

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXVIII

Fevereiro---1934

Fasciculo 1

Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi* (*)

pelo

DR. EMMANUEL DIAS

(Com as estampas I — XII)

INDICE

I) Introdução.....	1
II) <i>S. cruzi</i> no organismo do Vertebrado.....	3
III) <i>S. cruzi</i> no organismo do Invertebrado.....	33
IV) Transmissão do Inséto ao Vertebrado.....	73
V) Cultura in vitro e na cavidade geral do <i>T. megista</i> ..	81
VI) Pesquisas in natura.....	90
VII) Bibliografia.....	98
VIII) Explicação das estampas.....	107

INTRODUÇÃO

A descoberta do *Schizotrypanum cruzi* por Carlos Chagas trouxe novo campo de pesquisas no dominio da Biologia e da Medicina Tropical. Pelos trabalhos de Chagas adquiriu a Ciencia os conhecimentos fundamentais sobre uma nova doença humana: o agente etiologico e sua transmissão por Hemipteros hematófagos; os reservatórios de virus na natureza; sua atividade patogenica para os animais de laboratorio, traduzindo-se no homem por quadros clinicos complexos, — tais foram em

(*) Tése de doutoramento, apresentada á Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro. Defendida em 21 de Dezembro de 1933 e aprovada com distinção.

grandes linhas os conhecimentos com que enriqueceu a Ciencia um unico pesquisador.

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

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

Em 1930 continuámos nossos trabalhos, já então no Instituto Oswaldo Cruz directamente 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 tambem imprescindiveis ao trabalho experimental qualidades pessoais que só se adquirem em longos anos de lida continua no laboratorio.

Reunimos neste publicação, que apresentámos 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 ter podido 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 biologia do agente patogenico e dos inséto transmissores até as expressões clinicas e a terapeutica da doença humana. Seus capitulos concernem a aspéto 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 con-

tribuição 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 iniciada no index geral e no sumário que se ségüe ao título de cada capitulo. Naturalmente, o título 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 de pesquisas anteriores, focalizando aspectos 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 fatos 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.

Após a apresentação da tése á Faculdade de Medicina, foram feitos ligeiros retoques em diversos pontos deste trabalho, e acrescentados os resultados de algumas experiencias não publicadas, além de nóvas referencias bibliográficas.

II) — *Schizotrypanum cruzi* no organismo do Vertebrado:

Sumário: — A) — Evolução inicial da infecção experimental: distribuição dos parasitos no organismo; inoculação de fórmãs sanguícolas: passagem para o sangue, duração da fase sanguinea inicial, periodo de incubação, infectividade dos parasitos durante a fase sanguinea inicial, morfología no sangue e nos tecidos; inoculação de tripanosomas metacíclicos; distribuição segundo a vía de inoculação.

B) — Marcha geral da infecção: sensibilidade de animais; virulencia, raças de *S. cruzi*, genealogia; *S. cruzi* no sangue e nos tecidos; Sistema reticulo-endotelial: adaptação e afinidade pelo SRE, mecanismo de penetração nas células; papel de defeza do SRE, bloqueios e esplenectomias.

C) — Imunidade adquirida: desaparecimento dos parasitos do sangue; reinoculações, recidivas; ação protetora do sôro de animais imunes; anticórpas. Imunidade natural: animais de sangue frío e de sangue quente.

EVOLUÇÃO INICIAL DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Trataremos em primeiro lugar da distribuição inicial dos parasitos durante as primeiras fases 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 nota 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 fórmias 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 intraperitonial (cão de 720 gr.). C. Chagas Filho em experiencia inédita verificou tambem a rapida 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 fórmias finas ou das fórmias largas, pódem aí permanecer por varios dias, não migrando para os tecidos e não se dividindo no sangue: constituem uma fase da infecção a que propuzemos 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 aumento crescente do numero de parasitos, pela chegada daqueles resultantes da multiplicação intracelular. Pelo fato que acabamos de expôr, não se pôde 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 aparecimento na circulação dos tripanosomas recémformados nos tecidos, que determina um aumento numerico sensível dos parasitos no sangue.

Nos diversos animais 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 injetado 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 sanguinea 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 destruidos; já vimos que aí 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 permanencia de flagelados no sangue periferico durante o « periodo de incubação » pôde ser attribuida seja á sua capacidade definitiva de migrar para os tecidos, seja á sua incapacidade provisoria. Para verificar a infectividade dos tripanosomas sanguicolas durante a fase sanguinea inicial fizemos as seguintes experiencias:

1)—Foi inoculado intraperitonalmente em 17-II-33 um camondongo branco com 2 c. c. de sangue de cobaia infectada. Diariamente, até o dia 21 do mesmo mez, retiravam-se deste camondongo, por secção da extremidade

da cauda, 5-6 gotas de sangue que eram recebidas em sôro fisiologico citratado e inoculadas em outros camondongos, depois de verificada a presença de tripanosomas. O seguinte quadro resume os resultados obtidos:

QUADRO 1

Camondongo no.	Data da inoculação	R e s u l t a d o s															
		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 camondongo 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 fásé sanguinea inicial ha parasitos na circulação infectantes, isto é, capazes de se localizarem no interior de elementos anatomicos e aí se multiplicarem.

— Morfología 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 «fórma 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 fórma de leishmania e passando pela fórma de *critidia*, transformam-se em tripanosomas. A fásé intermediaria de *critidia* tem curta

duração; durante a mesma os flagelados ainda podem se dividir. As leishmanias reproduzem-se por divisões binárias simples e excepcionalmente por divisões múltiplas. Em frottis de órgãos de animais sacrificados durante a fase inicial de multiplicação encontramos raras vezes massas protoplasmáticas 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 metacíclicos — Quando se inoculam pequenos animais com certas dejeções de triatomas, muito ricas em tripanosomas metacíclicos, 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 formas metacíclicas do inseto, os tripanosomas não aparecem no sangue pouco depois, ao contrario do que acontece com aqueles inoculados com as formas sanguícolas do *S. cruzi*. Nos animais injetados com dejeções ou conteúdo intestinal de barbeiros infectados o aparecimento dos primeiros parasitos na circulação assinala 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 metacíclicos têm por certos elementos dos tecidos e pela sua grande capacidade de penetração. A permanencia destas formas 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 camundongos, observou o aparecimento de parasitos no sangue 6, 30, 48 horas, 3 e 7 dias depois da inoculação. Em camundongos 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 veículação pelo sangue. A localização nos tecidos é mais rapida e quasi sempre directa quando se inoculam formas 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 formas sanguícolas, dos tripanosomas que passam para a circulação alguns se localizam em diversos or-

gãos, enquanto que outros permanecem no sangue determinando a fase sanguinea inicial. As seguintes observações mostram a importancia do ponto de inoculação como fóco de proliferação inicial:

Cão de 795 gr. inoculado sob a péle 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 sanguinea aumentou no 5.º dia, quando foi sacrificado.

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

Camondongo adulto inoculado com sangue infectado em 1-XI-32, subcutanea e intraperitonealmente; exames de sangue positivos nos dias 4, 5, 6 (fórmulas finas), 7, sacrificado a 9 do mesmo mez. Frottis: ponto subcutaneo inoculado-leishmanias e tripanosomas. Peritonio (raspagem)-muito raras leishmanias. Baço, negativo; fígado-tripanosomas sanguicolas. Córtes: Ponto de inoculação-numerosas células parasitadas no tecido conjunctivo subcutaneo e entre os feixes musculares; não encontramos leishmanias no interior de fibras musculares. Não achamos células 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: Ponto de inoculação—raras leishmanias. Baço, fígado e testiculo, negativos. Córtes: Ponto de inoculação — células relativamente pouco numerosas repletas de parasitos (leishmanias ou tripanosomas); células 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 encontramos 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 (triptanosomas relativamente numerosos). Retirámos e incluímos pequenos fragmentos de tecido dos pontos inoculados 5, 11 e 16 dias depois da inoculação, em cujos córtes encontrámos células parasitadas cada vez mais numerosas quanto maior o tempo decorrido desde a inoculação. Nos pontos em que eram feitas as biópsias formavam-se úlceras 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, fígado, 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 fórmulas 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 quaes 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 injétadas, como se vê pelas seguintes experiencias:

Cão de 1200 gr., inoculado em 16-XI-32 com pequena quantidade de urina hialina de triatoma infectado, diluida em agua fisiologica. 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 numero 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 córtes de bulbo e medula espinhal encontrámos focos parasitarios esparsos, que não foram vistos no cerebro. Outros órgãos não foram examinados.

Gatinho inoculado pelo Dr. E. Villela em 9-IV-32, na camara 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 11.º dia. No humor aquoso do olho inoculado havia tripanosomas relativamente abundantes, quando morreu; no humor vitreo não achámos parasitos. Nos córtes do olho viam-se numerosos elementos do tecido conjuntivo, córnea e iris parasitados. 2 ou 3 dias depois da inoculação a córnea se apresentava opacificada.

Quanto á via de inoculação sanguinea não ha nada de particular a ser assignalado. A maioria dos parasitos se localiza em diversos órgãos, emquanto que alguns permanecem na circulação ocasionando a fase sanguinea inicial, no caso da inoculação de tripanosomas sanguicolas.

Pelas experiencias que acima referimos vê-se que, de uma maneira geral, qualquer que seja a via de inoculação utilizada, tanto as fórmas sanguicolas como as fórmas metaciclicas 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 séde de sua proliferação inicial.

MARCHA GERAL DA INFECÇÃO

Os tripanosomas resultantes da multiplacção intracelular cáem na circulação e se espalham por todo o organismo, localizando-se em elementos celulares dos diversos órgãos, onde novamente se multiplicam. A infecção póde evoluir agudamente, pelo aumento crecente e rapido do numero de parasitos nos tecidos e no sangue, terminando pela morte do animal, ou tornar-se crónica após uma fase sanguinea mais ou ou menos intensa e de duração variavel.

Quanto á presença de parasitos no sangue periferico ha nitida diferença entre as infecções humanas e as dos animais de laboratorio. Ao passo que naquelas os tripanosomas só pódem ser encontrados pelo exame directo do sangue, e geralmente em pequeno numero, durante os primeiros dias de molestia, nestas, ao contrario, pódem 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 sensivel 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 sensiveis 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 quais a infecção é em geral mais intensa que nas cobaias. Os camondongos brancos tam-bem se prestam muito á experimentação com o *S. cruzi*. Os animaes jovens são mais sensiveis á infecção (Chagas).

Tanto nos casos cronicos da tripanosomiase americana, como nos animaes que já não têm infecção sanguinea apreciavel, os parasitos pódem por muito tempo conservar-se nos tecidos sob a fórma de leishma-

nia, vivos e ativos; este fáto explica a presença ocasional de tripanosomas no sangue de enfermos cronicos, do qual pódem 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 animais portadores de infecção natural, tatús, cães e gatos. Os quadros 2, 3 e 4 das pags. 12 e 13, 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 animais 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.

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; atualmente 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 a augmentar os parasitos no sangue.

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

QUADROS 2 e 3

Amostras de *S. Cruzi* isoladas de cães com infecção natural em Lassance (Abril 1933)

Cão da cafúia de Geremias

(2)

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

Cão da cafúia de Argemiro

(3)

Passagem	Animal inoculado	Sangue injectado de	Data da inoculação	Data da morte	Dias de infecção
1a.	Cobaia	Cão	3-IV	17-IV	14
	«	«	«	9-IX	159
	Cão	«	7-IV	28-IV	21
2a.	Sagui	«	28-IV	17-V	19
	«	«	«	19-VI	52
3a.	Cão	Sagui	15-V	7-VI	23
4a.	«	Cão	31-V	12-VI	12
	«	«	«	22-VI	22
5a.	«	«	12-VI	23-VI	11
	«	«	«	24-VI	12
6a.	«	«	23-VI	25-VI	—
	«	«	«	«	—

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	—	—

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

S. cruzi no sangue: — Os parasitos se apresentam no sangue circulante muitas vezes sob dois aspectos morfológicos bem caracterizados (Chagas): flagelados delgados e longos, de núcleo alongado e movimentos muito ativos, ou largos, de plasma abundante, núcleo 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 formas finas o elemento masculino (microgameto) e as formas largas o elemento feminino (macrogameto).

Outros autores interpretam diversamente a variabilidade morfológica das formas sanguícolas dos tripanosomas. Breinl e Moore atri-

buem-n'a a estados de crescimento dos parasitos, considerando as fórmulas finas as mais jovens. No caso do *S. cruzi* esta interpretação é aceita por Brumpt, Mayer e Rocha Lima, Magarinos Torres, etc. O fato de aparecerem primeiro as fórmulas finas no sangue periferico dos animais inoculados, e a existencia de fórmulas intermediarias entre os dois tipos extremos de flagelados, constituem os principais fundamentos desta interpretação, aliás já entrevista por Chagas (1909) conforme o assinalou 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 fórmulas finas (fórmulas 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 fórmulas 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 raramente aí se encontram parasitos com sinões 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 fórmulas 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 assinalada 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 flagelo, 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 fórmula

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 transitoriamente pela fórma de critidia, sob a qual ainda se pôdem dividir, transformam-se em tripanosomas jovens que ganham a torrente circulatoria.

Desde os primeiros trabalhos em que se estudaram 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-entotelial. Mais recentemente, Souza Campos tem estudado as alterações de tais 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 animais 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 tambem se acumulam em grande quantidade. Em cães inoculados sob a péle com sangue de animal infectado, encontram-se poucos dias depois da inoculação numerosas celulas do « reticulo-periferico » e clasmátocitos da região injetada cheios de parasitos (fig. 2). Entre as primeiras, chamamos a atenção especialmente para as celulas do reticulo sarcolemico dos musculos do esqueleto, pelo fáto de que algumas vezes os parasitos nelas contidos pôdem 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 celulas e não na musculatura; porém, num cão sacrificado 5 dias depois da inoculação, já vimos parasitos no interior da propria fibra muscular. As celulas do ponto de inoculação mais frequentemente parasitadas são as celulas do tecido conjuntivo frouxo, clasmátocitos e celulas migradoras (fibrocitos?)¹

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

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 celulas 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 celulas do reticulo dos órgãos hemolinfopoiéticos, as celulas do reticulo endotelial, as celulas do reticulo periferico, e os clasmatocitos, fibrocitos e celulas 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 constituída pela musculatura estriada, compreendendo o coração e os musculos do esqueleto. As celulas do testiculo (Gaspar Vianna), a nevroglia 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 autores faz parte do sistema reticulo-histiocitario, e que 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 (fig. 6) 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, fígado, pulmão, ganglio, intestino delgado), apesar de serem numerosos os parasitos no sangue, no coração existem em abundância, incluídas nas fibras musculares e nas células do retículo, havendo intensa miocardite intersticial. No coração também às vezes é difícil julgar si os parasitos estão dentro destas células ou no próprio interior do elemento contrátil.

A preferência de raças isoladas do tatu 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, células neuronais, macrofagos, células perivasculares), as leishmanias eram raras ou ausentes no coração (1932). O acentuado neurotropismo dessas raças traduzia-se clinicamente por vários 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 tatu. Nunca observámos formas de multiplicação no interior de células parenquimatosas (fígado, rim, supra-renal, etc.).

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

— Em outras parasitoses em que o agente etiológico 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, glandula supra-renal, pancreas (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 às 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 virulencia, como vimos, varia a distribuição dos parasitos no organismo, mas sempre se observa sua tendencia a invadir os elementos reticulo-histiocitarios. 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 proposito da afinidade do *S. cruzi* pelo SRE é interessante recordar as experiencias 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 electrico como os coloides eletro-negativos; são justamente os que têm afinidade pelo SRE. Os tripanosomas sanguineos, 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-histiocitarias, tudo leva a crêr tratar-se de um processo ativo por parte do parasito, considerando-se sua grande penetrabilidade atravez 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 « fagocitaria » 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 fenomeno fisico principalmente (vêr R. Freund 1933).

— Conhecidas as afinidades biologicas 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

² Vêr M. Carpano, 1932.

por si mesma que nenhuma ação protetora contra eles exerce o « sistema de defesa fagocitaria ».

No início 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 animais aparentemente restabelecidos 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 específicos, 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 animais 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 técnicas, por meio das quais procura-se conseguir uma relativa paralisação, ou realiza-se uma restrição numerica de seus elementos. No primeiro destes processos empregam-se os 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 animais integros. Tem-se estudado tambem a capacidade de produção de anticorpos em animais 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 animais 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 elas submetidos não poderão ser atribuidas exclusivamente ás modificações sofridas por sistema reticulo-histiocitario.

Esplenectomias.—Alguns autores estudaram a marcha da infecção pelo *S. cruzi* em animais 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. Rontøe (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 periférico de ratos inoculados.

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

Seguem-se algumas de nossas observações:—Camundongo 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.

—Camundongo 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 sanguinea 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 (Pittaluga, Kurotchkin e Chung), cujo agente etiológico é estritamente adaptado ao SRE, dissemos em uma comunicação anterior (1932) que a tripanosomiase americana experimental é um exemplo de bloqueio biológico deste sistema.

De fato, nos animais 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 biológico 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 admissível 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 biológico e coloidal.

Estudando a distribuição dos coloides e dos parasitos nos animais injetados 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 flocculado, aquelas que encerram a ambos constituem raridade. Assim, nos animais 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 celulas infetadas. Entre estas celulas 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 celula observa-se tambem nos animais previamente 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 celulas reticulo-histiocitárias.

Sobre possiveis modificações da evolução da infecção em animais submetidos a bloqueios coloidaes, antes ou depois da inoculação do parasito, nada concluimos 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 infectada (raça de tatú), reinoculado no dia seguinte com sangue de cão bem infectado (11º dia, raça humana), no peritonio (2 cc.) e sob a péle (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 iguais de T. e sôro glicosado a 5 %). Morreu no 11.º dia de infecção (25-IV-32).

Exame dos esfregaços—Baço: numerosas celulas com deposito pardo amarelado, numerosas leishmanias. Foi encontrada uma fórmula parasitaria em divisão multipla, encerrando 5 nucleos e 5 blefaroplastos. Medula ossea—numerosas leishmanias, poucas celulas 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: celulas parasitadas pouco numerosas, algumas encerrando granulos de T. Grande numero de celulas com deposito de T., sob a fórmula de granulos grandes e irregulares, pardacentos ou quasi incolores. Coração: Celulas e fibras musculares parasitadas; raras destas celulas contêm pequeno numero de granulos que por sua coloração e refringencia parecem ser de T. Algumas celulas 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 celulas; ausencia de parasitos. Baço: numerosas celulas cheias de T. Grandes fôcos de leishmanias. Raras celulas 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 sanguicolas. Medula ossea: numerosos parasitos, raras celulas encerrando leishmanias e granulos de T. Sangue: numerosos tripanosomas.

Córtes—(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 células vacuolizadas e granuladas (T). Piroplasmose. Ganglio: células com T., ausência de parasitos. Medula ossea: raras células T., raros parasitos esparsos; algumas células de grandes dimensões e núcleo múltiplo, com numerosíssimas leishmanias.

Córtex: (alcool absoluto, H. E.)—Fígado: grande numero de células com depósito de T. Foi encontrada uma grande célula do SRE encerrando 12 leishmanias e grânulos de T.; foram estes os únicos parasitos achados. Baço: muito numerosas células com T., parasitos ausentes. Ganglios fortemente bloqueados pelo T., sem leishmanias. Pulmão: células 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 também na veia. Em 25-IV tinha tripanosomas no sangue, morrendo em 27.

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

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

Experiências 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 células impregnadas pelo coloide. Algumas células com poucos parasitos contém também Colargol; as muito infectadas não o contém. Degeneração gorda acentuada; focos esparsos de necrose. Baço: numerosas células carregadas de Colargol. Raras células com coloide e parasitos em pequeno numero. Grandes células bem parasitadas encerrando gotículas de gordura. Rim: células dos glomerulos e dos tubulis com grânulos de colargol; raras células parasitadas. Degeneração gorda. Coração: grandes células com numerosos parasitos; células 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. Órgãos fixados em alcool absoluto e formol a 10 %.

Córtex (H. E.)—Fígado: numerosas células parasitadas, raras das quaes encerram alguns grânulos de coloide. Grande numero de células normais fixou o Colargol. Baço: enorme quantidade de células infectadas;

Colargol em menor quantidade que no figado e menos discernivel, 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: numerosissimos 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.

Córtes (H. E.)—Figado: 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 %.

Córtes (H. E.)—Figado: poucas celulas com Colargol em fórmula de grãos amarelos homogeneos (alcool absoluto); poucas celulas parasitadas. 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 experien-

cias precedentes, só raras células encerravam ao mesmo tempo leishmanias e coloide. Neste caso, observámos células parasitadas contendo tinta da China ou Colargol (fig. 5). Os dados exatos sobre esta experiência são os que acabamos de referir; na nossa publicação anterior (1932) houve certos enganos na sua exposição.

IMUNIDADE

O capítulo da imunidade na doença de Chagas oferece largo campo á pesquisa científica. Apesar de possuímos 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 máximo, variável com a virulência do germe e a resistência do organismo, o número de tripanosomas vai decrescendo progressivamente, até que se tornam muito raros ou desaparecem do sangue periférico. A redução numérica dos flagelados na circulação é, segundo Chagas, devida a condições de defeza que se vão criando no organismo; a infecção passa á cronicidade, ficando os parasitos cantonados nos tecidos, de onde esporadicamente saem tripanosomas para o sangue, geralmente em número muito reduzido. Em vários animais evolue a molestia, espontânea ou experimental, do mesmo modo que no homem, tornando-se crônica, sempre conforme a virulência ou a quantidade dos parasitos que se introduziram no organismo e as condições de defeza orgânica; evidentemente, estão excluídas as infecções agudas, que tanto no homem como nos animais podem terminar pela morte durante a fase septicêmica.

Não está esclarecida a natureza dos anticorpos existentes no sôro sanguíneo do homem e dos animais infectados pelo *S. cruzi*; sua existência no sôro pôde ser determinada pela reação de fixação do complemento, específica em presença de antígeno adequado, devida a Guerreira e Machado (1913). Poderosas contribuições demonstrativas do valor desta reação como elemento de diagnóstico são os trabalhos de J. G. Lacorte e E. Villela. Nos nossos animais de experiência,

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 grau de imunidade contra este parasito. O fato de se conseguir isolar o tripanosoma do sangue de casos crônicos 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. Fato 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 eles por varias vezes. 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 metaciclicos. 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 imune tanto ás fórmulas metaciclicas quanto ás fórmulas 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 intraperitonial de con-

teúdo intestinal de ninfa muito infectada (material que também serviu para a cobaia 1), tendo exames negativos de 17-XII-32 a 4-I-33. Examinada a 27-I-33, tinha regular infecção sanguínea; 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 formas 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*, póde ou não determinar o reaparecimento de tripanosomas no sangue; este, nos casos em que se dá, é em geral transitorio. Algumas vezes não se póde dizer si o reaparecimento da infecção sanguínea 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 sanguíneo 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 sanguínea. 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 pódem reaparecer tripanosomas espontaneamente.

A possibilidade de se isolar o *Schizotrypanum* do sangue, e a persistencia da positividade da reação de Machado, de enfermos cronicos 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 depois de mais de 2 anos de hospitalização; em outros doentes (America, Teodora) isolados ha mais ou menos 10 anos, a reação de Machado ainda é positiva.

Segundo M. Torres (1930) o homem com infecção crônica, residente nas zonas infectadas por muito tempo, não é insensível às reinoculações a que está continuamente exposto em condições naturais, sendo devida às reinfecções a evolução progressiva do processo de miocardite. A susceptibilidade a reinfecções seria devida á transitoriedade da imunidade adquirida; a permanencia de fórmulas de multiplicação nos tecidos seria também 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 protege camondongos normais quando inoculado separadamente ou em mistura com fórmulas sanguícolas deste tripanosoma. A injeção de sôro 24 horas antes da inoculação de parasitos também 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 experiencias.

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 fórmulas 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 inseto e benigna no camondongo B, injectado com fórmulas sanguícolas; deste fato 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 1° exame positivo 10 dias após, apresentando uma infecção sanguinea muito ligeira e irregular.

Em uma unica experiencia feita verificámos que o sôro de animal imune depois de ficar em contato 1 hora a 37° com fórmulas B (sanguícolas) e fórmulas U (metacíclicas) de *S. cruzi*, não protege camondongos contra a infecção, quando com elas juntamente inoculado.

B. Borghi (1932) fez experiencias analogas com o *T. lewisi*, confirmando a ação protetora do sôro de ratos imunes e concluindo pela semelhança das propriedades antigenicas das fórmulas B e das fórmulas U deste tripanosoma.

Procurámos uma vez observar a ação de sôro 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 sôro da cobaia 4, em 4-III-33, o desenvolvimento foi muito mais lento nesse tubo que no outro. No 1° dia encontravam-se críditas 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 5º dia havia raros flagelados. Ao fim de 13 dias a parte superior do tubo 2 apresentava-se turva, continuando limpo o tubo 1. até o 17º dia. Mais tarde observa-se macroscopicamente o desenvolvimento da cultura no tubo 1, muito menor do que o tubo testemunho. 5 mezes depois a turvação dos 2 tubos era igual; ao exame microscopico só foram vistos flagelados mortos. Foi verificado, assim, sensível retardamento no desenvolvimento da cultura á qual foi adicionado sôro imune.

Pelos fatos que acabamos de expôr, vemos que a unica propriedade nitidamente demonstrada do sôro 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 tripanosomiase americana, conhecida por reação de Machado). O sôro 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 sôros de animais com outras tripanosomias, não foram ainda observadas no sôro 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 nóta (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 (1927b), verificando o ecleticismo alimentar dos Reduvidos transmissores do *S. cruzi*, sugere a possibilidade de serem os animais de sangue frio hospedadores 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 (1927a).

R. V. Tállice (1929) no Uruguay pesquisou o *Schizotrypanum* no sangue de animaes 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 laboratório 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 péle e intraperitonalmente com sangue de cobaia 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 fórmãs 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 cobaia. O sangue deste reptil teve exames negativos até 24 dias. Foi picado por uma femea de *Triatoma megista* que fizera sua ultima refeição 14 dias antes, e por larvas do mesmo inséto que nunca haviam sugado.

Quanto aos batraquios, quasi todas as nossas observações foram feitas sómente 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 batraquios (*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 improvel que os animais de sangue frio possam ser reservatorios do *S. cruzi* na natureza, embóra 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 endemica, como tambem as condições de relativa imunidade que se estabelecem no organismo infectado, nas 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:

2 ratos foram inoculados em 17-V-33, sob a pele, com sangue de saguí muito infectado (raça de cão, 2ª passagem, morto no 19º dia). Os exames de sangue foram negativos até 16-VI-33. Em ambos os ratos fizemos biópsias, retirando pequeno pedaço de tecido dos pontos de inoculação, 5 e 15 dias depois da injeção; só encontrámos leishmanias nos tecidos retirados no 5º dia.

1 rato adulto foi injetado em 27-V-33 com 5 c.c. de sangue de cão muito infectado (raça de cão, 2ª passagem). Os exames a fresco do seu sangue foram positivos durante os primeiros 5 dias, isto é, até 1-VI-33; do dia 2 em diante foi negativo, até 18-VII-33 (exames quasi diarios). Este rato teve sómente a fase sanguinea inicial da infecção; os tripanosomas que se encontraram no sangue peripherico até o 5º dia foram os inoculados.

2 ratos brancos não se infectaram por deposição de excreções hialinas de barbeiros sobre a pele, como tambem 1 que devorou um triatoma.

Alguns autores tem obtido infecções ás vezes bastante intensas e mesmo mortais em ratos adultos; a maioria entretanto reconhece a pouca sensibilidade dos ratos adultos á infecção pelo *S. cruzi*.

III) — **Schizotrypanum cruzi no organismo do Invertebrado:**

Sumário: — A) — *Triatoma megista*: material e técnica; anatomia do aparelho digestivo. Ciclo evolutivo: considerações gerais; fase estomacal, bacterioides; fase intestinal ou duodenal; fase retal; tubos de Malpighi, glandulas salivares e cavidade geral. Dejeções: caractéres, condições de eliminação, origem; fórmias parasitarias e sua significação. Infectividade das fórmias evolutivas do tubo intestinal.

B) — *Cimex lectularius*: anatomia; evolução, infectividade e transmissibilidade do *Schizotrypanum*.

C) — Transmissão entre Invertebrados: hereditariedade, canibalismo, coprofagia; considerações gerais.

A) — *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 inséto 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 inséto puros que assim se conservam por alimentação em animais normais, sendo estes inséto 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 órgãos internos, especialmente do tubo digestivo e anexos.

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

1) Fixando o inséto 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 solida, 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 lórax, 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, tecido adiposo, órgãos genitais, vaso dorsal, traquéas...); 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 esôfago; 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 póde 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 práctico 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 penetra 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 para 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 fórmulas 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 o 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 para 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

nunca é perfeita, para os tecidos e para os parasitos ao mesmo tempo. Os liquidos de base de sublimado dão resultados inconstantes e poucas vezes satisfatórios.

Após inclusão em parafina os órgãos são cortados em série, geralmente com a espessura de 5 ou 6 micra, e corados pelo métodos de Giemsa e de Heidenhain. A dupla coloração pela hematoxilina-eosina é suficiente para o estudo da anatomia microscopica e a observação da disposição dos flagelados nas diversas porções do aparelho digestivo. Para a inclusão em parafina costumamos usar como liquido intermediario, nos casos em que o estomago está cheio de sangue, a essencia de cravo da India; ao sair do alcool absoluto depois de desidratadas, as peças são levadas a este líquido, onde permanecem dois ou mais dias, passando depois á parafina (o excesso de essencia deve ser retirado das peças por imersão em xilol durante pouco tempo).

Esta técnica foi a unica que nos permitiu obter córtes seriados de estomago de triatomas pouco tempo depois da refeição³. Nos casos comuns o xilol e o cloroformio dão bons resultados. Tentámos algumas vezes fazer córtes de barbeiros inteiros, o que não conseguimos satisfatóriamente; o exoesqueleto dos triatomas oferece grande resistencia á secção depois de submetido á fixação, mesmo o dos inséto fixados poucas horas depois ou durante uma ecdise.

— Dados gerais sobre a anatomia macroscopica e microscopica e sobre as funções das diversas partes do tubo digestivo e órgãos anéxos do *Triatoma megista*.

O canal alimentar dos triatomas, como o de todos os inséto, divide-se em tres porções, no caso nitidamente individualizadas: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior (fig. 7).

O intestino anterior, pre-intestino ou stomodéum, é composto por tres segmentos, o rostro ou probócida, o faringe e o esôfago. «O rostro contem no seu interior duas mandibulas e duas maxílas. O faringe está no interior da cabeça do inséto em seguimento ao canal de sucção, sob a fórmula de um tubo de paredes fortemente quitinizadas» (Cezar Pinto). O esôfago é um tubo curto, de pequeno diametro, que faz continuação ao faringe.

Ao esôfago, ultima porção do stomodéum, segue-se imediatamente o intestino médio, não havendo a interposição de um proventriculo diferenciado.

O stomodéum é revestido internamente por uma lamina quitinosa; é uma invaginação do ectoderma da cabeça. O revestimento quitinoso re-

³ O emprego da essencia de cravo foi-nos aconselhado pelo Snr. A. Lopes, técnico de Anatomia Patológica do Instituto Oswaldo Cruz.

cobre-o em toda sua extensão, não se prolongando além do orifício cardíaco. No barbeiro não existe a formação denominada « Russel » (A. Schneider) pelos autores alemães. No intestino anterior a disposição das camadas musculares é inversa da dos outros compartimentos digestivos: a túnica muscular externa é constituída por fibras circulares e a interna por fibras longitudinais.

As diversas partes componentes do stomodéum são adaptadas á sucção e á condução do sangue ao estomago. Como já indicámos, não ha no intestino anterior órgão destinado a armazenar o alimento (proventriculo).

— O intestino médio, mesênteron, é a porção mais desenvolvida do aparelho digestivo do *Triatoma*. Limitada anteriorminete pelo cárdia e posteriormente pela inserção dos tubos de Malpighi, consta de duas porções muito distintas: a anterior, denominada habitualmente estomago, é uma grande dilatação ampular; a posterior, constituída por um tubo longo e delgado, é a chamada porção tubular ou intestinifórme do mesênteron.

O estomago, também chamado intestino quilífico e impropriamente « proventriculo », é um compartimento destinado a receber e armazenar o sangue ingerido pelo hemíptero; quando repleto, ocupa quasi toda a cavidade abdominal e quando vazio, após prolongado jejum, torna-se alongado e murcho, encerrando bôlhas de gaz. Nelle se passam os fenomenos de digestão.

A porção intestinifórme ou duodeno apresenta-se sempre irregularmente enovelada na cavidade abdominal e cheia de materia escura, produto da digestão hemática. É de diametro irregular, muito variavel segundo o estado de digestão, havendo geralmente na extremidade posterior uma dilatação mais ou menos acentuada pelo acumulo de detritos digestivos. Constitue a zona de absorpção do aparelho digestivo.

Histologicamente o mesênteron é formado pelas duas camadas fundamentais do condúto intestinal, que são epitélío e a pleura. O epitélío é simples, estendendo-se continuamente desde o cárdia ao piloro; constituído por celulas de dimensões variaveis, maiores no duodeno que no estomago, assestadas sobre uma íntima anísta, este epitélío não apresenta planura estriada ou cilios. A camada muscular é formada por fibras que se dispõem em feixes descontínuos, situados externamente no sentido longitudinal e internamente no sentido transversal. Não existe membrana peritífica no barbeiro; o conteúdo intestinal fica em contáto directamente com as paredes do tubo digestivo.

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 Triatomídeos reduzido á empôla retal. 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 féses, e amarela ou branca segundo encerre urina granulosa ou hialina. Nos Hemipteros 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 nela 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 longitudinais praticados em empôlas retais em distenção natural pelas dejeções. Na primeira porção do réto, em contacto com a região pilorica, a empôla retal é revestida por um epitélio alto, de nitida planura estriada; a porção terminal é recoberta por uma superficie quitinosa irregular que faz continuação ao epitélio e se prolonga até o anus.

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

A tunica muscular é bem desenvolvida ao nivel do réto. Sua conformação, analogá do estomago, pôde 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 peristaltismo nos barbeiros abertos, embebidos em agua fisiologica.

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

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

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 das diversas partes do intestino 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 glândulas salivares e os tubos de Malpighi.

As glândulas salivares existem em número 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 principais dados a respeito serão aqui sumariados.

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

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

Os tubos de Malpighi, em número de 4, são longos e delgados e dispõem-se irregularmente enrolados na cavidade abdominal em torno do tubo intestinal, com o qual têm aderências por meio de ramos traqueais. A inserção dos tubos excretores no conduto intestinal marca externamente o limite entre o mesenteron e o proctodéum. 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 orifício pilórico; 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 pilóro, 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 epitelial que deriva dos tubos excretores e que, do lado do réto, é forrada pelas células 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 (Estampa 6 e 8).

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 sincício epitelial 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 aí 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 «metaciclicas» 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 aspétos morfológicos são conhecidos pelos trabalhos de Chagas e Brumpt, será por nós acompanhado em suas linhas gerais.

O desenvolvimento do *S. cruzi* no inséto 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 de evolução permitem devidi-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* ou *duodenal*; finalmente o intestino posterior é séde 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, póde-se dizer que o ciclo deste protozoario 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 pódem 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 estomago 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 critídias que se multiplicam ativamente, geralmente por divisão binária. A fase intestinal é um período de multiplicação e crescimento, caracterizado por individuos critidiomorficos de dimensões muito variadas, geralmente grandes.

No intestino posterior, critídias de tipo menor aderem á superfície 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 inseto, sem que seja necessaria nova refeição infectante.

A quantidade de parasitos no tubo digestivo do inseto 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 circunstancias, encontram-se muitos flagelados imóveis ou com mobilidade muito diminuida.

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

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 inseto. 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 alada, sobre os quais não possuímos a este 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 inseto e o tempo de duração da evolução ciclica 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 adaptação entre o *S. cruzi*, como protozoario de « evolução posterior » e de transmissão por contaminação, e o *T. megista*, como seu hospedador e vectôr 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 variaveis, dando aspétos morfológicos bastantes diversos aos parasitos. Nos primeiros dias após a refeição infectante encontram-se no estomago flagelados dos seguintes tipos: 1) fórmulas sanguícolas não modificadas ou ligeiramente alteradas; 2) tripanosomas em transição para a fórmula de critidia; 3) critidias; 4) fórmulas 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 critídias, que correspondem segundo a expressão de Minchin á fórmula 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 fórmulas sanguícolas com dois nucleos e dois blefaroplastos, alterações estas que parecem traduzir antes um fenomeno degenerativo que uma divisão binaria normal. Estas fórmulas 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 pódem passar dirétamente á fórmula de critidia, ou transformar-se em organismos arredondados, *leishmanias*. Segundo Minchin (1914) o estadio de leishmania, que ocorre por derivação diréta das fórmulas 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 11, 21 dias).

No estomago permanecem durante meses parasitos arredondados, aflagelados, leishmaniformes, ainda depois que o inseto foi alimentado em animais normais depois de um repasto infectante. Estes parasitos podem ficar 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 vae 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 prazo, o aspecto microscopico do conteúdo estomacal póde ser muito diverso, tanto quanto ao estado do sangue ingerido, como quanto ao numero e morfologia dos parasitos. De um modo geral a destruição total das hematias se dá entre 2 e 5 dias após a sucção; casos ha entretanto, e frequentes, em que não se vêem mais hematias 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 flóra 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

de cócus e bacilos na massa em digestão, os quais provavelmente por meio de fermentos resultantes de seu metabolismo exerceram sua acção litica.

—Na região anterior do estomago, proximo ao esôfago, temos algumas vezes encontrado em córtex de *T. megista* adultos, células epiteliâis do revestimento gastrico, sem caractéres especiais, encerrando no seu protoplasma ou em vacuolos elementos esféricos ou baciliformes semelhantes a outros que se encontram na luz do órgão ou aderentes á sua superficie interna. Nos esfregaços de tubo intestinal de barbeiros é muito frequente achar-se células mononucleadas, arredondadas, pequenas ou grandes, ás vezes repletas de bastonêtes longos e delgados.

—No tubo digestivo e em outros órgãos de numerosos inséto tem sido encontrados microorganismos de natureza ainda obscura; tem sido verificados com grande constancia nos hematofagos, especialmente naqueles que durante toda sua evolução exercem exclusivamente o regime alimentar sanguineo. Muitos autores, reconhecendo a grande constancia destes « bacterioides » ou « rickettsias » no condúto digestivo dos inséto e sua transmissão hereditaria em alguns casos, atribuem a esses microorganismos um papel importante na economia dos hospedador, pela sua intervenção nos processos de digestão: por isso são também designados por « simbiontes ». Para Roubaud, nos inséto que têm regimen alimentar exclusivamente hematofago, os bacterioides são mesmo indispensaveis á digestão normal (hematofagia simbiótica)⁴. Como o *T. megista* desde as primeiras idades se alimenta normalmente de sangue, não será de surpreender que futuramente seja comprovada a natureza simbiótica dos germens intracelulares que vimos na região anterior do tubo intestinal deste inséto. Estes germens não tem nenhuma relação com os « micetomas » portadores de bacterias encontrados no *Cimex* (Buchner, 1921), nem com os « cordons valvuleux » (Dufour, 1833), existentes em numerosos Hemipteros não hematofagos e também séde de localizações microbianas; estes « Bakterienorganen » presentes em certos Heteropteros (Kuskop, 1924) não existem no barbeiro.

—No estomago de inséto sacrificados a tempos muito variados depois de sugarem animais infétados, não encontrámos evidencia de fenomenos sexuais entre os tripanosomas, nem aspéto parasitarios que pudessem ser interpretados como resultantes destes fenomenos. As unicas fórmulas de blefaroplasto posterior que encontrámos no intestino médio são as proprias fórmulas sanguicolas, que ficam no estomago sem evoluir, mais

⁴ Vejam-se Roubaud (1919), Buchner (1921), Wigglesworth (1929) . . .

ou menos conservadas, até muitos dias, e no duodeno, durante menos tempo. Em 1927 Chagas descreveu no intestino médio do *T. megista* tripanosomas finos, distintos dos tripanosomas metacíclicos, que seriam responsáveis pela infestação das glandulas salivares.

—No interior de células da parede do intestino médio nunca vimos formas de evolução do *S. cruzi*. O ciclo evolutivo deste parasito passa-se todo na luz do intestino.

Fáse intestinal

Os flagelados que passam para a porção intestiniforme do mesên-teron durante os primeiros dias depois do repasto infetante têm a morfologia de tripanosoma e de critídia, ou são formas intermediarias, em transição (est. 11).

Nesta porção do tubo digestivo os tripanosomas sanguícolas podem ser encontrados até alguns dias depois de ingeridos (5,6), seja por emigrarem tardiamente do estomago, ou seja, menos provavelmente, por já aí se acharem sem evoluir desde as primeiras horas.

24 horas depois da ingestão dos tripanosomas encontram-se no duodeno flagelados já com morfologia de critídia, os quaes são numerosos ao fim de 2 a 3 dias; a este tempo os parasitos estão em franca proliferação.

A fase intestinal é caracterizada por parasitos critídeo-morficos e representa um periodo de multiplicação. Sob o aspecto de critídia, isto é, flagelado de blefaroplasto em forma de bastão situado anteriormente e junto ao nucleo, provido de membrana ondulante e flagelo livre, os parasitos multiplicam-se intensamente por divisão binaria, raramente por divisão multipla, assumindo formas e dimensões muito variadas (estampa 11).

A existencia de flagelados no duodeno parece manter-se por toda a vida do inseto, á custa da multiplicação dos mesmos. Uma vez infectado o inseto, os parasitos persistem nesta parte do intestino mesmo que as refeições subsequentes sejam feitas sobre animais sãos (Chagas).

Na segunda porção do mesên-teron não se encontram tripanosomas metacíclicos; as formas de blefaroplasto posterior só existem aí durante os primeiros dias de infecção, e são tripanosomas sanguícolas persistentes sem alterações degenerativas ou evolutivas.

Durante todo seu ciclo no invertebrado o *S. cruzi* não passa por estágio evolutivo caracterizado por flagelados do tipo *Leptomonas*, embora seja comum encontrar-se, nas descrições ou esquemas representativos do ciclo, referencias á ocorrência normal de tal fase de evolução.

Fase retal

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

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

De um modo geral, os parasitos que se encontram permanentemente no réto dos triatomas infectados desde longo prazo, pertencem a dois tipos morfológicos definidos, a fórmula 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 do órgão, 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, nos insetos com a infecção antiga (estampas 6 — 8).

Conforme referimos em uma publicação anterior (1930), a disposição dos flagelados perpendicularmente ao epitélio retal 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 fórmulas evolutivas do *S. cruzi* até então descritas, entre outras as fórmulas 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 fórmulas parasitarias que julgáramos ser as descritas por Faria e Cruz Filho, não ocupavam de fáto situação intracelular, mas sim formavam aglomerados nos interstícios das dobras da região quitinosa da parede rétal. A confusão que fizemos, atribuindo a estes aglomerados uma situação intracelular, tomando-os portanto pelas fórmulas de Faria e Cruz

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

A estrutura da parede retal só pode ser por nós bem estudada depois que praticámos córtes histológicos em inséto fixados poucos 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 distensão e de retração. As condições são especialmente favoraveis para o exame microscópico dos córtes, tanto para o estudo de sua estrutura histológica, como para o da morfologia e disposição dos parasitos, quando a empôla rétal é fixada e incluída emquanto dilatada pela excreção hialina dos tubos de Malpighi.

Devemos dizer que nunca vimos em nenhuma porção do tubo digestivo do *T. megista* fórmas evolutivas do *S. cruzi* a que presentemente possamos atribuir 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 epitélio estriado do intestino posterior.

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

—As fórmas parasitarias aderentes ás paredes do intestino posterior de inséto portadores de certos flagelados, durante a fase terminal de seu desenvolvimento, correspondem aos «estádios 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 critidiomórficos livres no conteúdo rétal (*Trypanosoma lewisi*). Empregando estas designações podemos dizer que na fase retal estabelecida do ciclo evolutivo do *S. cruzi* no *T. megista*, os flagelados se apresentam sob o aspecto de tres tipos morfológicos fundamentais, que são: 1) haptomonas, 2) nectomonas, 3) tripanosoma.

A infecção retal inicia-se com as fórmas de critídia vindas do intestino médio, o que se dá nas larvas novas por volta do 5.º dia depois da ingestão dos tripanosomas sanguícolas.

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

(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 metaciclicos» (Brumpt), formas terminais do ciclo no Invertebrado.

As transformações evolutivas succedem-se no réto no sentido nectomas—haptomonas—tripanosoma, normalmente. Não sabemos porém si certas nectomonas pódem se transformar dirétamente em tripanosomas, o que nos parece 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 suscetiveis de regressão ao tipo de flagelado que as precede.

Segundo Brumpt os metaciclicos 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.

Não observámos a existencia de verdadeiros quistos durante o desenvolvimento do *S. cruzi* no inséto.

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 locilisação 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 (estampa 9).

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

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 hipotese de fórmas parasitarias do *S. cruzi* passarem á cavidade geral pelos tubos excretores e daí as glandulas salivares.

—Glandulas salivares e cavidade geral:

Nas glandulas salivares do *T. megista* (glandulas principais) foram

encontradas 3 vezes por Chagas (1909) fôrmas parasitarias de blefaro-plasto posterior as quais representam para este pesquisador as verdadeiras formas infectantes do ciclo do Invertebrado. Barros Barreto (citado por Marques da Cunha, 1923) achou tambem parasitos nas glandulas salivares. A passagem dos flagelados pela cavidade geral segundo Chagas é muito transitoria, tendo sido por ele aí surpreendidos sómente duas vezes, em triatomas achados com infecção natural.

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

Como veremos adiante, as fôrmas sanguícolas do *S. cruzi* evoluem artificialmente na cavidade geral do barbeiro até a formação de tripanosomas metaciclicos; tambem 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 aspétos 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 caratéres, sendo tambem 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 acu-

mulam no réto são eliminadas ao mesmo tempo, com o aspéto de um liquido mais ou menos denso, enegrecido e rico em cristais. A urina amarelada (granulosa) póde ser tambem eliminada sem ser de mistura com féses.

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 póde 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, injetámos na cavidade geral de barbeiros adultos, pouco tempo depois de picarem, indicadores corados, para comprovarmos a origem malpighiana 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 retal se apresenta fortemente dilatada pelas dejeções, que se renovam mais ou menos rapidamente após cada expulsão. Nestas condições póde-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 provêm de inséto infectados, contem quasi sempre flagelados em grande numero.

As unicas referencias que conhecemos 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 póde 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 fórmias metaciclicas. Em geral as critídias aí são raras, ás vezes mesmo ausentes; em certas ocasiões porém pódem ser numerosas, isoladas, formando pequenos grupos ou em aglomerados compactos.

Os parasitos provêm da empôla retal dos insétos, 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 malpigiiana limpida, pouco depois da sucção, e examinando-se ao microscopio evitando-se sua rutúra, póde-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 póde 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 mm^3 .; 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 fórmias de blefaroplasto posterior.

As fórmias 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 tem uma porção livre pequena; o

protoplasma, geralmente homogêneo, apresenta às vezes pequenas granações que não sabemos si são devidas a artifício de técnica.

Nas preparações de dejeções examinadas a fresco ou após coloração, nunca vimos formas metacíclicas como sinais de divisão; em *frottis* de réto encontrámos uma vez um parasito tripanifórme provido de 2 nucleos e 2 blefaroplastos, que poderia ser interpretado como resultante da evolução rápida de critídia em divisão não terminada. Acreditamos que uma vez atingida a forma de tripanosoma os parasitos não sejam mais capazes de se multiplicar. (Brumpt).

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

Nas preparações coradas pelo Giemsa após fixação pelo álcool absoluto os tripanosomas mostram-se frequentemente deformados ou completamente dilacerados. Mesmo nos preparações previamente 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 álcool absoluto, os parasitos sofrem alterações, perdendo seus detalhes morfológicos.

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 completa.

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

—A eliminção de grande numero de formas de evolução do *S. cruzi*, tripanosomas metacíclicos em grande concentração e às 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 verificação das propriedades biológicas das formas metacíclicas, principalmente penetrabilidade, pela obtenção de infecções experimentais por meio de tais formas através tegumentos integros de animais, demonstram a realidade do método contaminativo da transmissão desta tripanosomiase.

Infectividade das formas evolutivas do *S. cruzi* no inseto.

Em varias especies de tripanosomas que têm uma evolução cíclica 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 formas propagativas finais.

Esta « incubação » mostra que os insetos vectores de certas tripanosomiasas não são simples portadores do germen, mas verdadeiros hospeda-dores intermediarios nos quaes os parasitos evoluem, tornando-se novamente 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 infectar ratos, por inoculação ou por ingestão do inseto, para só a recuperar quando no intestino posterior tenham aparecido as formas terminais do ciclo evolutivo, os tripanosomas metacíclicos. 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 formas finais, unicas infectantes, aparecem ao fim de um prazo minimo de 5 dias no réto do inseto (Minchin e Thomson, 1915).

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

Para verificar o poder infectante das formas de evolução do *S. cruzi* no intestino do inseto, 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 infectados, 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 infecção obtida por inoculação de dejeções hialinas com numerosos tripanosomas). A diversos prazos depois da refeição infectante fizemos a dissecação de barbeiros deste lote, inoculando em cobaia, separadamente, as duas por-

ções do mesenteron (isoladas de modo a evitar a rutura do reto). As inoculações 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 intestiforme), 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 7.º dia de infecção, dissecavamos uma larva e injetavámos o tubo digestivo macerado em agua fisiologica em uma cobaia, por via sub-cutanea.

As cobaias inoculadas com larvas no 1.º, 4.º, 5.º e 7.º 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).

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.

Pelos resultados destas experiencias vimos que os inséto dissecados desde poucas horas após a sucção de animal infectado, até 8 dias, injetados em animais sensíveis, são capazes de determinar a infecção. Portanto, durante toda a evolução do *S. cruzi* no *T. megista*, ha fórmias 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).

No que diz respeito á infectividade para o vertebrado de estádios evolutivos dos flagelados nos inséto, que precedem as fórmias 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 fórmias metacíclicas do *S. cruzi* ?

Os resultados das experiencias que referimos poderiam ser interpretados como demonstrativos de que este parasito, em todas as fáses 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 fórmias 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 fórmias 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 fórmias do sangue do Vertebrado; a presença destas fórmias 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 triatomas, que é devida nos primeiros dias aos tripanosomas não evoluidos, e mais tarde aos tripanosomas metacíclicos.

Como já foi dito anteriormente, na porção tubular do mesenteron encontram-se fórmias de blefaroplasto posterior sómente nos primeiros dias de infecção; depois, os unicos flagelados aí existentes tem a morfologia de critidia, fáse 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 fases de sua evolução, inoculando separadamente em animais as duas porções do mesenteron e verificando o resultado destas inoculações:

4)—Foi inoculado subcutaneamente um camundongo com macerado da porção intestiniiforme 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 encontramos numerosas critídias, e fórmias sanguícolas mais ou menos conservadas. O camundongo 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 fórmias infectantes no intestino médio (duodeno, porção tubular) até o 5º dia de infecção.⁶

5)—2 camundongos foram inoculados com material de larva de *T. megista* que 19 dias antes havia sugado um cão infectado (raça de cão). O camundongo A foi injectado com o estomago e o B com o duodeno (retirados sem haver ruptura do réto e diluidos em agua fisiologica). Na lamina preservada do E (estomago) havia tripanosomas pouco alterados e fórmias arredondadas; na do EI (duodeno) só vimos critídias, 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 camundongo inoculado com estomago infectou-se rapidamente; o inoculado com EI (critídias) não se infectou, adquirindo uma infecção mortal quando injectado com fórmias sanguícolas 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 intestiniiforme (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 camundon-

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

gos 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 camondongo 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 critídias (larva, 19º dia) não teve infecção sanguinea 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 atribuida 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 11 representam tripanosomas encontrados no estomago de uma larva 21 dias após a refeição contaminante.

Fizemos novas inoculações parciais de intestino médio de inséto, 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. 60 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 fisiologico; 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 preservada). 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 excretorios, 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 logar, em seguida o duodeno, ficando o réto no seu logar, intácto.

Segue-se o resultado dos exames das laminas preservadas das larvas inoculadas, segundo o numero dos camondongos que figuram no quadro 9:

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

QUADRO 8 ⁷

Camundongos adultos inoculados por via intraperitoneal em 19-IX-33:

Fase do Triatoma e numero	Refeição infectante	Refeição normal	Dias de infecção	Orgão inocu.	Camundongo no.	IX - 1933						X						XI						Incubação verificada (dias)				
						20	23	26	28	29	30	2	4	5	6	7	9	10	5	6	8	9	10		11	13	14	
1 Larva	11 - IX	—	8	E	1	.	†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
				EI	2	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 Larvas	8 - VII	31 - VIII	73	E	3	.	.	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	.	+	13
				EI	4	†	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 Larvas	18 - VIII	31 - VIII	32	E	5	.	.	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	.	+	†	17	
				EI	6	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 adulto	31 - VII	25 - VIII	50	E	7	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48
				EI	8	.	.	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	.	—

E — Estomago.

EI — Estomago intestiniforme.

⁷ Entre 10 - X e 5 - XI - 33 os camundongos n. 2, 6 e 7 tiveram 22 exames de sangue negativos.

O material do adulto (inoculado nos camondongos nº 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 vazio, 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 nº :

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 (nº 5).

Os camondongos nº 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 nº 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 excretores.

Para a devida averiguação de certos pontos obscuros deixados por estas experiencias e confirmação de seus resultados, fizemos nova série de inoculações parciais em circumstancias 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 fórmulas 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 parasi-

tos são nos primeiros dias fôrmas sanguícolas e mais tarde fôrmas arredondadas (leishmanias) delas diretamente derivadas.

c)—No duodeno (estomago intestiniforme) as fôrmas responsáveis pela positividade das inoculações desta região durante os primeiros dias (5) são provavelmente tripanosomas sanguícolas não evoluidos, 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 infectante nos primeiros dias, antes que se formem os tripanosomas metacíclicos (6-7 dias nas larvas, 10-15 nos adultos). Estabelecida a fáse retal 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. Estas 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 existirem fôrmas infectantes do parasito, que

são o estomago 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 facto de que poderão passar fisiologicamente a esta região formas parasitarias virulentas presentes no conteúdo estomacal. Assim pois, as infecções obtidas por inoculação do duodeno, não poderão ser desde logo atribuidas aos organismos criticidomórficos do *S. cruzi*, tendo-se em mente os factos que acabamos de citar; os resultados demonstrativos nestas experiencias de inoculação parcial são os negativos, no caso do duodeno, pela verificação de que póde-se inocular grande quantidade de criticídias sem se conseguir a infecção. No caso do estomago 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 forma de criticídia no *S. cruzi* no barbeiro como não infectante; Chagas (1909), considerando-a estágio terminal do ciclo assexuado, já afirmara este facto. Brumpt (1922) também é da mesma opinião, assegurando embora que « as criticídias, chegadas a um certo estágio de evolução, são infectantes » (Blanchard, 1912). Conforme outros autores indicaram, experiencias decisivas sobre a infectividade de formas 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 entretanto que conclusões definitivas poderão ser baseadas também em experiencias de inoculações parciais de tubo intestinal, feitas em determinadas condições, de acordo com os factos que acabamos de expôr.

— Posteriormente á publicação destes primeiros resultados e ás considerações que precedem fizemos uma nova série de experiencias semelhantes, cujos dados estão esquematizados no quadro 9 da pag. 64.

Por este quadro vemos que todas as inoculações de duodeno (estomano intestiniforme) de barbeiros infectados foram negativas, embora fosse verificada no material injetado a presença de parasitos sob a forma de criticídia, ás vezes em grande numero. As inoculações de estomago de larvas 121 e 59 dias depois de uma refeição infectante foram também negativas, assim como a do estomago e do intestino anterior de um triatoma adulto portador de infecção antiga e de refeição infectante indeterminada.

QUADRO 9

Inoculações parciais de tubo digestivo de *T. megista* em camundongos brancos adultos, por via intraperitoneal, feitas em 9 de Novembro de 1933:

Triatomas	Refeições infectantes	Refeições normais	Dias de infecção	Orgãos inoculados	Camundongo no.	Resultados e observações dos animais injetados
Adulto com infecção antiga	?	13 - X - 33	?	IA	1	36 exames de sangue negativos, de 20 - XI - 33 a 25 - I - 34
		30 - X - 33		E	2	idem
		(em cobaia imune)		EI	3	idem
		(?)		IP	4	exame positivo de exsudato peritoneal em 15 - XI - 33 « « « sangue em 18 - XI - 33
Larva nova	11 - IX - 33	21 - XI - 33	59	E	5	36 exames de sangue negativos, de 20 - XI - 33 a 25 - I - 34
				EI	6	idem
Larva nova	8 - VIII - 33	31 - VIII - 33	93	E	7	morreu em 11 - XI - 33
		27 - X - 33		EI	8	36 exames negativos, até 25 - I - 34
2 Larvas novas	11 - VII - 33	31 - VIII - 33	121	2E	9	idem
		27 - X - 33		2EI	10	idem
2 Larvas novas	11 - IX - 32	21 - X - 33	59	2E	11	morreu em 14 - XI - 33
				2EI	12	36 exames negativos, até 25 - I - 34

IA—intestino anterior; E—estomago; EI—duodeno; IP—intestino posterior.

O unico resultado positivo foi obtido com o camondongo n.º 4, pela inoculação do intestino posterior do mesmo triatoma adulto.

Segundo o numero de ordem dos camondongos inoculados nesta experiencia, o resultado do exame microscópico das laminas preservadas dos órgãos injetados, no que respeita á existencia de fórmulas evolutivas do *S. cruzi* foi o seguinte:

N.º 1 — negativo; 2 — raras leishmanias irregulares; 3 — numerosas critídias; 4 — numerosos tripanosomas metacíclicos e critídias; 5 — só foi vista 1 leishmania de protoplasma granuloso, aparentemente sem blefaroplasto; 6 — critídias; 7 — negativo; 8 — critídias; 9 — negativo; 10 — critídias; 11 — negativo; 12 — critídias.

— Ponto importante a ser mais investigado é o referente ao resultado das inoculações de intestino anterior de triatomas infectados, para a indagação da possibilidade da existencia de fórmulas infectantes nesta porção.

Os fatos mais importantes verificados pelas experiencias de inoculações parciais de tubo intestinal de barbeiros parasitados pelo *S. cruzi*, são a permanencia de fórmulas infectantes no estomago por muitos dias, e a demonstração de que este flagelado durante a sua fase de critídia não é suscetivel de se desenvolver no organismo do Vertebrado.

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 bouefi* 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* evolui 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 diferentes, o estomago, ampular, e o duodeno, tubular, alongado. O intestino posterior é reduzido á empôla retal, 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

⁸ Ver Patton e Evans, 1929.

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 encontramos 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, succedendo-se as fâses estomacal, intestinal e a retal com os aspétos morfologicos que lhes são peculiares.

No estomago as fórmias sanguicolas sofrem as primeiras fâses da transição para critídia ou transformam-se em organismos arredondados, providos ou não de flagelo. Fórmias 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 critídia, tripanosomas e critídias completamente formadas. Nesta região dominam parasitos critidiomórficos de diversos tipos, que se multiplicam intensamente.

As primeiras fórmias 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 metaciclicos.

Nas nossas experiencias nunca observámos grande acúmulo de fórmias metaciclicas 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 insétos 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.

⁹ A quem muito agradecemos o obsequio.

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 água fisiológica e o conteúdo do tubo digestivo inoculado no peritônio de cobaias sãs, do 3.º ao 8.º dia de infecção. As inoculações feitas depois de comprovada a existência de flagelados, tiveram resultados positivos (6.º e 7.º dia de infecção, período 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 (camundongos 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 injeção o autor verificava a presença de parasitos no material, observando em 3 percevejos inoculados com resultado positivo a existência de fórmulas semelhantes ás « blood-forms » que não eram senão tripanosomas metacíclicos. As incubações médias foram de 22 dias para camundongos e 25 dias para cobaias. O autor não pode chegar a conclusão quanto ás formas responsáveis pela infecção.

Mayer 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 garantida pelo exame de esfregaços.

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

—Como acabamos 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 atribuidos 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 eliminacão de fórmulas metacíclicas no liquido limpido eliminado pelo inseto 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 encontramos 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 insetos em experiencia a infecção se estabeleceu; não observou modificações nas fórmulas metacíclicas ingeridas, atribuindo o desenvolvimento a critídias existentes nas dejeções, que teriam passado desapercibidas.

—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 intestinal através o exoesqueleto (canibalismo), ou indirétamente, pela ingestão de dejeções (coprofagia).

Desde suas primeiras pesquisas Chagas verificou que larvas de *T. megista* nacidas 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 verificou 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 nóvas 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 naceram de óvos 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 óvos postos por *T. megista* infectados foram inoculados após maceração no peritonio de uma cobaia, depois de ter sido feito o exame a fresco do 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 fórmulas jovens de *T. megista* nacidas no laboratorio e de 30 óvos 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 fase larvaria, com muito maior frequencia neste Hemiptero que naquele. Segundo Torres este meio de alimentação é absolutamente excepcional em condições naturais e não póde 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 fórmulas 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 fases de sua evolução, justamente naquelas em que unicamente se tem observado o canibalismo.

Em diversas experiencias que fez no laboratório Torres não conseguiu a transmissão do *Schizotrypanum* de inséto a inséto por este meio. Excetuadas as circunstancias em que as larvas exercem um hematofagismo 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 áto canibal em ninfas do mesmo inséto, 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 inséto a outro por intermedio das dejeções foi primeiramente entrevista por Lutz (citado por Chagas, 1909); aquele autor tambem não observou o coprofagismo.

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

A demonstração experimental de que flagelados do intestino do inséto 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 inséto da mesma especie alimentados sobre animal infectado pelo *S. cruzi*.

Este autor não observou em percevejo sacrificado pouco tempo depois de ingerir os flagelados das dejeções (20 horas) alterações morfológicas nos tripanosomas metacíclicos que indicassem sua regressão ao tipo critidia, admitindo que os parasitos desta categoria existentes nas de-

jeções 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 de jeções hialinas de *T. megista* ricas em fórmulas 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 pelo hemiptero através péle fresca de camondongo. No estomago e no duodeno do inséto sacrificado 4 dias depois encontrámos raros tripanosomas metacíclicos não alterados; no intestino posterior havia numerosos flagelados, certamente devido a infecção antiga.

—Quaes as fórmulas 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 critídias, 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 possivel, do parasito entre os Invertebrados.

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

Estas fórmulas, como em geral é admitido, 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 tambem as experiencias de Brumpt, com percevejos, tendem a demonstrar. As fórmulas 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, propios de Invertebrados, monogenéticos, ha pois esta diferenca fundamental concernente ás fórmulas terminais do ciclo evolutivo, que nestes são quistos pelos quais se propagam os flagelados, e naqueles são fórmulas metacíclicas adaptadas exclusivamente a infectar o Vertebrado. Não se poderá dizer com Brumpt

(1913) que «os metacíclicos ficam numa *phase d'attente* comparavel ás fórmulas enquistadas dos flagelados de inséto, eliminadas pelas fézes» ... e muito menos que «este fáto demonstra que a doença do Vertebrado é um fenomeno accidental e estes tripanosomas são ainda mal adaptados». A doença do Vertebrado, ou melhor seu parasitismo, constitue fenomeno indispensavel á sobrevida das fórmulas metacíclicas do transmissôr, que são lançadas com as dejeções no mundo exterior e inaptas á evoluçáo em outro inséto; no caso do *S. cruzi* a transmissibilidade por contaminação encontra condições o quanto possivel favoraveis que são, principalmente, como vimos, a eliminaçáo de grande numero de fórmulas infectantes nas ocasiões em que o inséto procura o Vertebrado e o grande poder de penetraçáo 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 tambem é um acidente, sendo o homem «um hospedador tão favoravel quão accidental» (Brumpt).

A existencia de fórmulas de leishmania no ciclo do *S. cruzi*, quér pela fáse de evoluçáo em que aparecem, quér pela propriedade infectante de que gósam, não póde servir de argumento a favor do próximo parentesco entre este parasito e os flagelados dos generos *Critidia* e *Leptomonas* (*Herpetomonas*).

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

Considerando-se a funçáo dos quistos e a dos metacíclicos, portanto tambem 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 infecçáo se transmite exclusivamente ao Vertebrado (metacíclicos).

Deixaremos assinalado que os fatos da incapacidade dos metacíclicos eliminados com as dejeções serem incapazes de manter a infecçáo entre os invertebrados, no caso dos Tripanosomidas de evoluçáo posterior, e a não transmissáo entre os invertebrados dos Tripanosomidas que evoluem na porçáo anterior, são fatos que poderão ser com mais facilidade interpretados si o Vertebrado fôr considerado o hospedador primitivo destes flagelados (*theoria* de Minchin); tanto mais que considera-se a evoluçáo posterior mais primitiva e a evoluçáo anterior mais incompleta ou mais recente em relaçáo 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 biológicas o *S. cruzi* é um parasito digenético bem adaptado a ambos os hospedadores.

IV) — Transmissão do *S. cruzi* do Invertebrado ao Vertebrado:

Sumário: Transmissão por inoculação, por picada e pelas dejeções. Penetrabilidade das fórmulas sanguícolas e metacíclicas. Considerações gerais.

— 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 limpidas 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 infectividade das critídias.

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; sómente agora, depois dos trabalhos de Kofoid e Donat (1933) entrevê-se a

probabilidade de serem ratos do mato (*Neotoma fuscipes*) hospedadores naturais 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 fórmias 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 logar 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 inséto 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 cobaia sugada por 7 barbeiros adultos, na qual encontrou fórmias 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 fórmias parasitarias.

Além das experiencias de Chagas e de Torres 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 ilésas foram obtidos por Mayer e Rocha Lima, Neiva, Torres etc., recentemente por nos mesmo (1932) e Kofoid e Donat (1933). A penetrabilidade de fórmulas infectantes do *S. cruzi* através a pele intacta de camondongos 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: obteve 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 infectados desde muito mais tempo.

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 insetos 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 hematofágos 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 nº 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 servíra para a cobaia n.º 6.

—O exame a fresco do sangue da cobaia n.º 7 foi feito diariamente, antes de começarmos a examinar o sangue das outras (o que deveríamos 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 a 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, quér dizer, no mesmo dia 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 ocular e para 3 cobaias adultas através a pele normal.

Os resultados das observações e experiencias 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 celôma, 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 contrôle positivo, procurámos infecta-la através a péle 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 puzemos liquido hialino infectado sobre a péle, continuando os exames negativos até 12-X-32. Em 13-X-32 tentámos novamente a infecção através a péle 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 péle 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 péle (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 infectada pelo *S. cruzi*, tendo tido 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 péle; 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 péle, 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. 32).

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

Cobaia n.º 6 — Infectada pela péle, ex. pos. 29-VII-32 (liquido na péle 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): exames neg. até 4-I-33 (10 exames). Em 27-I-33 estava bastante infectada; morreu em 6-II-33 (V. pag. 32).

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

a) — 2 cobaias sugadas por varios T. (5 ou 6) em 9-VI-33 e 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 microscopico 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 (I-934) 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 tinha tripanosomas no sangue em 29-VI-33.

e) — Cobaia na qual foram alimentados 4 T. em 3-VII-33, morreu em 12-X-33. Sangue sempre negativo: coração livre de leishmanias.

f) — 8 barbeiros sugaram 1 cobaia em 25-VIII-33. Exames negativos quasi diários até 30-XII-33. Em 2-I-34 foi picada por mais 14, continuando com exames negativos ate 25-I-34.

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

” ” ” 4 ” ” 23-V-33

” ” ” 2 ” ” 2-VI-33

Estas cobaias ainda vivem, não infectadas.

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 metaciclicos 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 gôtas 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 inséto (metaciclicas) do que as do sangue. No caso do *T. lewisi* as formas metaciclicas penetram pelas mucosas facilmente, ao passo que as formas sanguicolas não o fazem (ver B. Borghi, 1932); No caso do *Schizotrypanum*, os tripanosomas têm maior poder de penetração; as formas sanguicolas 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 a pele normal de camundongos recém-nascidos (Brumpt) e de cobaias e camundongos adultos (Dias). A passagem das formas sanguícolas do *S. cruzi* através a pele 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 a vida parasitaria. É provável que estas formas sejam exclusivamente adaptadas a 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 críidia.

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 do modo de transmissão inicial do *Schizotrypanum*, porquanto são formas não evoluídas, infectantes, derivadas diretamente das formas sanguícolas ingeridas; a transmissão primitiva seria mecanica, ou acíclica, e teria passado, pela adaptação progressiva do flagelado ao Invertebrado, a evolução na porção posterior e ao metodo 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 estrícta, existindo gradações entre um e outro tipo de evolução no transmissor¹⁰. O *S. cruzi* seria um flagelado que, atualmente bem adaptado a trans-

¹⁰ Ver Adler, 1933 e Hoare & Coutelen, 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.

Em resumo, os resultados de todas as nossas experiencias sobre a transmissão do *S. cruzi*, de seu vectôr natural ao animal de laboratório, pela picada e por meio das dejeções, são os seguintes:

Nas tentativas de transmissão por picada, fizemos 104 *T. megista* infectados, na fase adulta quasi todos, sugarem 14 cobaias, sem termos em nenhum caso observado a infecção do animal.

Pela deposição de dejeções limpadas de barbeiros infectados, sobre a pele intacta, obtivemos a infecção em 4 cobaias e 5 camondongos adultos, com 2 resultados negativos em cobaia e 1 em camondongo. Em 12 experiencias tivemos portanto 9 resultados positivos. A infecção através a mucosa ocular foi conseguida em 3 cobaias e pela mucosa digestiva em 1 camondongo, não havendo experiencias negativas.

V) — **Cultura in vitro e na cavidade geral do *T. megista*.**

Sumário: Cultura — aparecimento das fórmulas metacíclicas, infectividade; inoculações em camondongos e infecção peritonial; isolamento do parasito do inseto. Cavidade geral: inoculação de fórmulas do sangue; inoculação de fórmulas do inseto. Conclusões.

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 fórmulas 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 assinalámos 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 circumstancia, com-

preende-se, dificultará sem duvida a próva de que os metacíclicos possam se formar muito precocemente (5 dias).

Outro fáto que tambem observámos 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 sináis 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 fórmias de blefaroplasto posterior durante alguns dias, durante o tempo bastante para que as fórmias metacíclicas comecem a aparecer), quasi poder-se-ia garantir que as inoculações são positivas desde as primeiras horas até muitos dias. Aqui tambem a infectividade seria a princípio devida ás fórmias sanguícolas não evoluidas e depois aos metacíclicos.

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

A respeito da questão da infectividade das fáses evolutivas das culturas as opiniões são divergentes. Segundo Torres (1922) todas as fórmias de evolução seriam infectantes para o Vertebrado, baseado em que inoculações de culturas recentemente semeadas transmitem a infecção quando inoculadas. Entretanto H. Galliard (1929) contra esta demonstração argumentou que o aparecimento precóce 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 provavel) impede a interpretação dos resultados das inoculações, que com certeza serão positivos.

Segundo W. Nöller (1920), nas culturas de tripanosomas, só as fórmias metacíclicas são infectantes. Além destas, a nosso ver, temos que considerar fórmias 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 tambem 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 injetados 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) inoculámos em 13-V-33 tres camondongos 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 camondongo, 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 provavel, houve tróca de animais.

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

Inoculando culturas recentes e virulentas em camondongos 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 aparecimento de tripanosomas no sangue precedeu o do peritoneo, nos animais injetados sob a péle.

Inoculações feitas em 24-VIII-33:

QUADRO 10

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).

Os camondongos foram inoculados com cultura de *S. cruzi*, raça de tatú, meio de Noguchi, 17 dias depois de semeada (sangue de cão infectado).

Nos frottis do material injetado foram encontrados poucos metacíclicos.

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 injetado no peritonio ainda vive, já com exame negativo do sangue (28-XI-33).

—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 pódem ser achados no peritoneo e serem inaparentes no sangue.

—Por duas vezes tentámos isolar o *S. cruzi* dirétamente 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 fórmias 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 fórmias 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 bôas condições deve-se separar o inséto depois de se alimentar em placa esterilizada, esperando-se que elimine 1 ou mais vezes excreções limpidas para depois fazerem-se com elas as sementeiras.

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

Parece que á fórmula 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 fórmulas sanguícolas e depois com fórmulas 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 possível livre de outros elementos, fazíamos a centrifugação do sôro, após a coagulação do sangue do cão colhido por punção cardíaca. Pequena quantidade de liquido era então injetada na hemocèle 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 aneis 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 possíveis de assepsia: algumas vezes tem-nos ocorrido o fáto de morrerem insétos 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 morfológicas 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 célula e parecem não se multiplicar, apresentando-se com aspecto normal ou um pouco alterado.

Em todas as nossas experiências o líquido celômico 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 líquido não brotasse espontaneamente como em geral se observa. Nunca encontramos em mistura com a linfa assim colhida vestígios de conteúdo intestinal.

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

Por esta experiência foi visto que a fórmula sanguícola do *S. cruzi* é capaz de se desenvolver quando introduzida 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 ilustrações 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 cobaia normal, tendo eliminado dejeções infectadas. O triatoma 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 esfregaços (ácido ósmico, álcool absoluto; Giemsa): Em 2 preparados de hemolinfa só encontramos 1 critidia livre, atípica. Vaso dorsal: fórmulas arredondadas parecendo alteradas. Ovario: 1 célula com 2 leishmanias em degeneração; 1 leishmania livre; várias critidias perfeitas ou em transição para metacíclico, algumas mais ou menos alteradas; metacíclicos muito finos; critidias e leishmanias parecendo em degeneração avançada; algumas células com parasitos apenas reconhecíveis.

Na lamina obtida esfregando a face interna da folha dorsal do abdomen encontramos uma célula com 4 parasitos, entre os quais uma fórmula parecendo em transição para metacíclico; célula com fórmulas monstruosas arredondadas; metacíclico muito delgado.

Frottis da lamina ventral do abdomen: acham-se com facilidade metacíclicos finos bem corados, critídias delgadas e fórmulas intermediárias.

As glandulas 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 experiencia que os tripanosomas sanguícolas inoculados na cavidade geral do *T. megista* evoluem até á fórmula metacíclica final. Flagelados deste tipo permanecem vivos até 15 dias depois da inoculação, ao lado de critídias e outras fórmulas. 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 analogo 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 necessario o mesmo prazo para a formação dos primeiros tripanosomas metacíclicos (7-9 dias).

A hemolinfa do *T. megista* não é nociva á fórmula sanguícola do *S. cruzi*, permitindo sua sobrevivencia e evolução quando introduzida na cavidade geral. Os fenomenos 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 insetos 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 orgãos (ovarios, vaso dorsal, tecido adiposo) encontram-se tripanosomas, critídias de fórmulas variadas e tipos de transição. Predominam os tripanosomas metacíclicos, que são de diversas dimensões. Critídias em divisão. Aglomerados parasitarios em que os metacíclicos são mais numerosos que as critídias; num deles os parasitos formavam uma rosácea, dispondo-se com os flagelos voltados para a periferia. Encontrámos fórmulas de divisão interessantes, parecendo mistas de critídia e metacíclico; este fáto indicaria a possibilidade da transforma-

ção em metacíclico durante o processo de divisão de críídias. Em uma destas fórmulas o corpo era unico, provido de 1 flagelo, e em outra as duas extremidades eram flageladas:

— Não encontrámos parasitos intracelulares, leishmanias, nem fórmulas metacíclicas típicas em divisão. Póder-se-á supôr que as críídias existentes no liquido inoculado tenham se multiplicado e se transformado em metacíclicos; muitas destas fórmulas inicialmente inoculadas teriam permanecido vivas. Possivelmente os ovarios são orgãos de predileção dos parasitos inoculados na cavidade geral, pela maior quantidade 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 orgãos. 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 horas depois, tinha alguns flagelados na linfa, examinada a fresco. *Frottis*: linfa: tripanosomas não alterados (contámos 35 em 3 laminas) e nenhuma críídica, (numa lamina preservada do liquido inoculado contámos, em 300 flagelados, 5 críídias e 295 metacíclicos, portanto 98,3 % de metacíclicos). 2 metacíclicos estavam unidos a celulas mononucleadas por uma das extremidades (inicio de fagocitose?); não havia fórmulas intracelulares nem leishmanias livres. Ovarios: só achámos 1 metacíclico, extracelular. Glandulas salivares, tecido adiposo, vaso dorsal, negativos.

O barbeiro sobrevivente foi sacrificado depois de 48 horas. A fresco, linfa e glandula salivares negativas. *Frottis*: linfa: foram vistos 6 metacíclicos, quasi todos bastante alterados mas sem sinál de divisão ou regressão evolutiva; tripanosomas presos a celulas mononucleadas pequenas. Raras críídias livres vacuolizadas, uma das quais presa a um leucocito. Fórmulas de classificação incerta, de blefaroplasto arredondado imediatamente atrás ou ao lado do nucleo, fórmulas de transição cujo sentido de transformação não se póde garantir mas que parecem ser originadas de críídias. Glandulas salivares, ovarios, vaso dorsal e tecido adiposo, negativos.

6)—4 *T. megista* adultos, 3 femeas e 1 macho, inoculados em 11-I-33.

Após 48 horas foram dissecados o macho e 1 fêmea, nos quais o exame da hemolinfa e dos ovários desta foram negativos. Os outros dois alimentaram-se muito pouco em 17 e bastante em 20-I-33, morrendo um deles em 2-II-33. O restante foi sacrificado no 22.º dia, sem tripanosomas na linfa nem no vaso dorsal ao exame a fresco. *Frottis* de ovários, vaso dorsal, linfa, tecido adiposo, negativos. No ovário vi uma forma suspeita, grande, talvez uma leishmania monstruosa. 2 tubos de Malpighi estavam repletos de flagelados, numerosas crídiás de dimensões grandes e médias, metacíclicos e formas intermediárias. Nos *frottis* de glândulas salivares e esôfago havia numerosas hematias, entre as quais encontramos 3 tripanosomas com a morfologia das formas sanguícolas do *S. cruzi*, com certeza do sangue de um camundongo infectado que fôra sugado pouco antes de ser o inseto sacrificado.

7)—2 fêmeas foram inoculadas com pequena quantidade de urina límpida, infectada, em 25-IV-33. 4 dias depois uma foi dissecada, sem flagelados nos órgãos (inclusive glândulas salivares): A outra sugou cobaia normal em 8-V-33, morrendo mais de 30 dias depois da inoculação, tendo sido perdida. A cobaia sugada não se infectou (v. experiências de transmissão, p. 84, i).

Estas experiências tendem a demonstrar que os tripanosomas metacíclicos das excreções do *T. megista* não evoluem na cavidade geral deste inseto, quando aí injetadas. Devem ser entretanto retomadas estas pesquisas para que sejam averiguadas certas questões muito importantes, como sejam a capacidade de multiplicação ou de regressão a crídiã, que os metacíclicos parecem não possuir. Nos casos em que ha evolução esta pôde ser atribuída a formas de crídiã, cuja inexistencia nas dejecções inoculadas não pôde ser garantida. Parece que em alguns casos os metacíclicos degeneram na hemolinfa, sendo fagocitados pelas suas células. Como consequencia ou sinal de degeneração estas formas não poderão sofrer alterações morfológicas pelas quais se inicie a transformação em crídiã?

— A técnica de inoculação de formas do *S. cruzi* provenientes do inseto ou do sangue de animal infectado, na cavidade celômica do *Triatoma*, constitui novo método de investigação das propriedades biológicas deste flagelado. Por ela foi verificada, além da capacidade de evolução do parasito sanguícola na hemolinfa do transmissor, a inexistencia de tropismo das formas evolutivas, particularmente dos metacíclicos, pelo aparelho salivar do barbeiro, bem como a não transmissibilidade da infecção pela picada dos insetos injetados.

As formas parasitárias do *Schizotrypanum* assinaladas nas glândulas salivares do *T. megista* em condições naturais (Chagas, Barreto), de-

verão provir de outras fases do desenvolvimento no hemiptero, e representam, segundo Chagas, o termo final do ciclo sexuado do parasito. Aos tripanosomas metacíclicos formados na ultima porção do intestino do barbeiro, aos quais é devida a infectividade das dejeções e que são os agentes da transmissão natural da infecção pelo método contaminativo, não nos parece ser possível attribuir nenhum papel na transmissibilidade inoculativa do *S. cruzi*, nos casos em que seja realmente verificada.

VI) — Pesquisas in natura.

Sumário: Relatório de estadía em Lassance; isolamento do parasito do homem; animais com infecção natural; *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 estadía, 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: 145

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	1
Total	<u>83</u>

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	<hr/> 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 morcêgos (*cruzi?*).

Excursões: Localidades percorridas—Santa Rita, Capão, Barreiro, Têlhas, Santa Maria, Capão d'Anta, Engenho Velho, Jaboticaba, Gentío (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 femêa de *T. geniculata* (que penetrára á noite, atraído pela luz).

Colhemos e examinámos numerosos percevejos (*Cimex lectularius*) 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 aparecer em Setembro, sendo mais abundantes nos mêses quentes e depois diminuindo até ficarem muito escassos ou inexistentes.

Em geral examinavamos sómente 1 preparado a fresco, em condições nada propicias para um exame muito demorado. Encontrámos numerosos adultos e crianças com sináis típicos de varias fórmãs clinicas da enfermidade de Chagas, principalmente da fórmula 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, os 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 roedôr 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 fariai* microlepidoptero que parasita os ovos 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 tripanosomiase 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.). Os proprios leitos dos moradores e suas vizinhanças 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 inseto depois de cheio, assim como fomos informados da frequencia desta ocorrencia.

Fáto importante para a transmissão e que complica a profilaxia da molestia de Chagas é o da eliminação pelo mesmo inseto de varias dejeções, que podem ser sempre muito ricas de formas infectantes; existe assim a possibilidade da infecção de diversos individuos pelo mesmo hemiptero, depois de uma refeição, por contaminação pelas excreções através a pele 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 podem ser considerados como capazes de infectar o Invertebrado que sobre eles se alimenta; pelo menos teóricamente, póde-se admitir a possibilidade da infecção dos barbeiros pelas formas de multiplicação do *S. cruzi* existentes no tecido sub-cutaneo, analogamente ao que acontece 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 de 1933 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 fórmias têm movimentos mais rapidos que outras; não observámos as grandes fórmias assinaladas por Sergent (1905) e Nicolle e Comte (1908) no sangue de morcêgos de outras regiões infectados pelo *T. vespertilionis*.

Fizemos o exame histológico de órgãos (coração, baço, figado, pulmão, rim, intestino, cerebro, musculo estriado) de 3 *P. hastatus* infectados; em 2 deles, que tinham raros tripanosomas no sangue, não encontrámos fórmias de multiplicação nos tecidos. Num exemplar muito infectado (n.º 3) encontrámos 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 sináis 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 (1929) 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 e 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) negativa em 9-V-33, antes de ser inoculada com *S. cruzi*, e positiva em 26-V e 2-VI-33, depois de inoculada com este parasito; 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 agora (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 obséquo 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 *Histiotus 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 subcutaneo do ponto de inoculação.

Ao partirmos de Lassance, em 13-VII-33, semeamos 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 hemo-flagelados 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 possuimos tambem não são infectantes para camondongos brancos: 4 destes animais inoculados em 9-XI-33 ainda não tiveram parasitos no san-

gue (até 25-I-34). Inoculações de culturas de *T. vespertilionis* foram também feitas por E. Pringault (1914) em camondongos, 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 experiencias tornam muito provavel a hipótese de tratar-se de um parasito não patogenico, possivelmente do *T. vespertilionis* Battaglia 1904, o primeiro tripanosoma descrito em Cheirópteros.

Chatton e Courrier (1921) denominaram *Schizotrypanum pipistrelli* um hemoflagelado de morcego, de que descreveram fórmulas de multiplicação « intratissulares »: grandes quistos cercados por delgada membrana, contendo numerosos parasitos critidiomórficos 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 (mucósa e submucósa) vesicula biliár, 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 fórmulas jovens (tripanosomas), nunca tendo visto fórmulas de critidia. 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 encontrámos no pulmão e no intestino de *P. hastatus* são bem diferentes dos quistos descritos por Chatton e Courrier, como se póde 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 fórmulas 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 morcêgos.

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 anatomía do genero *Triatoma*. Probócida e tubo digestivo. Brasil Médico, 21, 161.
- BARRETO, A. B. 1923—Nótas entomológicas. Estudos sobre a anatomía 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 lectularius*, *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 á 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 xénodiagnostique. 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*. Presse 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'insect 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 Tropen krankh., 3. Auf., 5, 673.
- CHATTON, E. e COURRIER, R. 1921—Sur un Trypanosome de la Chauvesouris, *Vesperugo pipistrellus*, à des formes crithidiennes intratissulaires et cystigènes. Hypothèse relative à l'étiologie du goître endémique. C. R. Acad. Sciences, 172, 1254.
- CHATTON, E. e COURRIER, R. 1921—Un *Schizotrypanum* chez les Chauvesouris (*Vesperugo pipistrellus*) en Basse Alsace. Schizotrypanose et goître endémique. C. R. Soc. Biol., 84, 943.

- 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 Immunitaet 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 fórmulas de evolução do *Trypanosoma cruzi* Chagas, nos tubos de Malpighi do barbeiro. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, XXIV, 183.
- DIAS, E. 1932—O *Trypanosoma cruzi* póde evoluir na cavidade geral do *Triatoma megista*. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, XXVI, 83.
- DIAS, E. 1932—Le *Trypanosoma cruzi* pendant les premières phases de l'infection expérimentale: *C. R. Soc. Biol.*, CX, 203.
- DIAS, E. 1932—Le *Trypanosoma cruzi* et ses rapports avec le Système réticulo-endothélial. *C. R. Soc. Biol.*, CX, 206.
- DIAS, E. 1932—Sur les déjections du *Triatoma megista*. Aspects du *Trypanosoma cruzi* que l'on y rencontre. *C. R. Soc. Biol.*, CXI, 486.
- DIAS, E. 1932—Expérience sur la transmission du *Trypanosoma cruzi* de l'Insect au Vertébré. *C. R. Soc. Biol.*, CXI, 490.
- DIAS, E. 1933—Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Soc. Biol.*, CXII, 1474.
- DIAS, E. 1933—Sobre um *Schizotrypanum* de um morcêgo do Brasil. (Nota preliminar). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, XXVII, 139.
- DIAS, E. 1933—Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Tése de doutoramento, apresentada á Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.
- DIOS, WERNGREN e PÉREZ, 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 ocorrência de um estágio 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 évolutif 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 viscérales et stades de développement 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 précoce et intense de la cavité abdominale chez la souris au cours des infections à *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 molestia 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.
- HOARE, C. A. e COUTELEN, F. 1933—Essai de classification des Trypanosomes des Mammifères et de l'homme basée sur leurs caractères morphologiques et biologiques. Ann. de Paras., XI, n.º 3, p. 198.
- 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 do desvíio de complemento na moléstia de Chagas. Tése de doutoramento, Rio de Janeiro.
- LACORTE, J. G. 1927—A reacção do desvíio de complemento na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, XX, 197.
- LAFONT, A. 1912—Trypanosomide d'un Réduvide (*Conorrhinus rubrofasciatus*) inoculable à la souris. Ann. Inst. Pasteur, 26, 893.
- LAVÉLAN e MESNIL 1912—Trypanosomes et Trypanosomiasés, 2e édition.
- LAVÉLAN, 1917—Leishmaniosés. Masson et Cie., Paris.
- LIMA, A. da Costa, 1927—Notas sobre o *Telenomus fariai*, novo Scelioideo, parasíto 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 Insektenflagellatenzucht 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 animals of medical and veterinary importance. 1, 589.
- PINTO, C. 1930—Tratado de Parasitologia. IV—Arthropodes parasitos e transmissores de doenças. *Biblioteca 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.

ROBERTSON, A. 1929—Note on a trypanosome morphologically similar to *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, found in an opossum, *Didelphis marsupialis*, captured at Tela, Honduras, Central America. Eighteenth Annual Report of the Medical Department of the United Fruit Company, p. 293.

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. Gesundheits., 21, 476.

SERGENT, Ed. e Et. 1905—Sur des trypanosomes des Chauves-souris. C. R. Soc. Biol., 58, 53.

SOUZA ARAUJO (LUTZ, A., SOUZA ARAUJO, H. C. e FONSECA, O.) 1918—Viagem científica no Rio Paraná e a Asuncion com volta por Buenos Aires, Montevideo e Rio Grande. Mem. Instituto Oswaldo Cruz, T. 10, p. 104 (p. 150).

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 pathologicas 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 *Schizotrypanum 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 molestia de Chagas. Mem. Inst. Osw. Cruz, VII, 120.

TORRES, C. M. 1918—Observação sobre a infecção sanguinea 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 concentraçao dos ions H sobre a cultura. Verificaçao precocoe 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 Norte, 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 Norte, Jujuy, Octubre 1929, 2, 868.
- VIANNA, G. 1911—Contribuição para o estudo da anatomia patológica 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 paralysisa 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 istiocitário. Lo Spirituale, 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. Sc. 50, 151.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS I—XII.

ESTAMPA I

- 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 inoculação de cão injectado com *S. cruzi*, raça humana, 5 dias depois da inoculação. Tecido subcutaneo com numerosos histiocitos parasitados. Zenker, H. E. (C. R. Soc. Biol., CX, 1932).

ESTAMPA II

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

ESTAMPA III

- Fig. 5—Celulas do tecido sub-cutaneo de cão inoculado sob a péle 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 coração do tatú com infecção natural. Zenker, H. E. 1100 vezes.

ESTAMPA IV

- Fig. 7—Tubo digestivo de *T. megista* adulto, femea. O intestino anterior corresponde á tromba e á porção esbranquiçada que se segue á cabeça. O intestino médio mostra nitidamente suas duas porções, 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 V

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. Critídias numerosas. Zenker, Giemsa.

ESTAMPA VI

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 VII

Fig. 13—Epitélio rétal do mesmo inséto, recoberto por densa camada de parasitos (haptomonas). Vêem-se tambem parasitos na empôla terminal e no inicio, 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 VIII

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 retal 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 retal.
- 6—haptomonas.
- 7—parêde quitinosa do réto (lesada em certos pontos acidentalmente).
- 8—prolongamento do epitélio das empôlas terminais.
- 9—camada muscular retal.
- 10—tubo de Malpighi.

ESTAMPA IX

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

ESTAMPA X

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

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

ESTAMPA XI

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

- 1- 2 estomago, 24 horas (adulto)
- 3- 8 " 4 dias (larva)
- 7 tripanosoma fixo a um leucocito
- 9-10 estomago, 21 dias (larva)
- 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 XII

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.

Agradecemos aos Srs. J. Pinto e Antonio Pugas as fotografias e os desenhos com que documentamos este trabalho.



Fig. 1



Fig. 2

Fotomicro de J. PINTO

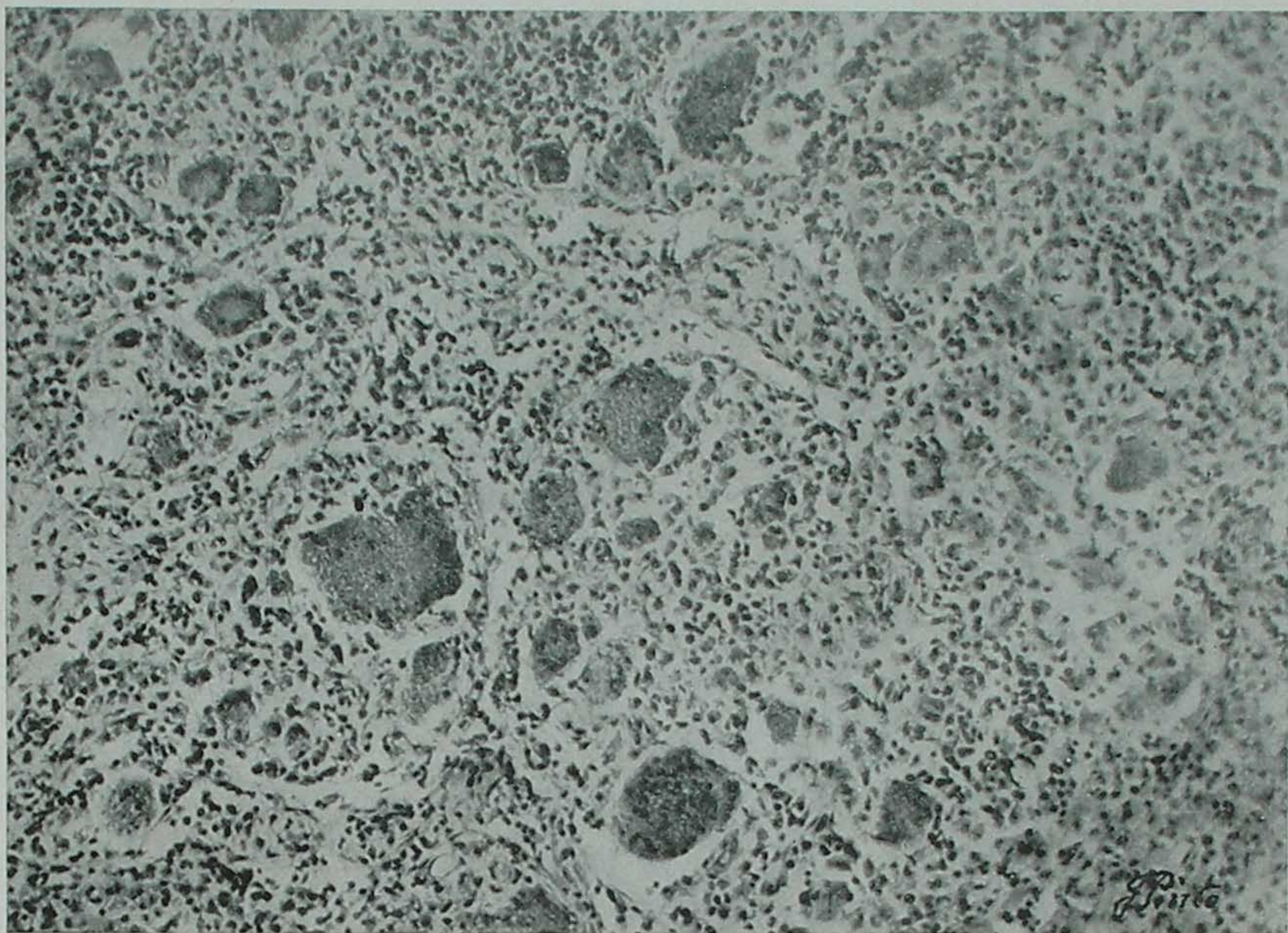


Fig. 3

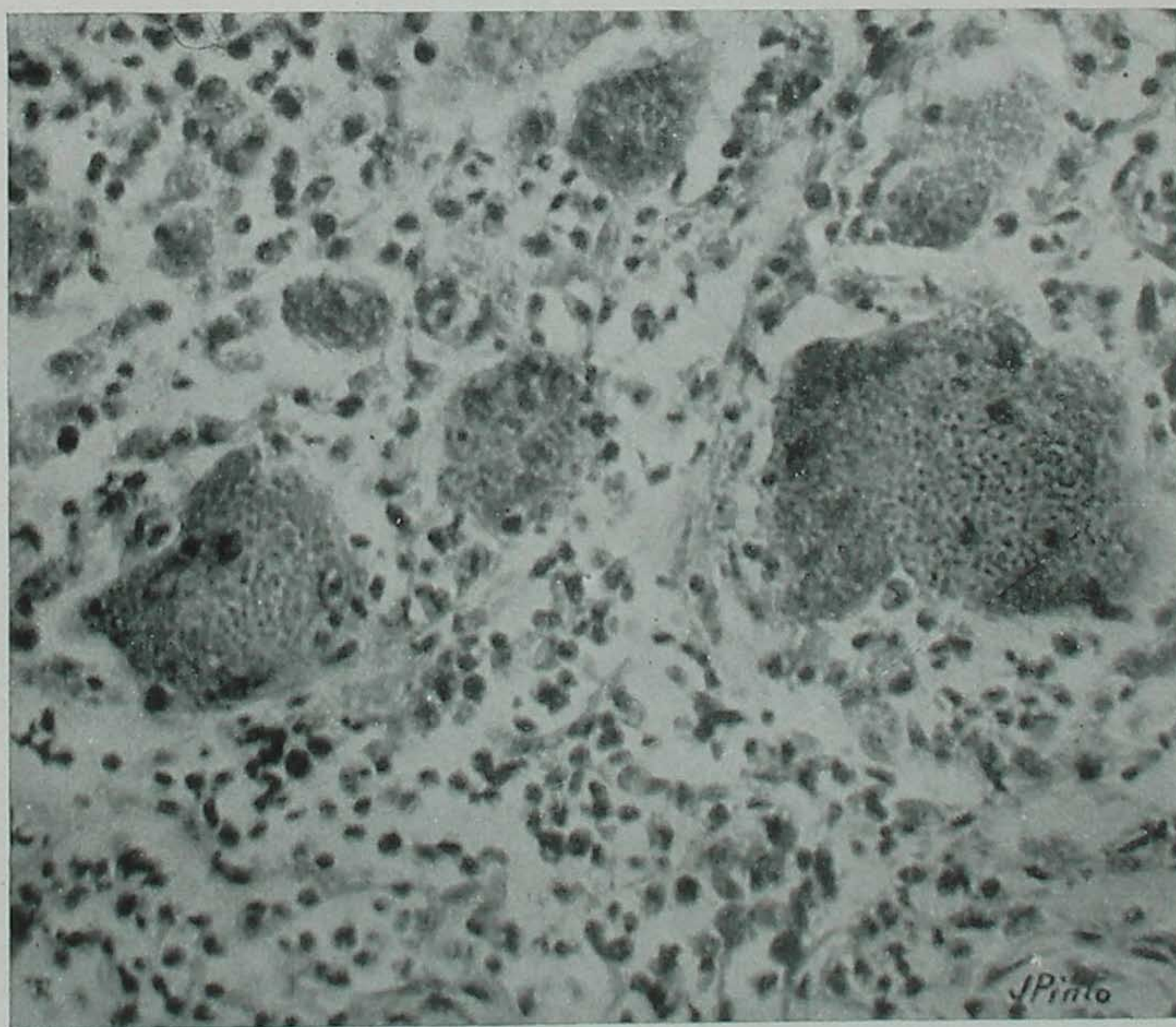


Fig. 4

Fotomicro de J. PINTO

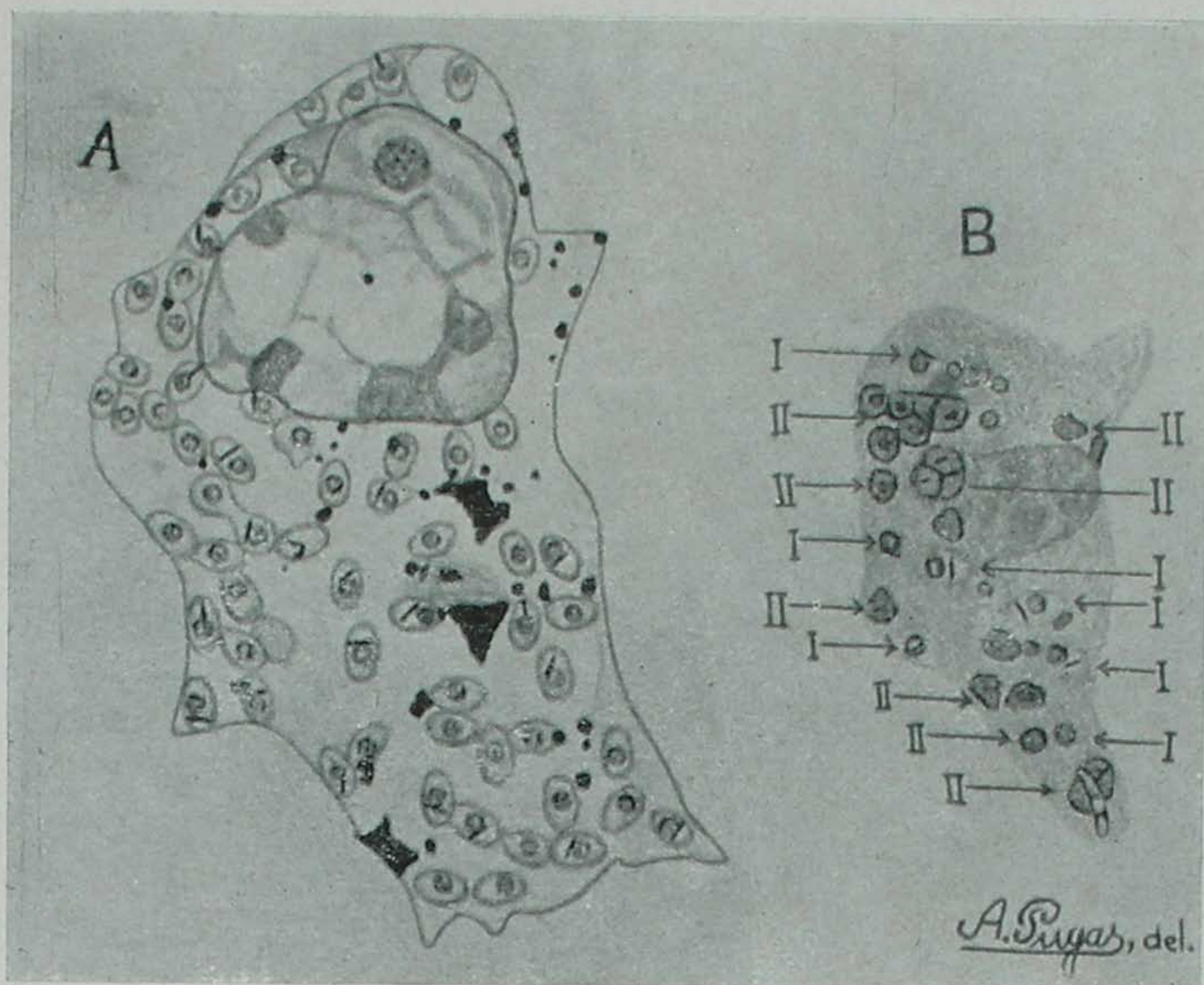


Fig. 5



Fotomicro de J. PINTO

Fig. 6

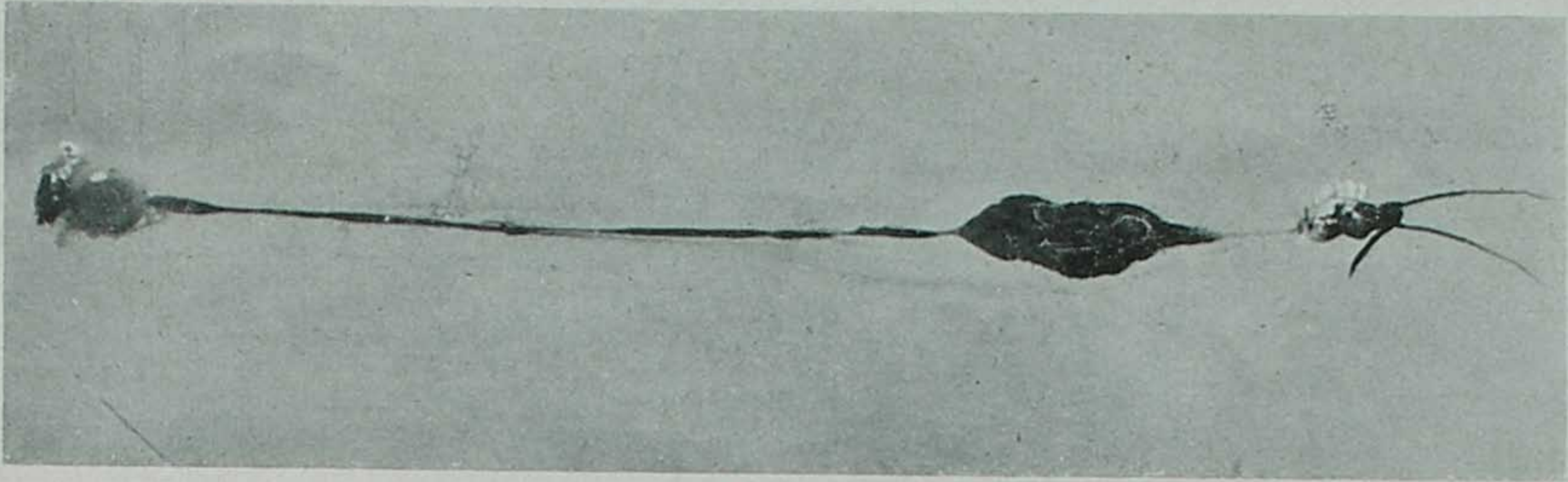


Fig. 7

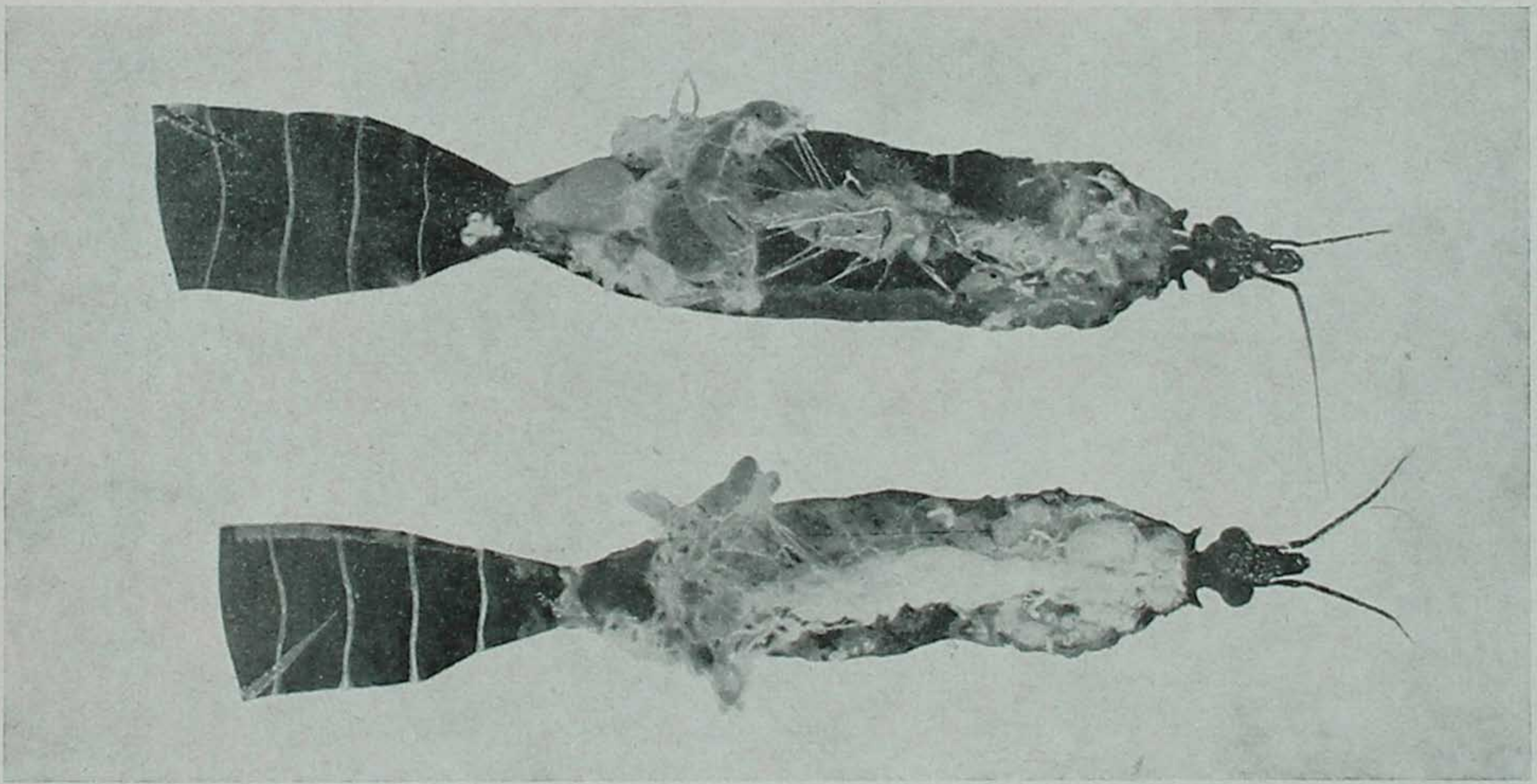


Fig. 8

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 9

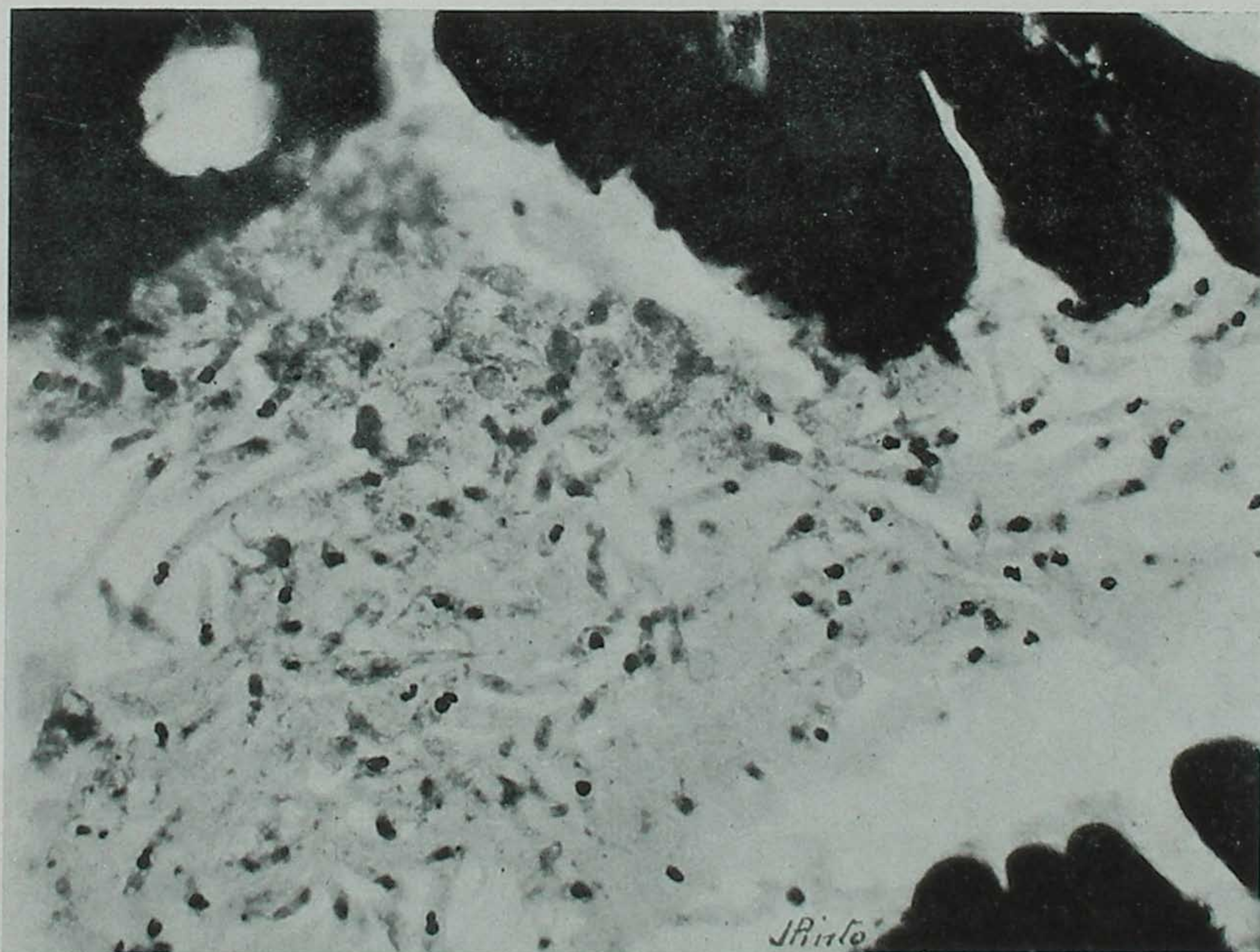


Fig. 10

Fotomicro de J. PINTO

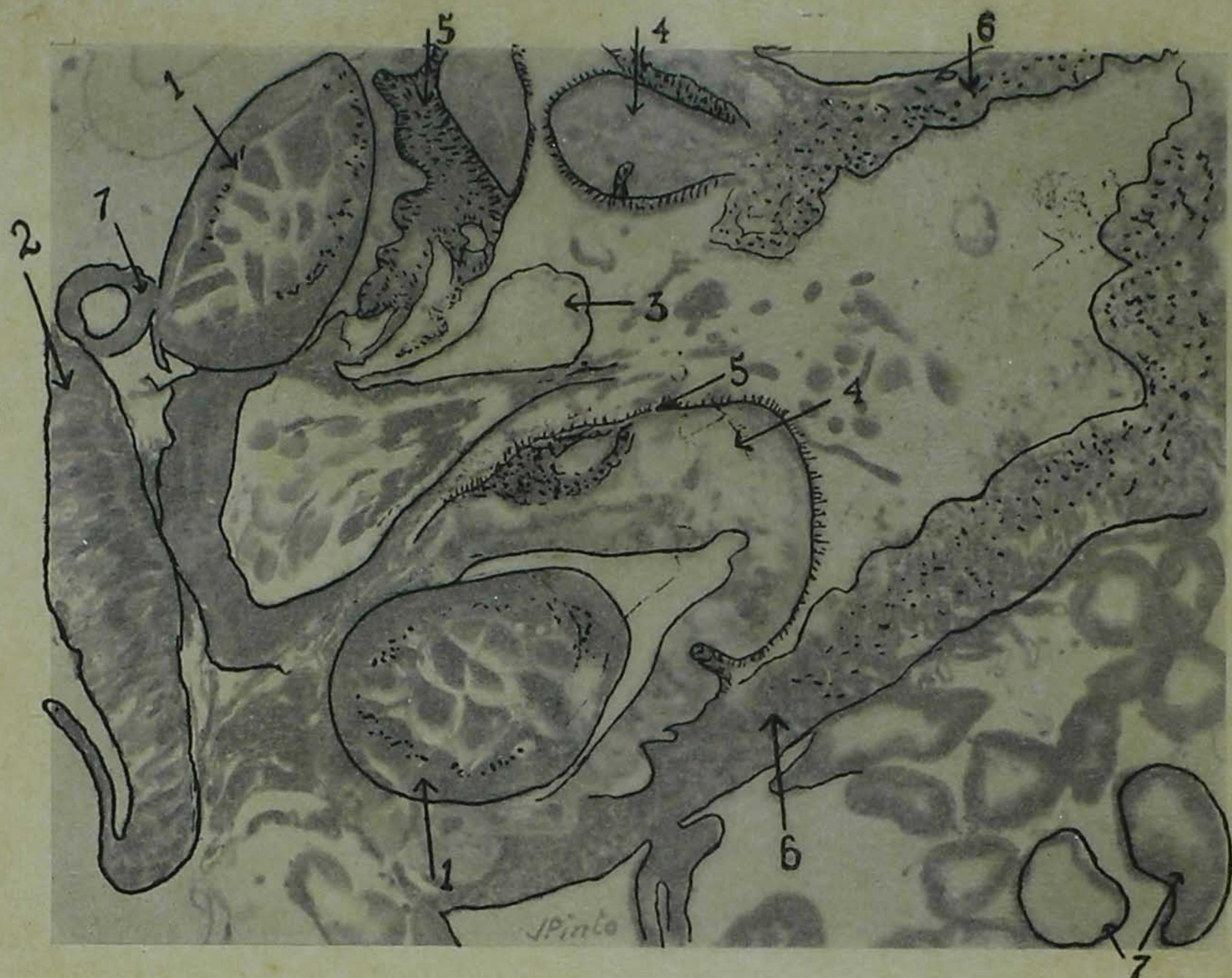


Fig. 11



Fig. 12

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 11

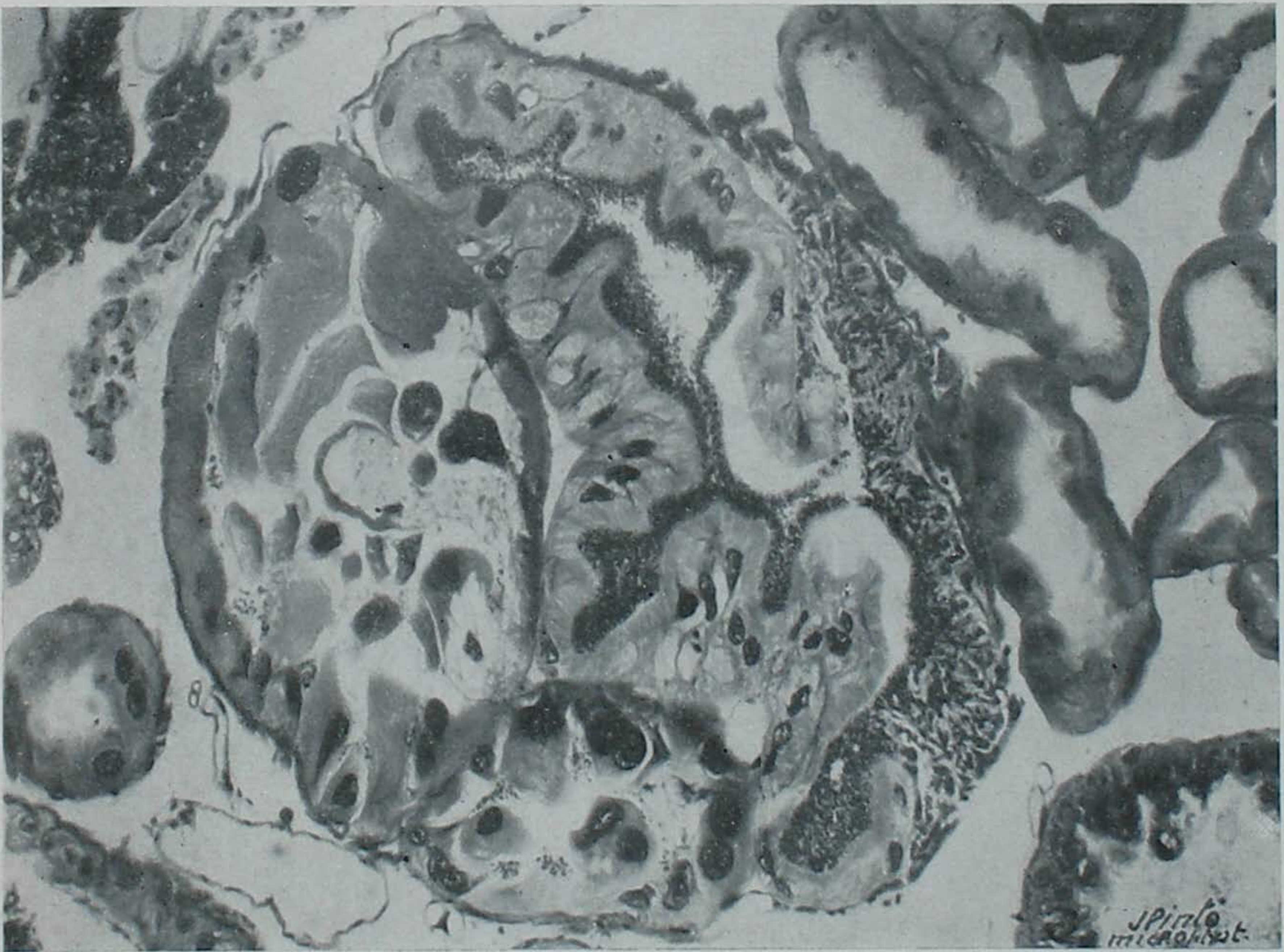


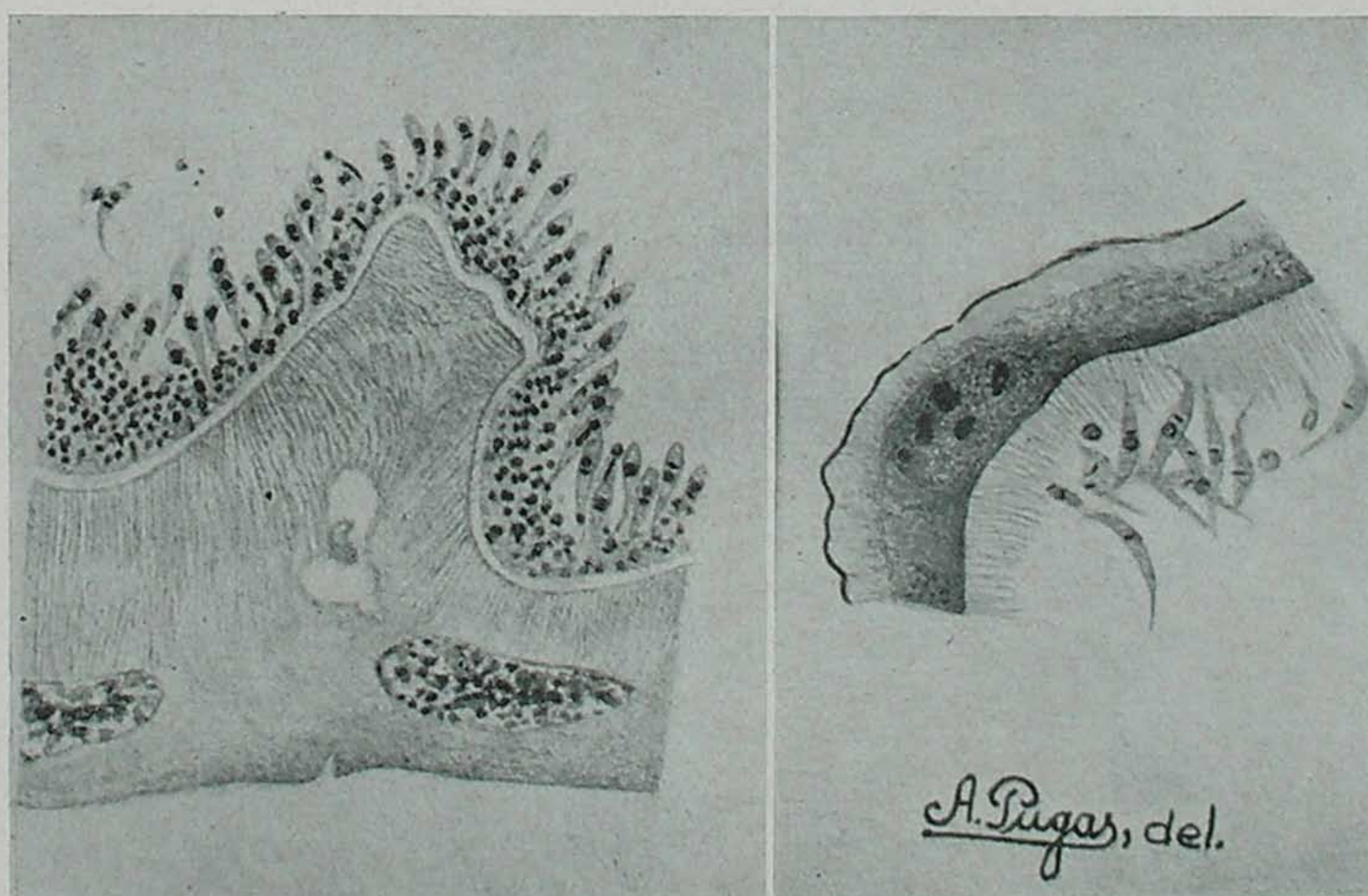
Fig. 12

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 13

Fotomicro de J. PINTO



A

Fig. 14

B

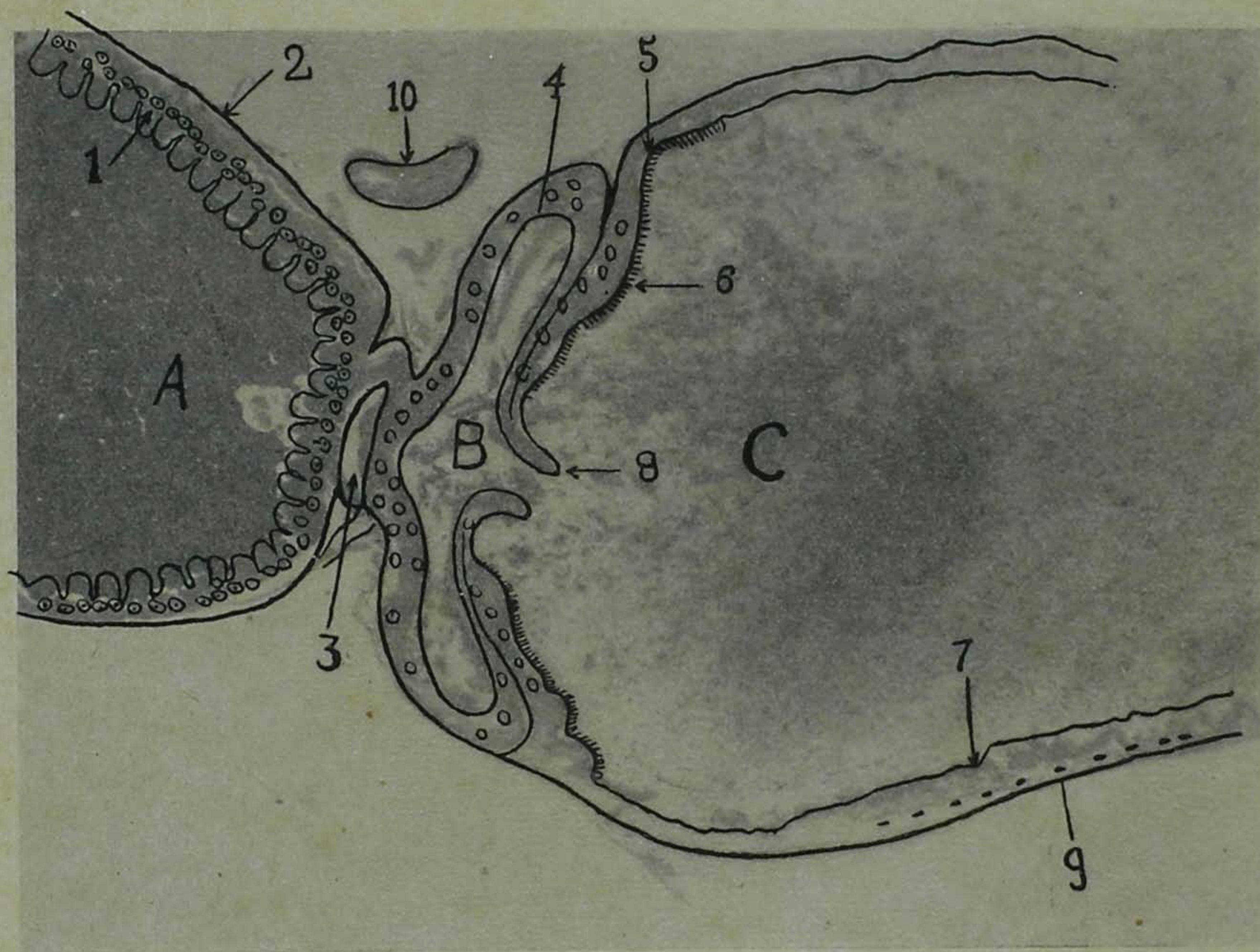


Fig. 15

Fotomicro de J. PINTO

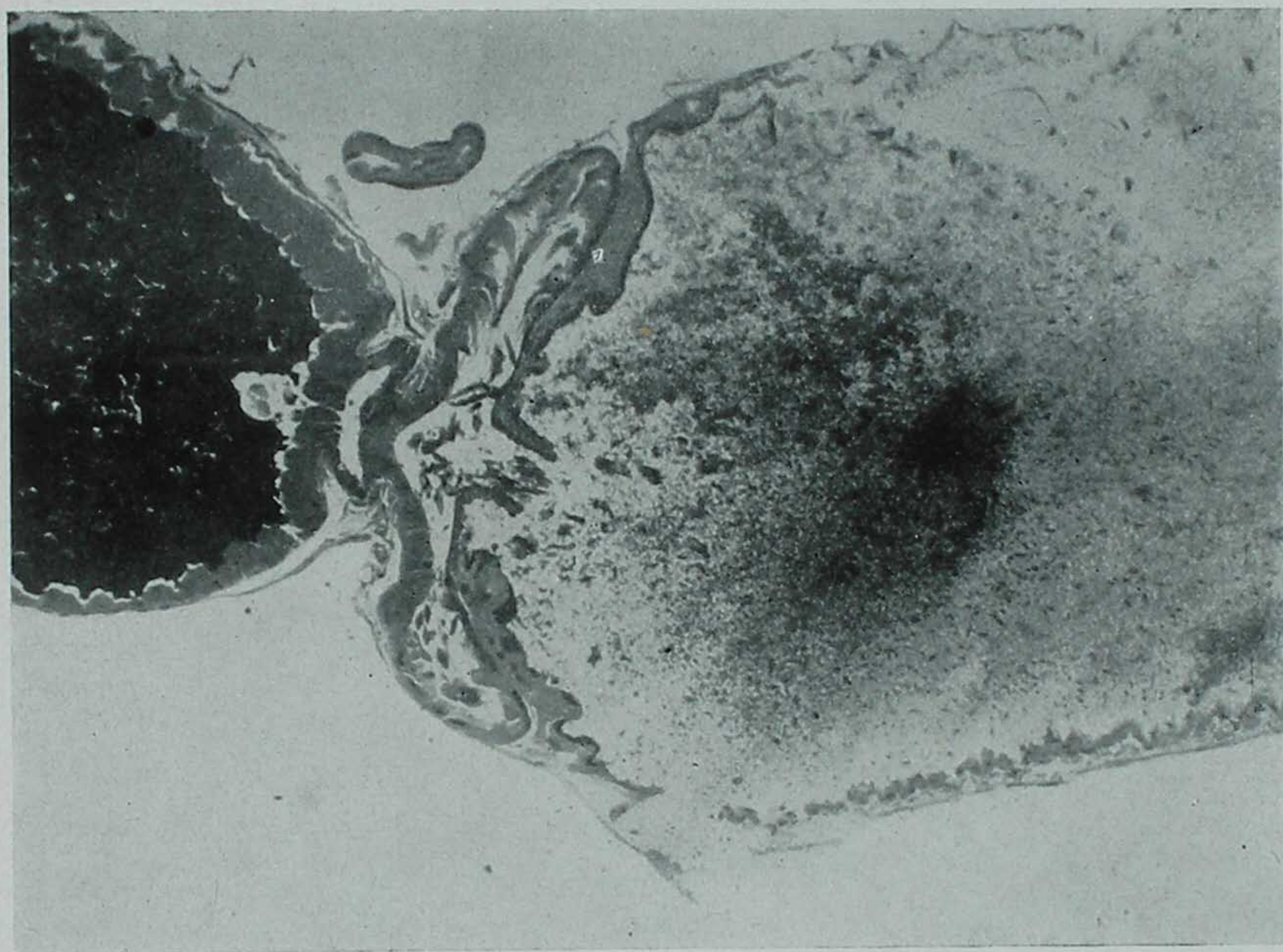


Fig. 15

Fotomicro de J. PINTO



Fig. 16

Fotomicro de J. PINTO

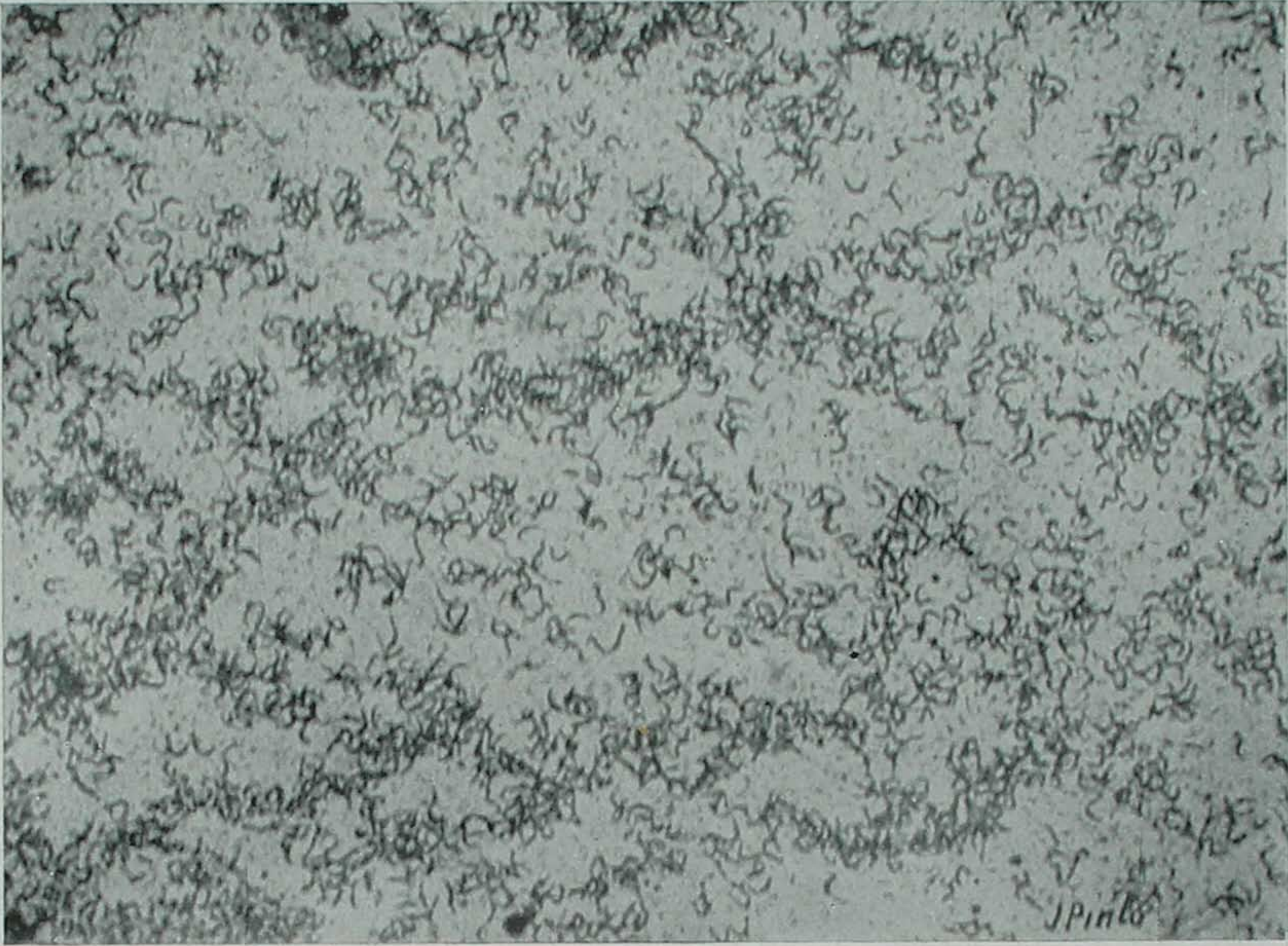


Fig. 17

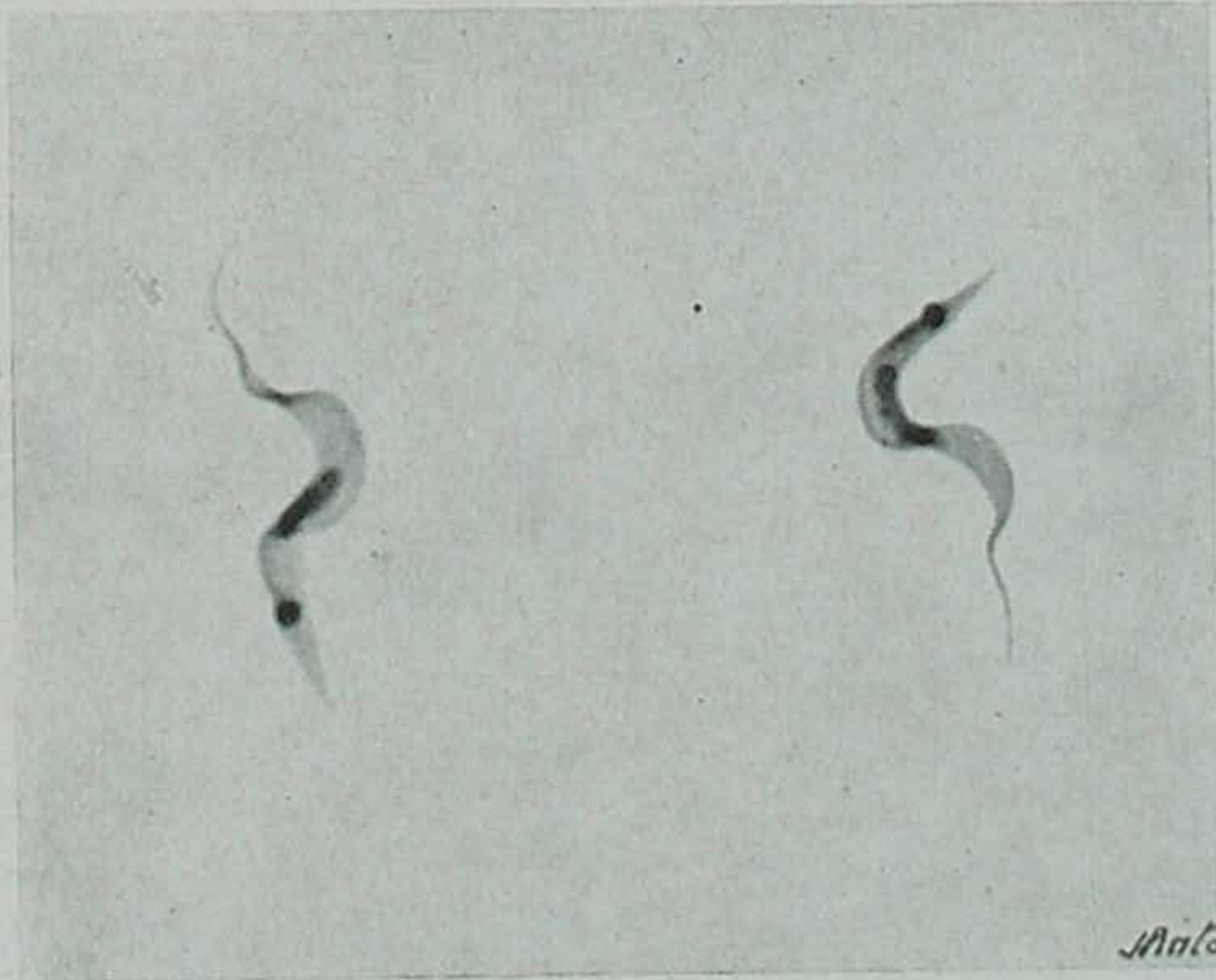


Fig. 18

Fotomicro de J. PINTO

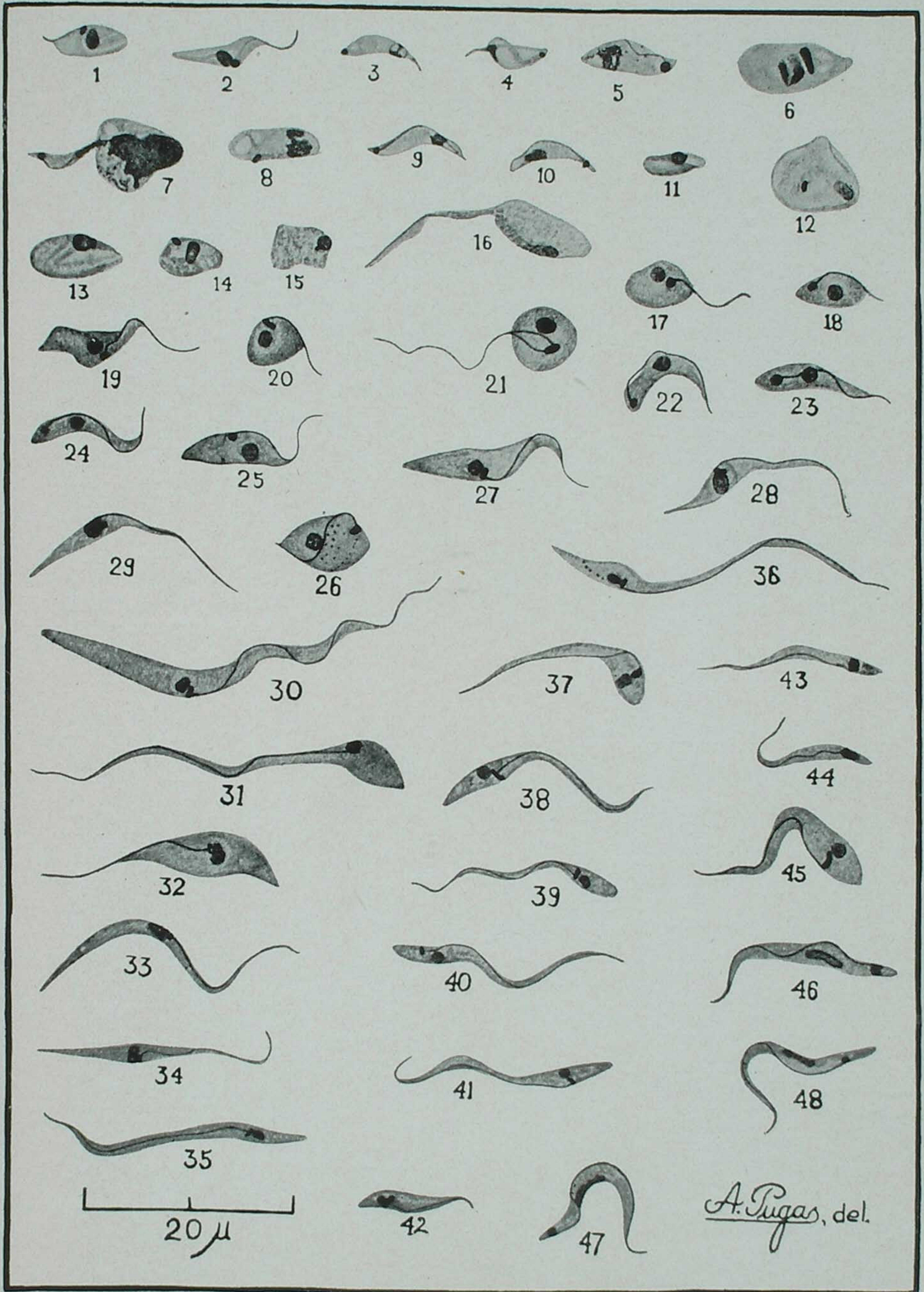


Fig. 19

Emmanuel Dias: Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.

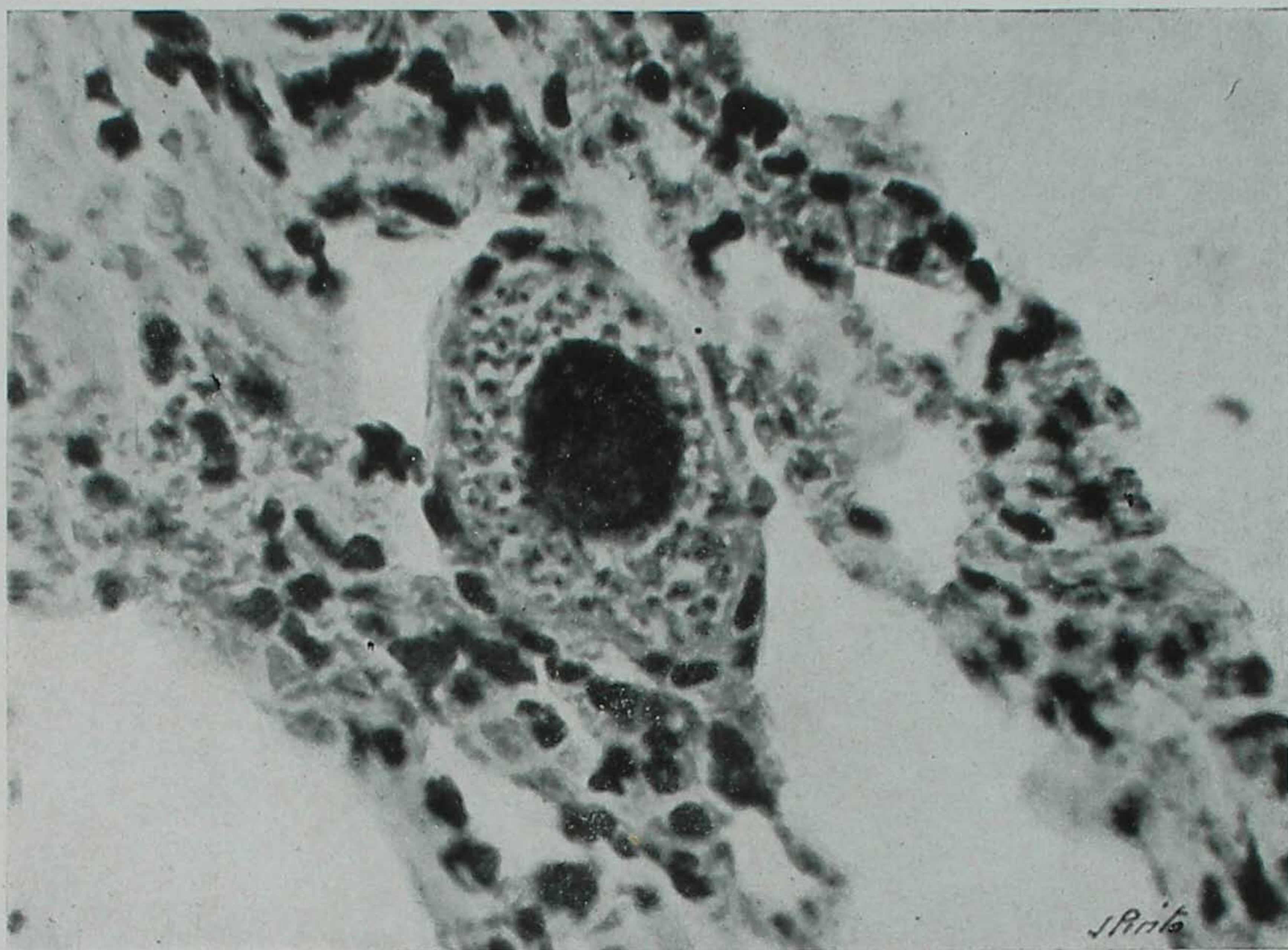


Fig. 20

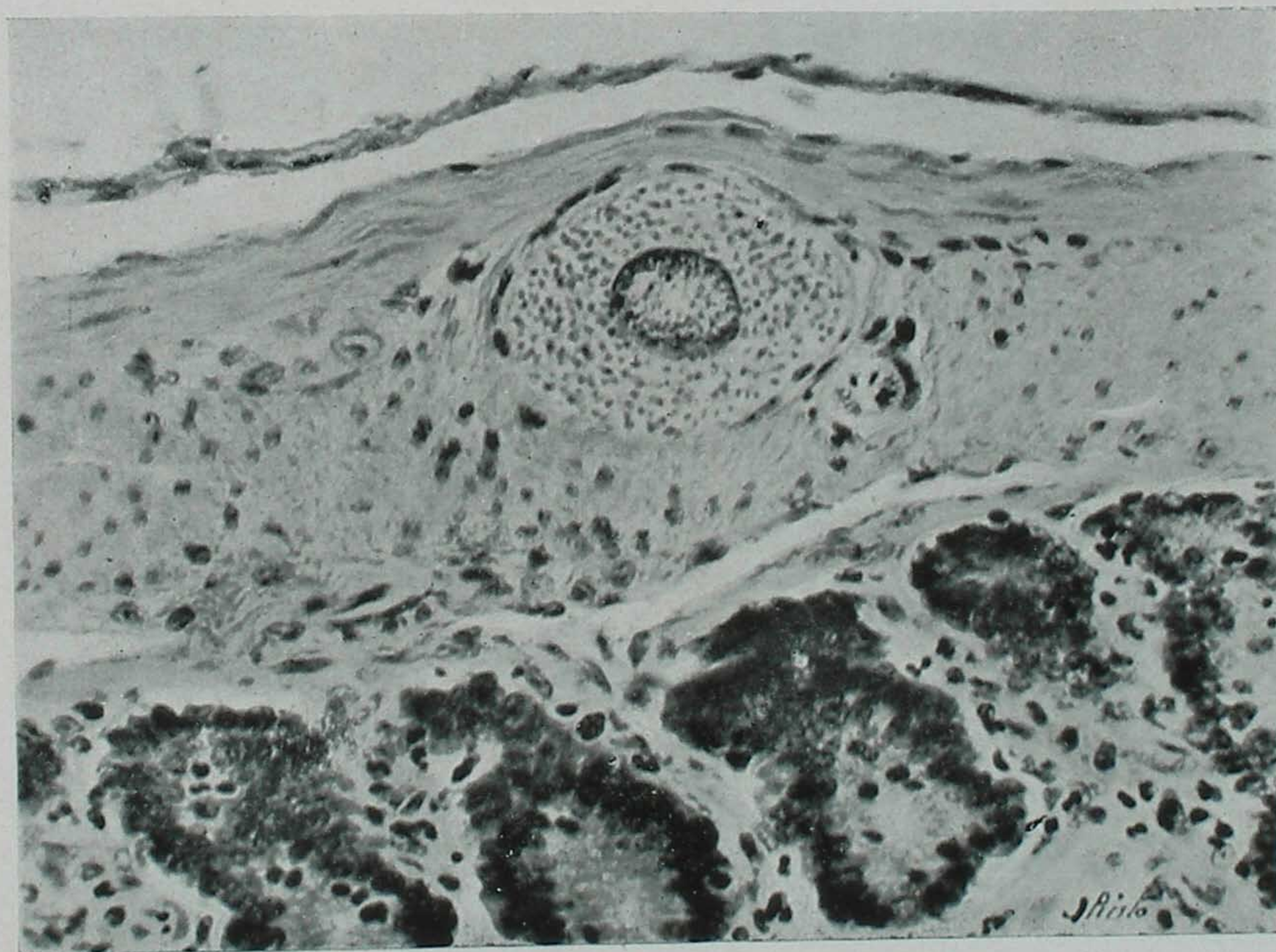


Fig. 21

Fotomicro de J. PINTO