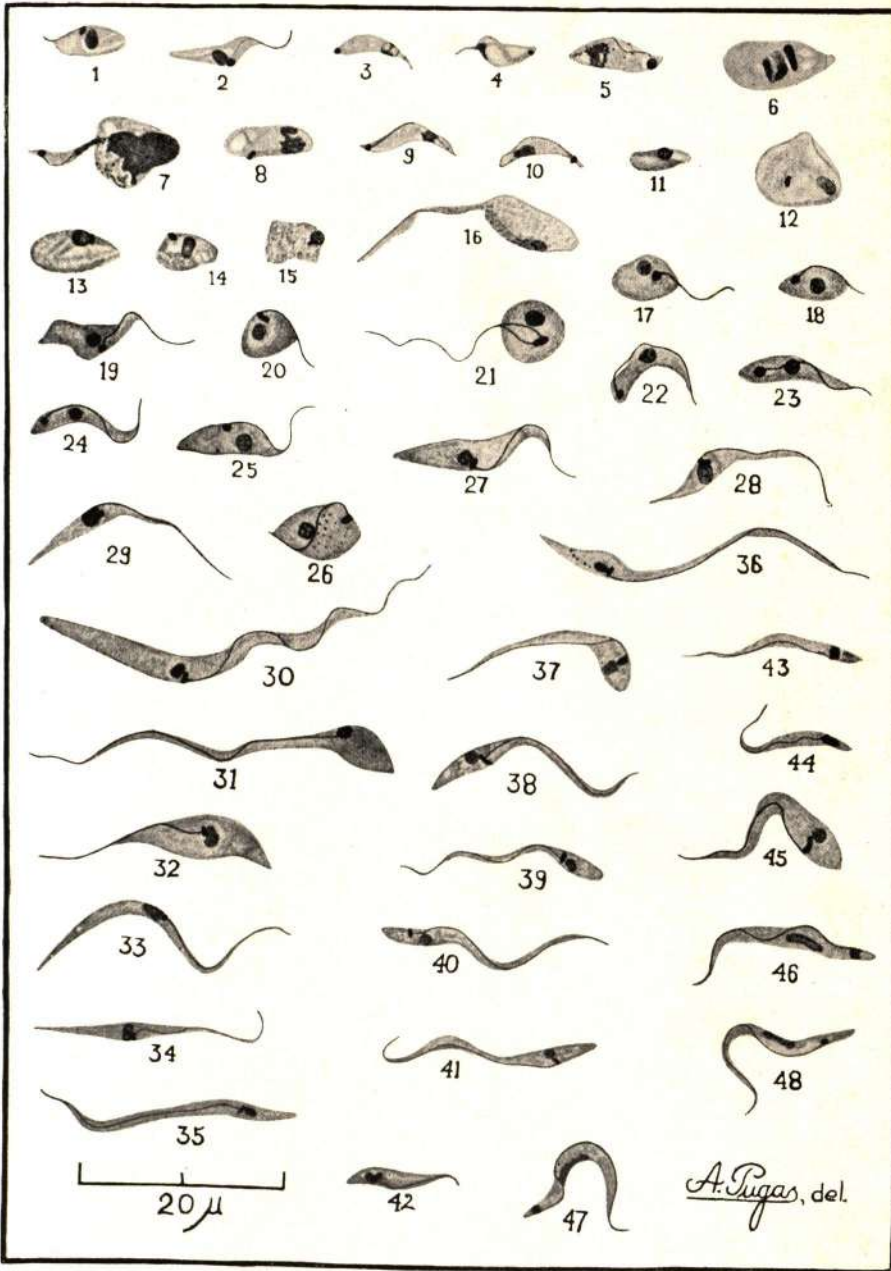


Fig. 19

Emmanuel Dias: Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.

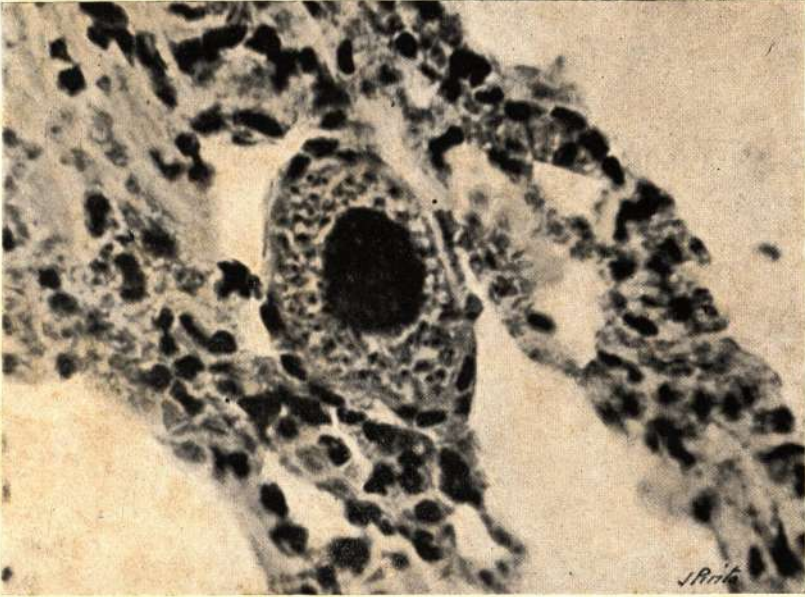


Fig. 20

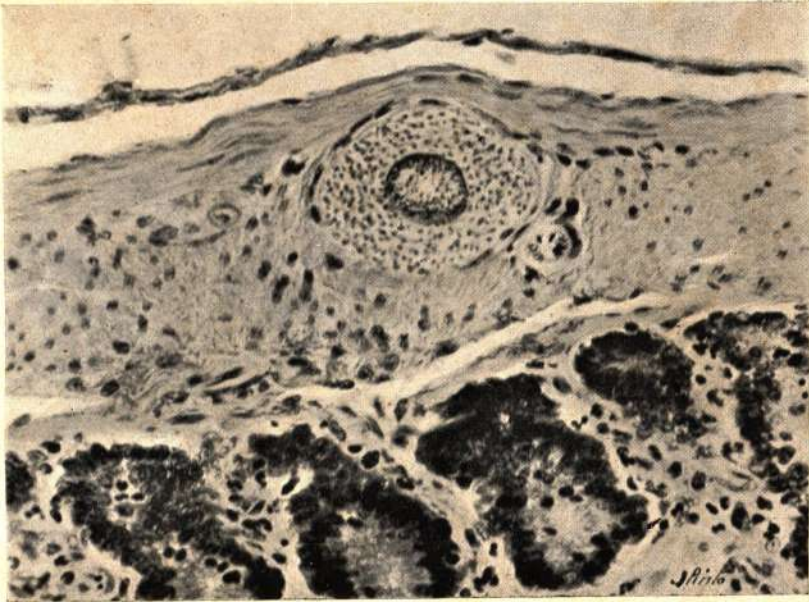


Fig. 21

Fotomicro de J. PINTO