

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
UNESP – CAMPUS DE ARARAQUARA**

LEILA REGINA LIMA ROSSI

**ESTUDO BIOMÉTRICO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS
E TRIPOMASTIGOTAS DE QUATRO CEPAS DE
TRYPANOSOMA CRUZI, CHAGAS 1909
(*KINETOPLASTIDAE*, *TRYPANOSOMATIDAE*).**

**ARARAQUARA - SP
2007**

LEILA REGINA LIMA ROSSI

**ESTUDO BIOMÉTRICO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS E
TRIPOMASTIGOTAS DE QUATRO CEPAS DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI, CHAGAS 1909 (*KINETOPLASTIDAE*,
TRYPANOSOMATIDAE).**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Análises Clínicas, Área de Análises
Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
UNESP, para obtenção do título de Mestre em Análises
Clínicas.**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA

**ARARAQUARA - SP
2007**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- R832e Rossi, Leila Regina Lima
Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (*Kinetoplastidae*, *Trypanosomatidae*). / Leila Regina Lima Rossi. – Araraquara, 2007. 76 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas
- Orientador: João Aristeu da Rosa
- . 1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Morfometria. 3. Cepas. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CDD: 616.9363

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, Hermes Rossi, in memoriam, pelo exemplo de vida, pela vontade de viver, pela simplicidade e sabedoria, por toda a sua vida, obrigada pai, pela sua existência, para sempre...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela aceitação como orientanda frente a tantos problemas que passamos.

A Maria Zenaide Tita Fernandes por todo auxílio técnico que me prestou.

A Maria Tereza Luz Eid, diretora da DIR (Divisão Regional do Interior) e ex-diretora do Hospital Nestor Goulart Reis, unidade de serviço público a que pertenço, pelo apoio e incentivo.

A Prof. Dra. Arlete Martini pela revisão ortográfica do projeto.

A Prof. Dra. Vera Lucy de Santi Alvarenga, da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara, pela aceitação da minha pessoa em seu setor de trabalho para que pudesse melhor organizar-me.

Ao prof. Dr Romeu Magnani pela ajuda na interpretação dos dados estatísticos.

Ao técnico de laboratório do Insetário da Faculdade de Saúde Pública – Araraquara - SESA (Serviço Especial de Saúde de Araraquara), João Luís Molina Gil, pela prontidão no preparo de triatomíneos para xenodiagnóstico, todas as vezes que solicitei.

Aos meus amados filhos, Lucas e Vitor, que lidaram com minha ausência com tanta coragem.

A todos que direta ou indiretamente me proporcionaram alguma ajuda neste trabalho.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1.INTRODUÇÃO.....	13
2.OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Caracterização das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de <i>T. cruzi</i>.....	21
3.2 Estabelecimento de curvas parasitêmicas.....	22
3.3 Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas destinadas à aferição de tamanho.....	25
3.4 Obtenção de formas epimastigotas em meio de cultura LIT.....	25
3.5 Obtenção de formas epimastigotas fezes de triatomíneo.....	26
3.6 Fixação e coloração das formas epimastigotas e tripomastigotas.....	27
3.7 Mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas.....	29
3.8 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Estudo morfológico de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	31
4.2 Estudo morfológico de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	32
4.3 Mensuração das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	32
4.4 Mensuração das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de meio de cultura LIT.....	49
4.5 Mensuração das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de fezes de triatomíneo.....	54
5 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Formas tripomastigotas sanguíneas.....	60
5.2 Formas epimastigotas em meio de cultura LIT.....	61
5.3 Mensurações de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	61

5.4 Mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de meio de cultura LIT.....	63
5.5 Mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de fezes de triatomíneo.....	64
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A.....	72
APÊNDICE B.....	73
APÊNDICE C.....	74
APÊNDICE D.....	75
APÊNDICE E.....	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Obtenção de inóculo para estabelecimento das curvas parasitêmicas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de <i>T.cruzi</i>	24
Figura 02. Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	25
Figura 03. Obtenção de formas epimastigotas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y em meio de cultura LIT.....	26
Figura 04. Obtenção de formas epimastigotas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de fezes de triatomíneo.....	27
Figura 05. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Bolívia: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.	31
Figura 06. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa QM2: (d) forma fina, (e) forma intermediária e (f) forma larga.....	31
Figura 07. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Y: (g) forma fina, (h) forma intermediária e (i) forma larga.....	31
Figura 08. Diversidade de posições do cinetoplasto em formas epimastigotas da cepa S.I.9 de <i>T. cruzi</i> (a, b, c e d), comparativamente à forma tripomastigota (e).....	32
Figura 09. Estabelecimento das curvas parasitêmicas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de <i>T. cruzi</i>	33
Figura 10. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	35
Figura 11. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	35

Figura 12. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Y nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	36
Figura 13. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	36
Figura 14. Frequência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	37
Figura 15. Frequência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	37
Figura 16. Frequência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	38
Figura 17. Frequência das mensurações de comprimento total das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	38
Figura 18. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	39
Figura 19. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	40
Figura 20. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	40
Figura 21. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	41

Figura 22. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....42

Figura 23. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....42

Figura 24. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....43

Figura 25. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....43

Figura 26. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico
.....44

Figura 27. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.
.....45

Figura 28. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.
.....45

Figura 29. Frequência da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.46

Figura 30. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico
.....47

Figura 31. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....47

Figura 32. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , da cepa Y , nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.....	48
Figura 33. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	48
Figura 34. Frequência das mensurações de largura das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , em meio de cultura LIT ,das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.	50
Figura 35. Frequência das mensurações de comprimento total das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas de meio de cultura LIT,das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	51
Figura 36. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	52
Figura 37. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas em meio de cultura LIT das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y	53
Figura 38. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y	53
.	
Figura 39. Frequência das mensurações de índice nuclear das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de meio de cultura LIT ,das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	54
Figura 40. Frequência das mensurações de largura das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	56
Figura 41. Frequência das mensurações de comprimento total das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ., obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	56
Figura 42. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	57
Figura 43. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	58

Figura 44. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	59
Figura 45. Frequência das mensurações dos índices nucleares das formas epimastigotas <i>T. cruzi</i> obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	59
Tabela 01. Obtenção do número de formas tripomastigotas analisadas em cada período (PA, P e PP), e formas epimastigotas analisadas em LIT e triatomíneo com as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	29
Tabela 02. Dias estabelecidos para cada cepa de <i>T. cruzi</i> baseados nas curvas parasitêmicas obtidas de camundongos Swiss infectados com as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	33
Tabela 03. Resultados estatísticos em quartis das mensurações de formas tripomastigotas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	34
Tabela 04. Resultados estatísticos em quartis das mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	49
Tabela 05. Resultados estatísticos em quartis das mensurações de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , obtidas em fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.....	55

RESUMO

Este estudo visou mensurar formas tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y por meio de microscópio óptico acoplado a um analisador de imagens e programa Leica QWin. Para tanto utilizou-se os parâmetros definidos por DIAS, FREITAS FILHO (1943) e BARRETO (1965): distâncias da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), do meio do núcleo à extremidade anterior do corpo (NA), comprimento do flagelo (FL), comprimento total (T), largura (L), Área do Cinetoplasto (AC), Área do Núcleo (NA) e Índice Nuclear (IN). Mensurou-se 360 formas tripomastigotas sanguíneas, 120 formas epimastigotas de meio de cultura LIT e 120 formas epimastigotas de fezes de triatomíneo de *T. cruzi* de cada uma das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y. Os oito parâmetros definidos para caracterização das formas tripomastigotas sanguíneas foram mensurados anteriormente ao pico de parasitemia, durante o pico e posteriormente ao pico de parasitemia para as formas tripomastigotas sanguíneas. As quatro cepas de *T. cruzi* mostraram percentual distinto de formas finas, intermediárias e largas das formas tripomastigotas sanguíneas. De acordo com os parâmetros morfométricos as formas foram classificadas em fina, intermediária e larga no que se refere à largura e curta, intermediária e longa com relação ao comprimento. As mensurações das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y quanto a largura mostraram os seguintes resultados: as formas finas variaram entre 0,6 e 1,3µm; intermediárias entre 1,4 e 2,1µm; largas entre 2,2 e 5,5µm. Quanto ao comprimento total obteve-se para a forma curta variação entre 13,5 e 19,5µm; para a forma intermediária entre 19,6 e 24,7µm; para a forma longa entre 24,8 e 43,8µm. As formas epimastigotas de meio de cultura LIT apresentaram as seguintes mensurações quanto à largura: formas finas entre 1,1 e 1,7µm, formas intermediárias entre 1,8 e 2,8µm, forma larga entre 2,9 e 5,0µm; quanto ao comprimento total obteve-se para forma curta variação entre 13,0 e 23,2µm, forma intermediária entre 23,3 e 31,3µm, forma longa entre 31,4 e 43,7µm. As mensurações das formas epimastigotas de fezes de triatomíneo quanto a largura variaram entre 0,7 e 1,8µm para forma fina, 1,9 e 3,3µm para forma intermediária, 3,4 e 7,5µm para forma larga; quanto ao comprimento total variaram entre 11,1 e 19,1µm para forma curta; 19,2 e 32,5µm para forma intermediária; 32,6 e 51,1µm para forma longa.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, morfometria, cepas.

ABSTRACT

This study aimed the measurement of trypomastigotes and epimastigote of *Trypanosoma cruzi* from Bolivia strains, QM2, S.I.9 and Y by means of an optical microscope coupled to an image analyses program called Leica QWin. The following parameters defined for DIAS, FREITAS FILHO (1943) & BARRETO (1965) were used for these measurements: distance from the posterior extremity to the middle of the nucleus (PN), from the middle of the nucleus to the anterior extremity of the body (NA), flagellum length (FL), total length (T), width (L), kinetoplast area (AC), nucleus area (NA) and nuclear index (IN). 360 blood-stream forms were measured, 120 epimastigote forms in the LIT culture mean and 120 epimastigote forms from triatomine feces of *T. cruzi* for each of the Bolivia strains, QM2, S.I.9 and Y. All eight defined parameters for trypomastigote forms characterization were measured before the parasitemia peak, during the peak and after the parasitemia peak. The four *T. cruzi* strains showed to be distinct when comparing the percentage in the thin, intermediary and large forms of trypomastigotes. According the morphometric parameters the forms were classified as thin, intermediary and wide regarding width, and short, intermediary and long regarding length. The measurements of trypomastigote blood stream forms of *T. cruzi* from Bolivia strains QM2, S.I.9 and Y regarding width showed the following results: the thin form varied from 0.6 to 1.3 μ m; the intermediary from 1.4 to 2.1 μ m; wide from 2.2 to 5.5 μ m. Now the total length obtained for the short form varied from 13.5 to 19.5 μ m; for the intermediary form from 19.6 to 24.7 μ m; for the long form from 24.8 to 43.8 μ m. The epimastigote forms in the LIT culture mean presented the following measurements related to width: thin forms between 1.1 and 1.7 μ m, intermediary forms between 1.8 and 2.8 μ m, wide form between 2.9 and 5.0 μ m; regarding total length the variation obtained for the short form was between 13.0 and 23.2 μ m, for the intermediary form between 23.3 and 31.3 μ m, and for the long form between 31.4 and 43.7 μ m. The measurements for the epimastigote forms of triatomine feces regarding width varied from 0.7 to 1.8 μ m for the thin form, 1.9 to 3.3 μ m for the intermediary form, 3.4 to 7.5 μ m for the wide form; regarding total length between 11.1 to 19.1 μ m for the short form; 19.2 to 32.5 μ m for the intermediary form; 32.6 to 51.1 μ m for the long form.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, morphometry, strains.

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é um dos mais importantes problemas de Saúde Pública na América Latina. Ocorre desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e Chile. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se a existência de 16 a 18 milhões de indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* e 120 milhões em risco de adquirir a infecção (WHO, 2005).

A doença de Chagas foi descrita e estudada, nos aspectos essenciais por CHAGAS, 1909, quando participava da campanha antimalárica, nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, em Lassence, no norte de Minas Gerais. Chagas descreveu o agente etiológico da parasitose, vários aspectos da doença e identificou o inseto transmissor.

A doença de Chagas é uma zoonose transmitida por insetos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, que compreendem 140 espécies classificadas em 18 gêneros e 6 tribos (SCHOFIELD, 2000; GALVÃO et al., 2003; FORERO et al., 2004; COSTA et al., 2006; GALVÃO e ANGULO, 2006; COSTA e FELIX, 2007; SANDOVAL et al., 2007). A maioria das espécies de Triatominae são silvestres e algumas ocupam habitats peridomiciliares como currais e galinheiros, também infestam casas.

T. cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é um flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença de um flagelo e um cinetoplasto, uma organela especializada contendo DNA, localizado na mitocôndria celular. BRENER (1992) define a população heterogênea de *T. cruzi* como um pool de cepas que circulam no ciclo silvestre e doméstico envolvendo humanos, vetores e reservatórios animais.

Os principais vetores no Brasil são: *Triatoma sordida* no Sudeste e Centro Oeste, *Triatoma pseudomaculata* no Nordeste, *Triatoma rubrovaria* no Rio Grande do Sul (SILVEIRA e VINHAES, 1998).

CHAGAS (1909) foi o primeiro autor a estudar a evolução de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. A partir de então vários autores têm descrito o encontro de formas do parasita em outros órgãos, além do tubo digestivo do inseto.

No vetor *T. cruzi* tem um ciclo evolutivo único, assexuado, em três porções do sistema digestório: estômago, intestino e reto. No estômago, ou região anterior do intestino médio, ocorre a transformação das formas sanguíneas em arredondadas, com ou sem flagelo, em transição ou ainda degeneradas. Na porção intestinal, ou intestino médio, acontece a multiplicação das esferomastigotas e formas degenerativas (CHAGAS, 1935). Na porção

retal, ou intestino posterior, ocorrem epimastigotas e formas metacíclicas, que de acordo com BRUMPT (1912) são as únicas infectantes.

KOLLIEN e SCHAUB (1997) estudaram a densidade de população e a porcentagem de diferentes estágios de desenvolvimento na infecção estabelecida por *T. cruzi* em *Triatoma infestans* de grupos alimentados, não alimentados e induzidos à diurese por adição de hormônio diurético. Observaram que depois de alimentados, as porcentagens de esferomastigotas e estágios intermediários em forma de gota diminuíram, mas formas epimastigotas e tripomastigotas aumentaram. Concluíram que a diurese induz ao desenvolvimento de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* originárias de formas epimastigotas.

Segundo CHAGAS (1935) a tripanossomíase americana pode ser considerada uma infecção geral metastática. Após a penetração do parasito, por meio do depósito de fezes contaminadas dos triatomíneos, (BRUMPT, 1912), as formas tripomastigotas metacíclicas introduzidas nos tecidos, mucosa conjuntival, mucosa bucal, englobadas por células do sistema fagocítico mononuclear, transformam-se em amastigotas e iniciam a multiplicação por divisões binárias sucessivas (VIANNA, 1911; TORRES, 1917; DIAS, 1933), e que a partir do foco inflamatório, são lançadas na circulação sanguínea, como forma flagelada. Essas atingem outros tecidos, preferencialmente tecido cardíaco, muscular e nervoso. Esses são os focos inflamatórios secundários que lançam na circulação novas formas parasitárias, caracterizando uma infecção geral metastática (CHAGAS, 1935).

Em relação à evolução de *T. cruzi* no sangue periférico do homem, CHAGAS (1909) relatou o dualismo morfológico das formas tripomastigotas:

a) uma forma, com grande cinetoplasto, muito próximo ou exatamente na extremidade posterior do parasito, com maior diâmetro transversal e o núcleo grande, de forma ovóide, no sentido longitudinal.

b) A outra forma distingui-se da primeira pelo aspecto do cinetoplasto que é mais ou menos esférico, muito menor, situado na extremidade posterior do organismo e com o núcleo esférico; o plasma apresenta largura sensivelmente maior que na forma anterior.

Chagas observou ainda formas tripomastigotas com cinetoplasto muito distante da extremidade posterior do organismo e núcleo como longa faixa longitudinal. Julgou que esse dimorfismo se tratasse de dualidade de sexos, importante do ponto de vista da multiplicação do parasito. Outros autores desconsideraram essa hipótese CHAGAS (1935), DIAS (1936), DIAS e FREITAS FILHO (1943).

Segundo PINTO (1942), *T. cruzi* quando em gota sanguínea entre lâmina e lamínula, apresenta movimentos contínuos que deslocam as hemácias por meio do flagelo livre, dirigido sempre para a região anterior do protozoário. Esses movimentos são bastante típicos da espécie, as formas finas atravessam o campo microscópico rapidamente a maneira de uma seta, enquanto as formas largas se movem irregularmente em diversos sentidos, permanecendo algum tempo num só campo microscópico.

DIAS E FREITAS FILHO (1943) com o objetivo de aprofundar o estudo morfológico de formas sanguíneas, aplicando métodos biométricos de PEARSON (1914) e HOARE E BROOM (1938), mediram tripanossomos, estabelecendo os seguintes parâmetros:

PN: distância da extremidade posterior ao meio do núcleo;

NA: distância do meio do núcleo à extremidade anterior do corpo;

FL: comprimento do flagelo livre;

T: comprimento total, constituído pela soma de PN, NA, FL;

IN: índice nuclear PN/NA = Quociente de divisão de PN por NA.

Segundo SILVA (1959) o que mais caracteriza as formas tripomastigotas sanguíneas delgadas é a posição relativamente afastada do cinetoplasto da extremidade posterior, o aspecto sinuoso do corpo do parasita, o flagelo curto e o núcleo difuso. Nas formas largas o cinetoplasto é bastante próximo da extremidade posterior, o núcleo é ovóide e mais denso e o flagelo mais longo. As formas intermediárias tem caracteres intermediários. SILVA (1959) encontrou formas largas pequenas medindo cerca de 13µm e formas largas maiores medindo entre 20 e 22 µm.

DIAS (1934) relatou que após a inoculação de *T. cruzi* em animais por via intraperitoneal e subcutânea, alguns tripanossomos passaram diretamente da corrente sanguínea para os tecidos.

BRENER (1965) confirmou essas observações e sugeriu que formas finas são melhor adaptadas a entrar nas células teciduais. A inoculação direta de tripanossomos na corrente sanguínea de camundongo normal demonstrou que uma porcentagem alta de formas largas pode permanecer no sangue por quatro ou cinco dias resistindo ao ciclo tecidual, já que a maioria das formas finas penetra nos tecidos quatro a seis horas após a inoculação. Esse achado evidencia que cada forma de tripanossoma sanguíneo pode ter um comportamento biológico e que cada cepa característica pode ter predominância relativa de uma ou outra forma de tripanossoma. Diferenças mais surpreendentes no comportamento de formas finas e largas foram observadas em camundongos em fase crônica da doença de Chagas após terem sido inoculados intravenosamente. As formas finas são extremamente sensíveis aos

mecanismos imunológicos e nenhum tripanossomo foi detectado no sangue uma ou duas horas após a inoculação, já que as formas largas persistiram no sangue de animais imunes por mais de uma semana (BRENER, 1969).

BRENER e CHIARI (1963) agruparam as formas morfológicas sanguíneas de *T. cruzi* em três padrões morfológicos:

- 1 - com predominância de formas delgadas
- 2 - com predominância de formas consideradas classicamente como largas
- 3 - amostras que apresentam um grande número de formas anormalmente largas.

Nas amostras nas quais predominam formas delgadas, essas apresentam cinetoplasto bastante afastado da extremidade posterior, o flagelo curto e o núcleo alongado, com localização mediana. Nas amostras com predominância de formas largas, o cinetoplasto tem localização terminal ou subterminal sendo o núcleo arredondado com localização anterior ou mediana. Nas amostras nas quais predominam formas largas, mas com grande número de formas muito alargadas e morfologia peculiar, o cinetoplasto localiza-se na região terminal ou subterminal, o núcleo é arredondado com tendência à localização anterior e o citoplasma apresenta-se intensamente vacuolizado.

As variações morfológicas de tripanossomos isolados de pessoas e animais quanto ao comprimento e largura tem sido objeto de estudos de diversos investigadores, com a finalidade de possível caracterização específica das amostras. ZELEDÓN e VIETO (1958) utilizaram o índice nuclear médio para a distinção entre duas espécies: *T. cruzi* e *T. vespertilionis*. A variação dos dados biométricos e a grande diversidade de comportamento biológico de *T. cruzi* levaram BARRETO (1965) a concluir que apesar dos dados biométricos serem indispensáveis para caracterização do parasita, outros critérios devem ser considerados para sua identificação: cultivabilidade, evolução no tubo digestivo de triatomíneos, infectividade para animais de laboratório, multiplicação nos tecidos do hospedeiro vertebrado e desenvolvimento de imunidade a outras amostras virulentas.

BELDA NETO (1973) ao estudar a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras de *T. cruzi* não detectou correlação estreita entre os caracteres morfológicos, biológicos e patogênicos de diversas amostras de tripomastigotas. Nesse estudo o autor observou que o comprimento total médio da forma tripomastigota variou entre os seguintes valores: 17,27 μ m (amostra C.M.S.P.) e 22,67 μ m (amostra J.B.S.); largura média do corpo variou entre 1,16 μ m (amostra E.F.S.) e 3,49 μ m (amostra B.P.O.) e o índice nuclear médio variou entre 0,90 (amostra G.G.) e 1,32 (amostra J.B.S.).

HOWELLS e CHIARI (1975) usaram camundongos normais como “filtros biológicos”, isto é, como modelos experimentais que permitem reter as formas delgadas nos tecidos e, assim, obter populações praticamente puras de formas largas 24 a 48 horas após a inoculação endovenosa dos parasitas. Essas formas largas circulantes mostraram-se significativamente menos infectantes para camundongos que a população normal de tripomastigotas da mesma cepa, mas produziram altos índices de infecção em triatomíneos. Esses dados levaram os autores a afirmar que tais parasitas não são estágios de degeneração e, provavelmente, representam formas pré-adaptadas à evolução no vetor. Essa sugestão estaria de acordo com SILVA (1959).

RIBEIRO et al. (1982) descreveram a possibilidade de fracionamento de uma cepa de *T. cruzi*, em duas subamostras, com características morfológicas distintas, por meio de centrifugação diferencial descrita por DEANE et al. (1976) e verificaram que a constituição da população de *T. cruzi* pode influir sobre o curso da infecção.

BARATA et. al. (1988), descreveram o primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana do Estado do Acre, correlacionando a cepa isolada de caso humano com triatomíneos silvestres da área. O estudo abrangeu caracterização morfológica das amostras (humana e silvestre) e demonstrou a importância da biometria em estudos epidemiológicos.

A relação parasito-hospedeiro na doença de Chagas é assunto amplamente investigado e revela grande dificuldade quando se tenta correlacionar o polimorfismo de *T. cruzi* com seu comportamento biológico, tanto no homem como em animais de experimentação (FERRIOLLI et al., 1968; ANDRADE et al., 1970, COURA et al., 1966 e BELDA NETO, 1974).

Quando estudadas em animais de laboratório, cepas de *T. cruzi* isoladas de áreas geográficas diferentes (BRENER, 1977, MELO e BRENER, 1978; ANDRADE et al., 1985) e clones de cepa de *T. cruzi* (PONSTAN et al., 1983, 1987; LIMA et al., 1990) têm induzido a quadros clínicos diferenciados e reproduzíveis da doença de Chagas.

A ação patogênica variável do parasita para o hospedeiro, segundo ANDRADE et al. (1970) se deve a vários fatores, dentre eles as características morfológicas do agente.

Com o objetivo de estabelecer as características biológicas e bioquímicas de um número significativo de cepas de *T. cruzi* de diferentes áreas geográficas, ANDRADE (1974), ANDRADE e MAGALHÃES (1997) ao estudarem as características biológicas e histopatológicas de camundongos infectados com essas cepas de *T. cruzi*, incluíram as mesmas em três tipos ou biotipos: I, II, III:

Tipo I – macrofagotropismo na fase inicial da infecção, alta virulência com 100% de mortalidade em 12 dias, parasitemia máxima entre o 7º e 12º dias e predominância de formas finas na fase inicial da infecção;

Tipo II – miotropismo, especialmente envolvendo o coração, predominância de formas largas, mas com uma porcentagem de formas finas no sangue periférico, picos parasitêmicos entre o 12º e 20º dias, quando a mortalidade atinge o máximo; este tipo de cepa pode apresentar baixa, média ou alta virulência;

Tipo III – cepas miotrópicas, que parasitam principalmente o músculo esquelético, com predominância de formas largas, picos parasitêmicos de 25 a 30 dias ou mais tarde, baixa mortalidade com até 30 dias.

Zimodemas são populações de *T. cruzi* que diferem entre si pelas propriedades de algumas isoenzimas específicas, colocadas em evidência por técnicas eletroforéticas. Zimodemas para mais de 250 cepas de *T. cruzi* foram identificados como Z1, Z2 e Z3 baseados nos perfis isoenzimáticos de glicosefosfato isomerase (GPI), fosfoglicomutase (PGM), aspartato aminotransferase (ASAT) e alanina aminotransferase (ALAT). O zimodema Z2 foi associado ao ciclo doméstico; o zimodema Z1, e menos comumente o zimodema Z3, foram associados ao ciclo silvestre (MILES, M.A. et al, 1980).

Tipos biológicos (biodemas) foram correlacionados com zimodemas com exceção do Tipo I que apresentou um perfil eletroforético peculiar não descrito previamente e que foi identificado como Z2b (ANDRADE et al, 1983). Tipo II de ANDRADE (1974) corresponde ao Z2 segundo MILES (1980), e Tipo III ao Z1. Para cada biodema um quadro histopatológico característico foi mostrado. A predominância do mesmo Tipo e Zimodema em uma área geográfica foram confirmadas. Assim foram detectadas cepas Tipo II entre casos humanos do nordeste da Bahia e leste de Goiás, Cepa Tipo III de caso humano do norte do Brasil e América Central. (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

Os biodemas das cepas acima também foram correlacionados às lesões histopatológicas encontradas, considerando envolvimento cardíaco e neuronal. Esses achados sugerem que o comportamento biológico junto aos modelos de isoenzimas e quadro patológico em hospedeiro vertebrado pode ser uma importante ferramenta para estabelecer correlações entre comportamento de cepas e manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas em diferentes áreas geográficas (ANDRADE, 1999).

SOUTO et al. (1996) analisaram uma ampla amostragem de *T. cruzi* isolada de hospedeiros vertebrados e invertebrados por amplificação de PCR de uma sequência de gene de RNA ribossomal, uma sequência de genes mini-exon e DNA polimórfico ampliado

randomicamente. Amplificação de rDNA e sequência de genes mini-exon indicaram um dimorfismo com ambos os genes arranjados randomicamente: produtos de DNA de 125 ou 110 pares de bases e 300 ou 350 pares de bases produtos de mini-exon. Dentre isolados individuais, uma de 3 associações foi observada: o produto de rDNA com 125 pares de bases com o produto de mini-exon com 300 pares de base, definido como grupo I; os produtos de rDNA com 110 pares de bases com o produto de mini-exon com 350 pares de base, definido como grupo II e a presença de ambos os produtos amplificados de rDNA (125pb e 110pb) com o produto mini-exon grupo I (300pb) definido como grupo ½. Esses estudos mostraram uma clara divisão de *T. cruzi* em duas grandes linhagens e por sua vez apresentam uma alta divergência filogenética.

MARTINEZ (2003) estudou as cepas QG1 e QG2 caracterizando-as histológica, molecular e morfológicamente. Quanto a avaliação morfológica incluiu análise biométrica da forma tripomastigota sanguínea, comparando-a com a cepa Y do *T. cruzi*.

Como se pode constatar, a caracterização morfológica e biológica do *T. cruzi* é de real importância e tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores, entre os quais DIAS e FREITAS FILHO (1943), BELDA NETO (1974), SILVA (1959), BRENER (1969), BARATA (1988), ANDRADE (1997), ZINGALES (1998).

Verificou-se que apesar da evolução do conhecimento desse parasito desde CHAGAS (1909), ainda não foram definidos parâmetros numéricos de modo a caracterizar as formas finas, largas e intermediárias de epimastigotas e tripomastigotas, que é o objeto deste estudo.

2 OBJETIVOS

- Mensurar e classificar formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y provenientes de camundongos Swiss infectados.
- Mensurar e classificar formas epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y obtidas de meio de cultura LIT.
- Mensurar e classificar formas epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y obtidas de fezes de triatomíneo.
- Determinar os padrões numéricos para caracterizar as formas tripomastigotas sanguíneas quanto à largura em finas, intermediárias e largas, bem como epimastigotas de meio de cultura LIT e de fezes de triatomíneo de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, por meio de estatística descritiva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com o intuito de mensurar as distâncias da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), do meio do núcleo à extremidade anterior do corpo (NA), comprimento do flagelo livre (FL), comprimento total (T), largura (L), Área do Cinetoplasto (AC), Área do Núcleo (AN), Índice Nuclear (IN) das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, segundo parâmetros definidos por DIAS, FREITAS FILHO (1943) e BARRETO (1965), adotou-se os seguintes procedimentos:

3.1 Caracterização das cepas utilizadas

Foram mensuradas as seguintes cepas de *T. cruzi*: Bolívia, QM2, S.I.9 e Y. As cepas são mantidas em camundongos Swiss, por inoculação subcutânea, em repiques quinzenais, no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP-Campus de Araraquara.

- **Cepa Bolívia**

A cepa Bolívia foi isolada de fezes de *Triatoma infestans*, proveniente de Vitichi – Bolívia (FUNAYAMA e PRADO JÚNIOR, 1974). As características morfológicas dessa cepa são: predominância de formas largas, membrana ondulante com poucas ondulações, flagelo relativamente curto. Como características biológicas apresentam alta patogenicidade e virulência para camundongos brancos e jovens, com período pré-patente variando entre 2 e 5 dias, níveis parasitêmicos elevados, com picos variáveis entre o 12º e 33º dia após a inoculação, precocidade de parasitemia máxima e elevada taxa de letalidade. Caracterizada como Zimodema 1, linhagem 2, *T. cruzi* I MILES (1988), SOUTO (1996) & SATELLITE MEETING (1999).

- **Cepa QM2**

A cepa QM2, isolada por ROSA et al (2003), a partir de fezes de *Triatoma rubrovaria*, provenientes do município de Quaraí, bairro Macarrão, Estado do Rio Grande do Sul, caracterizada por MARTINS (2005). Apresenta parasitemia patente entre o 3º e 7º dia pós infecção, pico parasitêmico entre o 17º e 19º dia com morte dos animais, porcentual de mortalidade de 80% no pico e predomínio de formas largas, classificação fenotípica : tipo II , tropismo tissular pelo músculo esquelético, cardíaco e fígado. Classificada como Zimodema 1, linhagem 2, *T. cruzi* I MILES (1988), SOUTO (1996) & SATELLITE MEETING (1999).

- **Cepas S.I.9**

A cepa S.I.9 foi coletada e isolada por ROSA et al (2004), de fezes de ninfas e adultos de *Triatoma sordida*, capturados no distrito de Santo Inácio, Bahia. O conteúdo intestinal dos triatomíneos infectados foi inoculado intraperitonealmente em camundongos. Alguns parâmetros morfológicos, biológicos e moleculares estão sendo avaliados.

- **Cepa Y**

A Cepa Y, foi isolada de um caso humano de doença de Chagas por meio de xenodiagnóstico, por FREITAS (1950) e caracterizada por SILVA E NUSSENZWEIG (1953). Apresenta elevado porcentual de mortalidade e período pré-patente de 1 a 8 dias, na dependência do número de flagelados inoculados e da idade do camundongo. A mortalidade é de 94,9%, e o tempo de sobrevivência dos animais é de 8 a 21 dias. Observa-se edema e paralisia nos membros dos animais inoculados. De acordo com ANDRADE (1974) a cepa Y classifica-se como Tipo I, pela rápida multiplicação, altos e curtos picos de parasitemia e mortalidade, predominância de formas finas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção.

A caracterização da cepa Y é Zimodema 2b, linhagem 1, *T. cruzi* II MILES (1988), SOUTO (1996) & SATELLITE MEETING (1999).

3.2 Estabelecimento das curvas parasitêmicas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Utilizou-se camundongos Swiss, machos, com idade compreendida entre 23 - 25 dias, pesando ao redor de 20g. Para cada cepa utilizou-se 5 camundongos e cada grupo foi inoculado com 2×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 2×10^3 tripomastigotas/mL das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de *T. cruzi*, respectivamente (Figura 01).

As curvas foram estabelecidas de modo há saber o dia em que ocorre o pico parasitêmico, pois se estabeleceu mensurar as formas tripomastigotas de cada uma das quatro cepas de *T. cruzi* em três momentos: período anterior ao pico, pico parasitêmico e período posterior ao pico.

Foram realizados vários experimentos para obtenção da curva parasitêmica em camundongo para cada cepa, as contagens das formas tripomastigotas foram feitas de acordo com o método de BRENER, 1962 (BELDA NETO, 1973; ANDRADE, 1974), com correção dos intercâmbios (MARTINS, 1999), de tal forma que foram colocados 5 μ L de sangue da cauda de camundongo infectado em lâmina de 25 x 76mm, recoberta com lamínula de 22x22mm. A mesma foi examinada em microscópio óptico comum Carl Zeiss Jena, Jenamed com objetiva de 40X e ocular de 10X, contando-se as formas em 20 campos em cada um dos

quatro cantos da lamínula e 20 campos em sua parte central, totalizando 100 campos microscópicos. A superfície da lamínula corresponde a 1555 campos microscópicos, então o número de formas encontrado no exame de 100 campos multiplicado pelo fator 15,55 é o número de tripanossomos contidos em 5 μ L.

No início dos experimentos, as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y foram semeadas e mantidas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose), em estufa à 28°C e repicadas quinzenalmente. Na fase final logarítmica, isto é 15 dias após o repique, foram retirados para inóculo 0,2 mL com 3×10^8 parasitas/mL e inoculados em camundongos Swiss machos e jovens com peso corpóreo médio entre 17 e 20g, com idade de 23 a 25 dias, obtidos junto ao Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, SP. Após duas passagens em camundongos separados em 4 grupos de 3 com as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de *T. cruzi*, foram infectados 20 animais separados em 4 grupos de 5 com 2×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 2×10^3 tripomastigotas/mL para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, respectivamente (Figura 01). As leituras foram feitas nos seguintes dias: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 e a contagem de tripomastigotas foi realizada segundo o método de BRENER (1962), com correção de intercampos (MARTINS, 1999), sendo o resultado expresso em números de tripomastigotas/mL. Entre os dias 2 a 4 anteriores ao pico parasitêmico, no dia do pico parasitêmico e 2 a 4 dias posteriores a este, para cada amostra de *T. cruzi* em estudo, foi feito o corte de cauda do animal, para 4 camundongos, com preparo de 4 a 6 lâminas por camundongo, coradas por Giemsa segundo Rosenfeld (1947), conforme demonstrado na Figura 02.

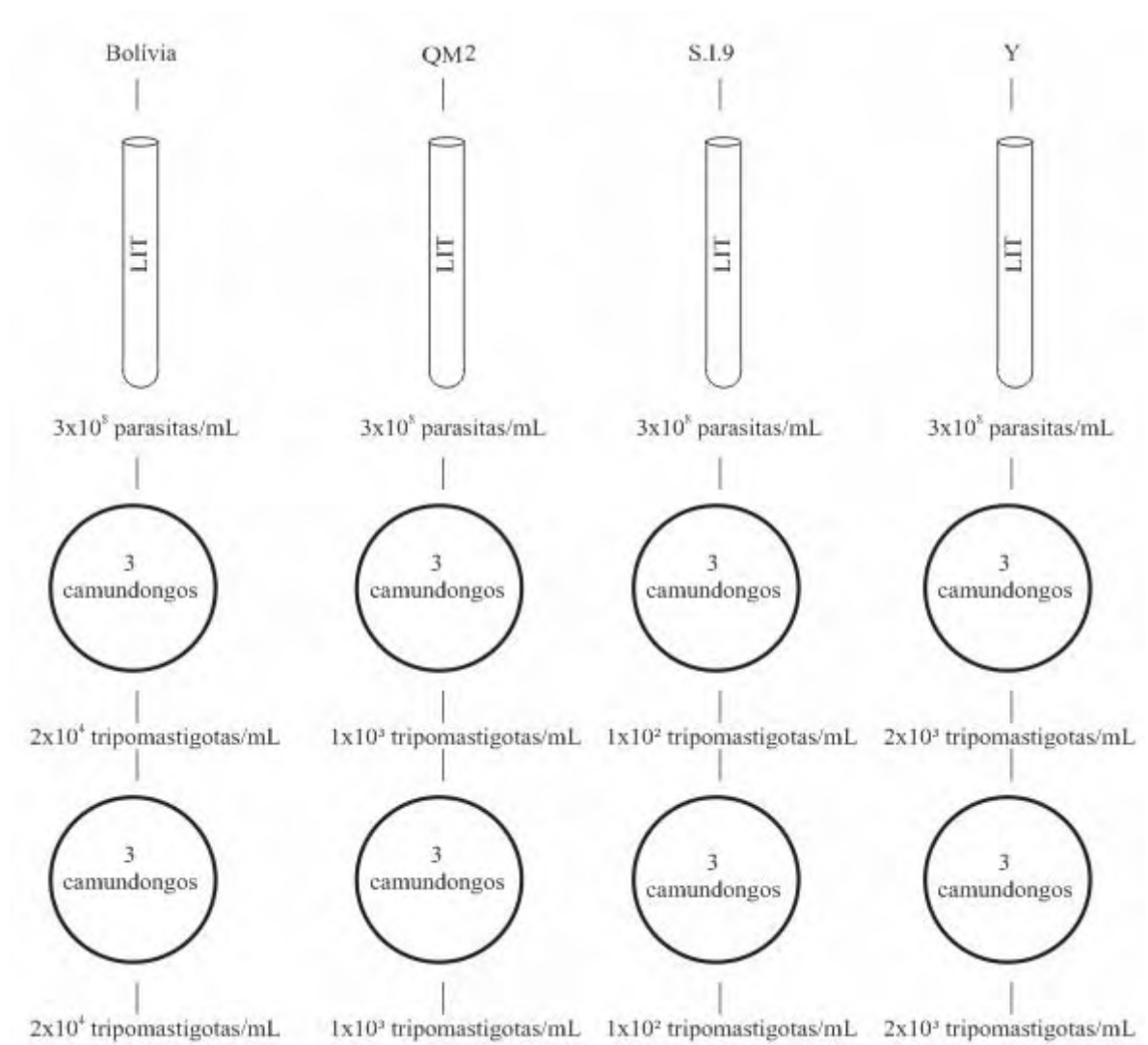


Figura 01. Obtenção de inóculo para estabelecimento das curvas parasitêmicas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de *T. cruzi*.

3.3 Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas destinadas à aferição de tamanho.

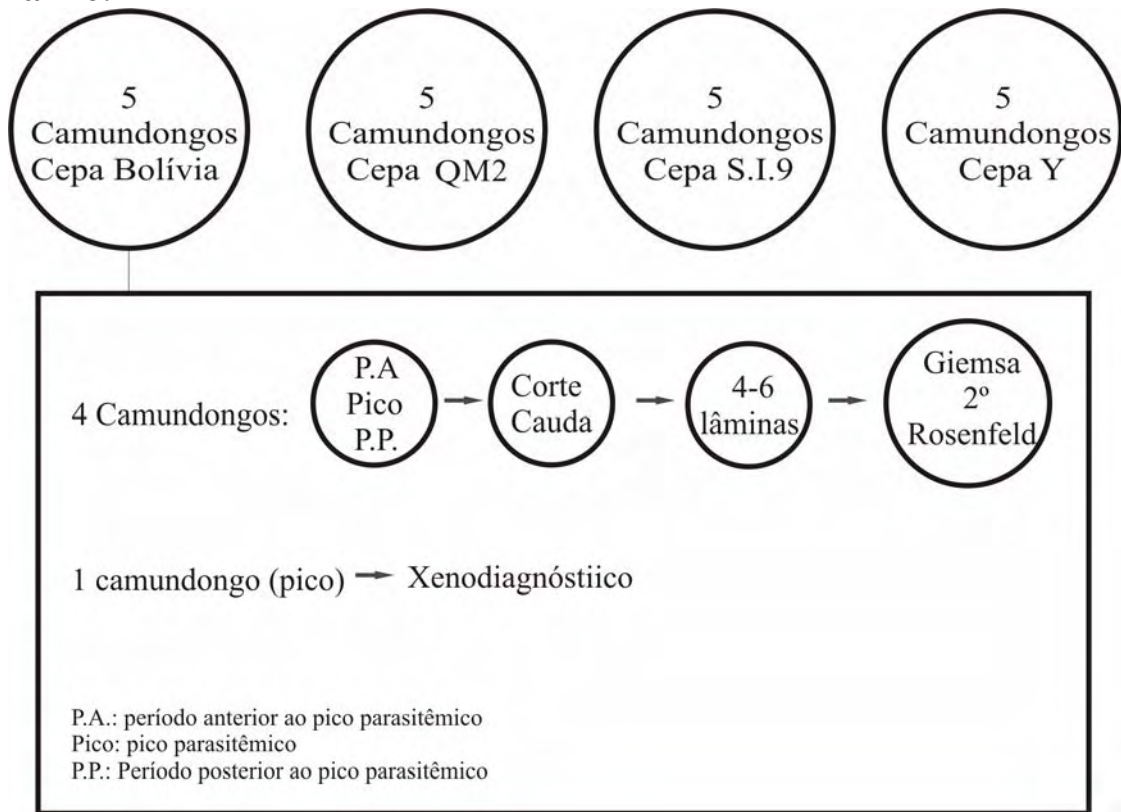


Figura 02. Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

3.4 Obtenção de formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y em meio de cultura LIT.

Para obtenção das formas epimastigotas, foi utilizado meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose), proposto por CAMARGO (1964) com a seguinte formulação:

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O.....	8,0g
NaCl	4,0g
KCl.....	0,4g
Glucose.....	2,0g
Tryptose.....	5,0 g
Caldo de infuso de fígado.....	5,0g
Hemina.....	25mg/20mL TrisBase.. 0,1N
Soro fetal bovino.....	100mL
Água Milli Q.....qsp.....	1.000 mL

Dissolver as substâncias, sob agitação, em aproximadamente 850 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,2 – 7,5 com HCl, adicionar o soro fetal bovino, completar o volume para 1.000mL e inativar todo o meio a 68°C por 60 minutos. Esfriar. Filtrar em membrana 0,22µm (500 mL Filter System – Coming 430769 0,22µm CA).

O meio deve ser distribuído em frascos estéreis e mantido a 4°C (caso seja usado dentro de duas semanas) ou congelados a -20°C por vários meses. Para o uso, mantê-lo a 28°C.

Inoculação e crescimento:

Foram inoculados $7,5 \times 10^6$ parasitas/mL em erlenmeyer com 50 mL de meio LIT. Durante os primeiros quatro dias de cultivo ocorre a fase logarítmica da multiplicação ou crescimento celular, em que predominam maciçamente formas epimastigotas, sendo muito rara a presença de formas tripomastigotas (ARAUJO et al, 2000).

As formas epimastigotas utilizadas para mensuração foram coletadas do meio de cultura, quando ocorreu o platô de crescimento. Dessa forma, o frasco contendo o meio de cultura foi levado para uma câmara de fluxo laminar, posteriormente coletou-se três mL que foram centrifugados a 1000 rpm por cinco minutos, do sedimento coletou-se quatro gotas que foram colocadas em lâmina em câmara de suta, fixadas com álcool metílico e coradas por Giemsa segundo Rosenfeld (1947), conforme Figura 03 demonstrada abaixo:

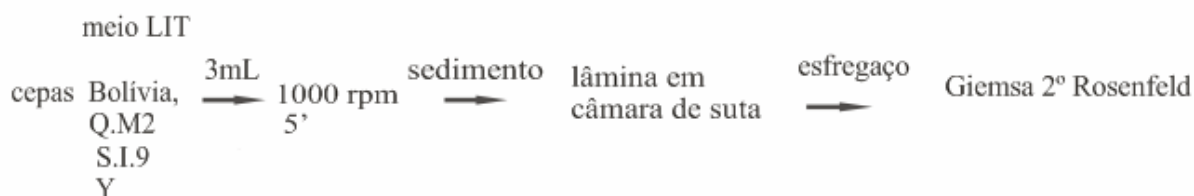


Figura 03. Obtenção de formas epimastigotas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y em meio de cultura LIT.

3.5 Obtenção de formas epimastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de fezes de triatomíneo.

Quando a parasitemia do camundongo Swiss infectado se tornou elevada, um dos animais foi anestesiado com tribromoetanol a 2,5% e contido com a finalidade de servir como fonte de infecção. 10 ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans* e 10 ninfas de 4º estágio de *Rhodnius negletus*, foram deixadas alimentar por 15 a 20 minutos. Terminado o prazo da hematofagia, o camundongo foi morto com overdose anestésica. As ninfas foram obtidas junto ao Insetário da Faculdade de Saúde Pública, localizado no SESA (Serviço Especial de Saúde de Araraquara). Após 15 dias as fezes desses triatomíneos foram coletadas e, na

presença de formas epimastigotas de *T. cruzi*, centrifugadas a 1000 rpm por cinco minutos, o sedimento foi colocado em lâmina em câmara de suta, fixadas por álcool metílico e coradas por Giemsa segundo Rosenfeld (1947), conforme esquema abaixo (Figura 04):

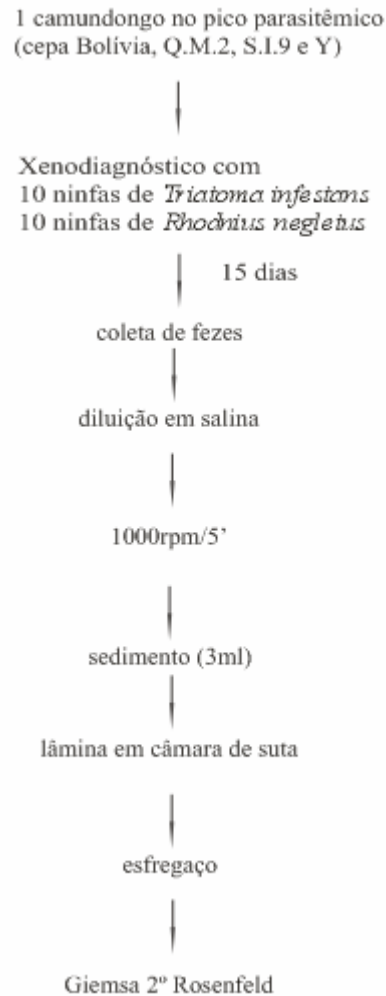


Figura 04. Obtenção de formas epimastigotas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de fezes de triatomíneo.

3.6 Fixação e coloração das formas epimastigotas e tripomastigotas *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

- **Materiais:** Lâminas, lâminas extensoras, pipeta automática, ponteiras, lápis, etiquetas, suporte para lâminas, suporte para coloração, provetas, funis, papel de filtro, óleo de imersão.
- **Reagentes:**
Corante de Giemsa (Azur Eosina Azul de Metileno Segundo Giemsa),
Metanol (álcool metílico) e Água destilada

- **Preparo de Reagentes e Soluções:**

Corante Giemsa segundo Rosenfeld

Giemsa (pó).....	0,97g
May-Grunwald.....	0,53g
Metanol P.A.....	1000mL
Acondicionar em frasco âmbar . Validade: 5 anos.	

- **Procedimento:**

Limpar a lâmina com gaze seca (lâmina lavada e desengordurada).

Com pipeta automática aplicar uma gota de sangue (5µL), na extremidade de uma lâmina e com lâmina extensora arrastar essa gota para trás até que o rebordo da lâmina seja preenchido. Em seguida impelir a lâmina extensora para frente em um ângulo de aproximadamente 45°, em um só movimento firme e uniforme, sem separar uma lâmina da outra, até que o sangue fique perfeitamente distribuído na lâmina. Esperar secar, fixar com álcool metílico e identificar a lâmina.

- **Coloração dos esfregaços:**

Procedimento:

- Colocar a lâmina com o esfregaço sobre o suporte para coloração.
- Cobrir a lâmina com 1 mL do corante Giemsa segundo Rosenfeld.
- Esperar cinco minutos.
- Colocar sobre o corante 2 mL de água destilada previamente fervida, tomando o cuidado de não deixar cair o corante. Homogeneizar, tombando ligeiramente o suporte de coloração. Esperar dez minutos.
- Desprezar o corante e a água destilada.
- Lavar a lâmina com água corrente.
- Limpar o verso da lâmina com uma gaze.
- Colocar a lâmina no suporte para secar.

- **Equipamento:**

As lâminas coradas foram observadas microscópio óptico comum Carl Zeiss Jena, Jena med com óleo de imersão para avaliação qualitativa das formas encontradas.

3.7 Mensuração das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

As mensurações foram feitas nas formas epimastigotas obtidas de meio de cultura LIT, formas epimastigotas obtidas de fezes de triatomíneos e formas tripomastigotas sanguíneas (obtidas de sangue de camundongo infectado), que foram previamente fixadas com álcool metílico e coradas pelo método de Giemsa segundo Rosenfeld. Essas lâminas foram examinadas em microscópio Leitz DMRXE com objetiva de imersão com aumento 100x e ocular 10x/25.

Nº de formas analisadas	
Tripomastigotas	120
Epimastigotas de meio LIT	120
Epimastigotas de triatomíneo	120

Tabela 01. Obtenção do número de formas tripomastigotas analisadas em cada período (PA, P e PP), e formas epimastigotas analisadas em LIT e triatomíneo com as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Foram capturadas imagens de 120 formas obtidas de quatro lâminas por cepa para formas epimastigotas de *T. cruzi* oriundas de meio de cultura LIT e para formas epimastigotas coletadas de fezes de triatomíneo. Mensurou-se 120 formas de tripomastigotas obtidas de sangue de camundongo em cada um dos períodos estabelecidos: anterior ao pico parasitêmico, no pico parasitêmico e posterior ao pico parasitêmico (Tabela 01). A mensuração foi realizada em analisador de imagem computadorizado Leica Qwin, utilizando o software LEICA LIDA (Leica Image Database and Archive System).

De cada uma das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* mensurou-se os seguintes parâmetros definidos por DIAS e FREITAS FILHO (1943) e BARRETO (1965), que descreve-se abaixo:

- distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN);
- distância da extremidade anterior ao meio do núcleo (NA);
- comprimento do flagelo livre (FL);
- comprimento total ($T=PN+NA+FL$);
- largura do corpo (L);
- Índice Nuclear ($IN=PN/NA$).

3.8 Análise Estatística

Após as mensurações das larguras, comprimentos, áreas dos cinetoplastos, áreas dos núcleos, índices nucleares de cada uma das formas obtidas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y foram construídas distribuições de frequências conjuntas para cada categoria, ou seja,

- a) tripomastigotas no período anterior ao pico parasitêmico,
- b) tripomastigotas no período do pico parasitêmico,
- c) tripomastigotas no período posterior ao pico parasitêmico,
- d) epimastigotas em meio de cultura LIT,
- e) epimastigotas em fezes de triatomíneo.

O agrupamento das medidas, dentro de cada categoria, foi realizado por meio de quartis utilizando o programa Microsoft Excel 2002. De acordo com esse procedimento o 1° e o 4° quartis englobam, respectivamente, os primeiros e os últimos 25% do total das medidas. No intervalo entre estes extremos ficam os 50% restantes (formas intermediárias).

4 RESULTADOS

4.1 Estudo morfológico de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

A observação das lâminas coradas pelo método de Giemsa segundo Rosenfeld para mensuração das formas tripomastigotas das cepas Bolívia, QM2 e Y de *T. cruzi* permitiu obter imagens das formas finas, intermediárias e largas, que são mostradas nas figuras 05, 06 e 07.

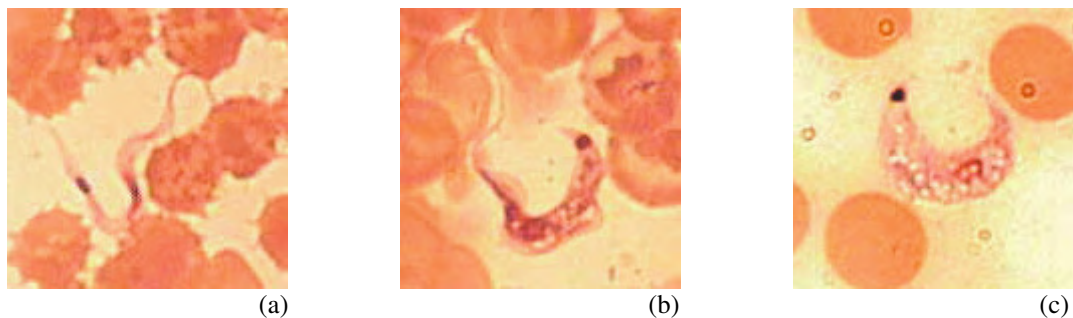


Figura 05. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia: (a) forma fina, (b) forma intermediária e (c) forma larga.



Figura 06. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa QM2: (d) forma fina, (e) forma intermediária e (f) forma larga.

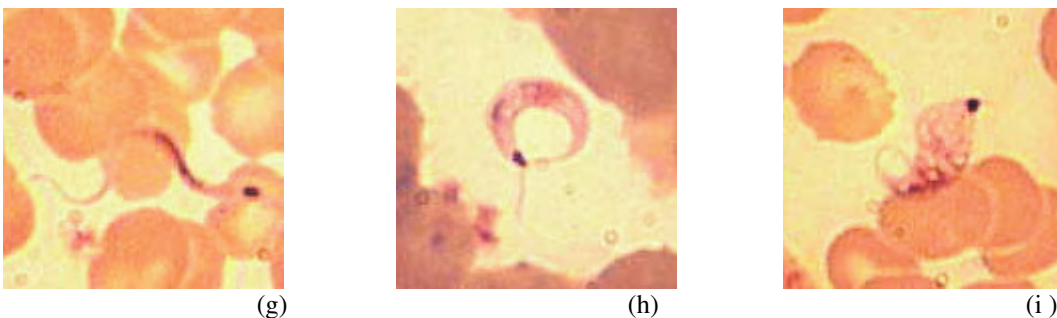


Figura 07. Fotomicrografias das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y: (g) forma fina, (h) forma intermediária e (i) forma larga.

4.2 Estudo morfológico de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

As formas epimastigotas da cepa S.I.9 de *T. cruzi* obtidas de meio de cultura LIT e coradas pelo método de Giemsa segundo Rosenfeld permitiu observar a variabilidade de posição do cinetoplasto, que é mostrada na Figura 08.

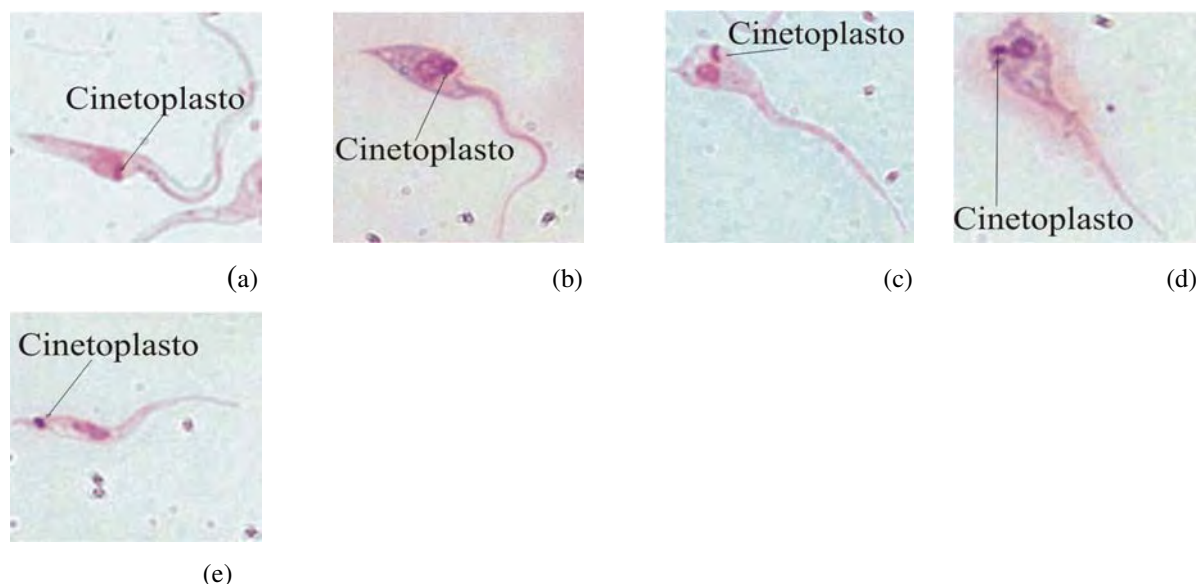


Figura 08. Diversidade de posições do cinetoplasto em formas epimastigotas da cepa S.I.9 de *T. cruzi* (a, b, c e d), comparativamente à forma tripomastigota (e).

4.3 Mensuração das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

As curvas parasitêmicas tiveram picos parasitêmicos como segue: de 8×10^5 tripomastigotas/mL no 14º dia para a cepa Bolívia, diante desse resultado padronizou-se coletar sangue do camundongo infectado nos dias 11º para dia anterior ao pico parasitêmico e 17º para o dia posterior ao pico; a cepa QM2 teve pico parasitêmico com 7×10^5 tripomastigotas/mL no 14º dia, padronizou-se coletar sangue do camundongo infectado nos dias 12º para o período anterior ao pico e 16º para o dia posterior ao pico; a cepa S.I.9 teve seu pico parasitêmico no 25º dia com 4×10^2 tripomastigotas/mL, padronizou-se coletar sangue do camundongo infectado nos dias 23º para o período anterior ao pico parasitêmico e 27º para o dia posterior ao pico; a cepa Y teve seu pico parasitêmico no 12º dia, com 4×10^5 tripomastigotas/mL, padronizou-se coletar sangue do camundongo infectado nos dias 8º para o dia anterior ao pico e 16º para o dia posterior ao mesmo (Figura 09 e Tabela 02).

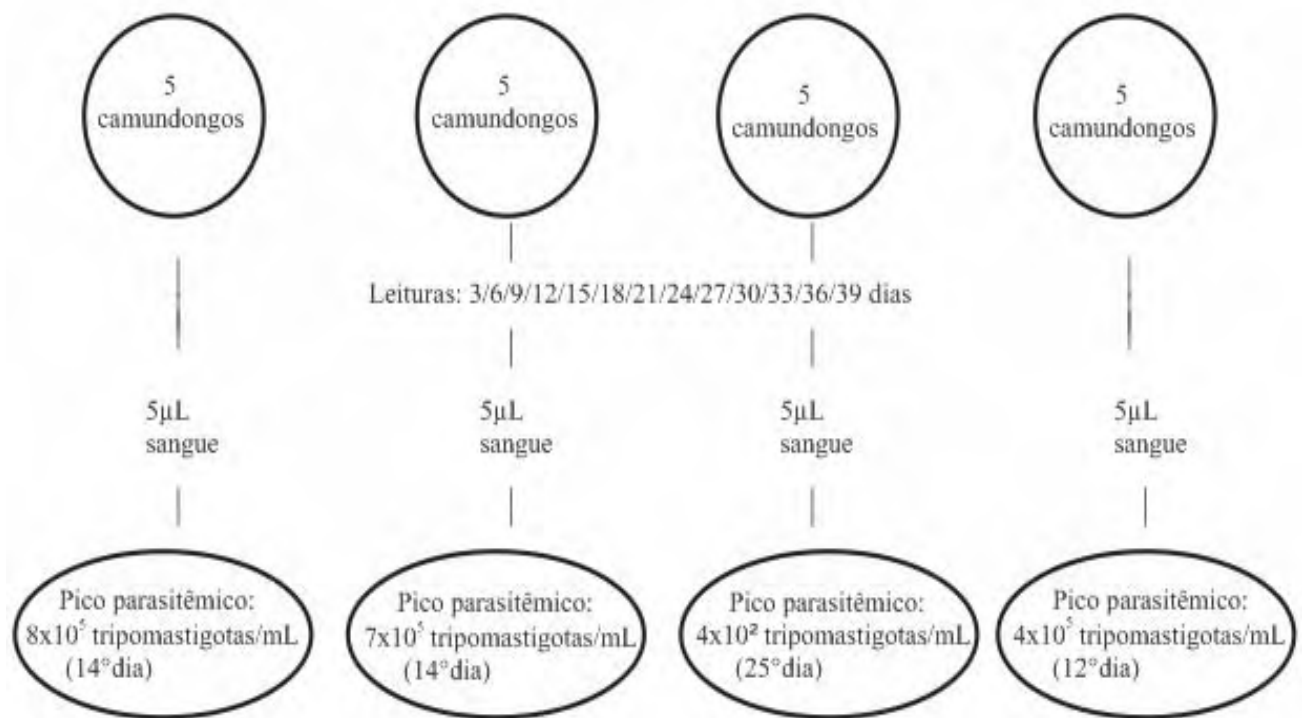


Figura 09. Estabelecimento das curvas parasitêmicas das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y de *T. cruzi*.

Os dias do experimento foram os seguintes:

	Dias após o inóculo		
Cepa Bolívia	11º	14º	17º
Cepa QM2	12º	14º	16º
Cepa S.I.9	23º	25º	27º
Cepa Y	8º	12º	16º

Tabela 02. Dias estabelecidos para cada cepa de *T. cruzi* baseados nas curvas parasitêmicas obtidas de camundongos Swiss infectados com as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Para a cepa S.I.9 não foi possível capturar e mensurar as formas tripomastigotas sanguíneas nos períodos anterior e posterior ao pico parasitêmico devido à baixa parasitemia, que foi da ordem de 10^2 em todos os experimentos, então esta cepa foi analisada apenas no pico parasitêmico, isto é, com 120 formas tripomastigotas.

Como planejado, a execução dos experimentos foi realizada nos períodos anterior ao pico parasitêmico, pico parasitêmico e período posterior ao pico parasitêmico para as formas tripomastigotas sanguíneas, com exceção da cepa S.I.9. Os resultados dessas mensurações estão sumarizados nos Apêndices A, B e C. Na escolha dos intervalos de medidas, foi usado o critério de agrupamento de todas as mensurações, das cepas Bolívia, QM2 e Y, estabelecendo-se três intervalos: do valor mínimo ao 1º quartil, do 1º quartil ao 3º quartil e do 4º quartil ao valor máximo, estes intervalos estão sumarizados na Tabela 03 e se referem aos parâmetros área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (NA), largura (L), flagelo (FL), distância da extremidade anterior ao meio do núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), comprimento total (T), índice nuclear (IN).

Tabela 03. Resultados estatísticos em quartis das mensurações de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

	Mensuração	A.C. ¹	A.N. ²	L	FL	PN	NA	T	IN
25%	↕ Mínima	0,2	0,7	0,6	4,0	3,3	2,2	13,5	0,5
	↕ 1º quartil	0,7	2,1	1,4	7,2	6,8	4,4	19,6	1,1
50%	↕ Mediana	0,9	2,6	1,8	8,5	7,8	5,4	22,0	1,4
	↕ 3º quartil	1,1	3,1	2,1	10,3	8,7	6,6	24,7	1,8
25%	↕ Máxima	2,6	6,7	5,5	24,8	11,8	11,1	43,8	3,5

¹área do cinetoplasto, ²área do núcleo, L : largura, FL : flagelo, PN: distância da extremidade posterior ao meio do núcleo, N.A. : distância da extremidade anterior ao meio do núcleo, T: comprimento total = PN+NA+FL, IN: índice nuclear.

Os intervalos de medidas estabelecidos, quanto à largura para todas as cepas estudadas, situaram-se entre 0,6 a 1,3µm para as formas finas (quartil inferior), 1,4 a 2,1 µm para as formas intermediárias (interquartis), 2,2 a 5,5 µm para as formas largas (quartil superior) sumarizados na Tabela 03.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia estão sumarizados no Apêndice A.

As frequências de formas finas, intermediárias e largas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, foram determinadas no 11º, 14º e 17º dias, estão indicadas no Apêndice A e Figura 10:

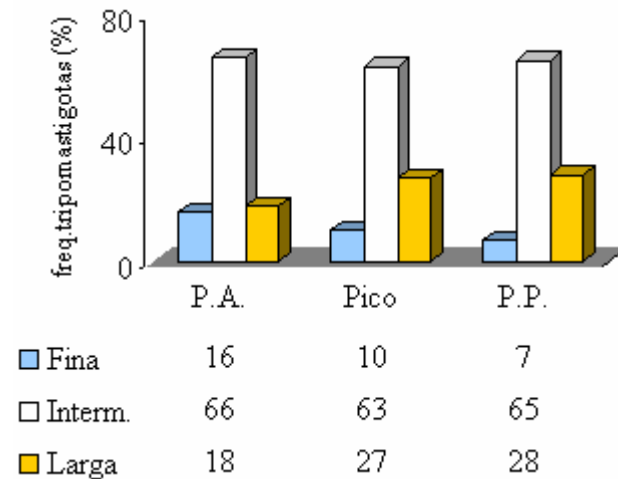


Figura 10. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

As frequências de formas finas, intermediárias e largas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa QM2, foram determinadas no 12º, 14º e 16º dias, estão indicadas no Apêndice B e Figura 11:

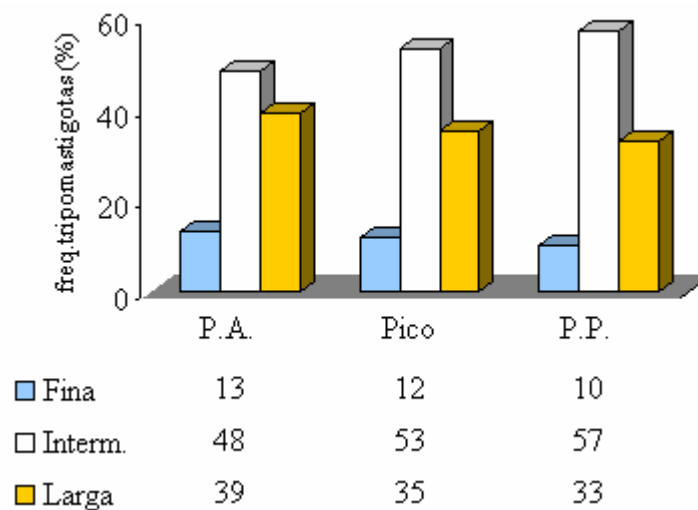


Figura 11. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

As frequências de formas finas, intermediárias e largas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y, foram determinadas no 8º, 12º e 16º dias, estão indicadas no Apêndice C e Figura 12:

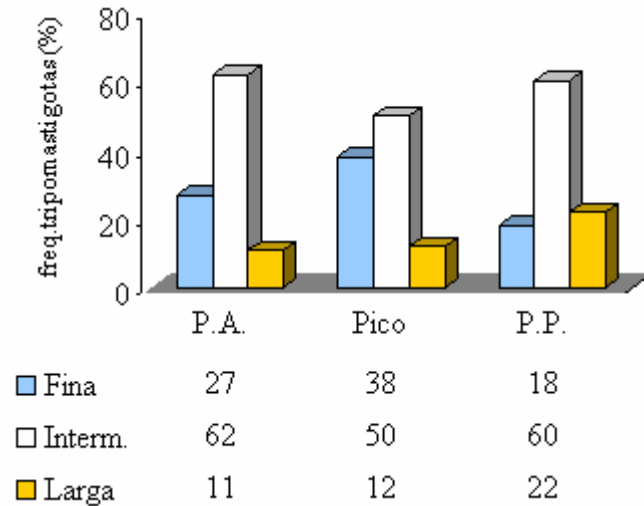


Figura 12. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Apesar das modificações observadas nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico quanto a largura, os dados foram reunidos num mesmo período para comparação entre as cepas.

As frequências de formas finas, intermediárias e largas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão representadas no Apêndice A, B, C e Figura 13:

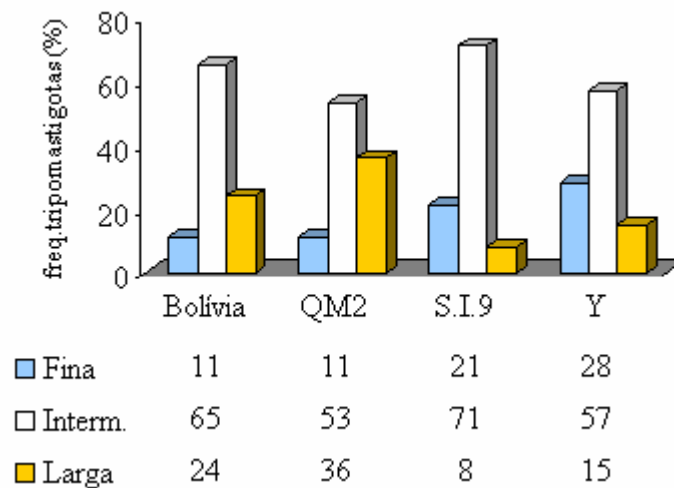


Figura 13. Frequência das mensurações de largura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Quanto ao comprimento total, as formas tripomastigotas mostraram os seguintes intervalos de medida: 13,5 a 19,5 μm para as formas curtas (quartil inferior), 19,6 a 24,7 μm para as formas intermediárias (interquartis) e 24,8 a 43,8 μm para as formas longas (quartil superior) parâmetros sumarizados na Tabela 03.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, quanto ao comprimento total estão apresentados na Figura 14 e Apêndice A. As frequências de formas curtas, intermediárias e longas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, foram determinadas no 11°, 14° e 17° dias e indicadas na figura abaixo:

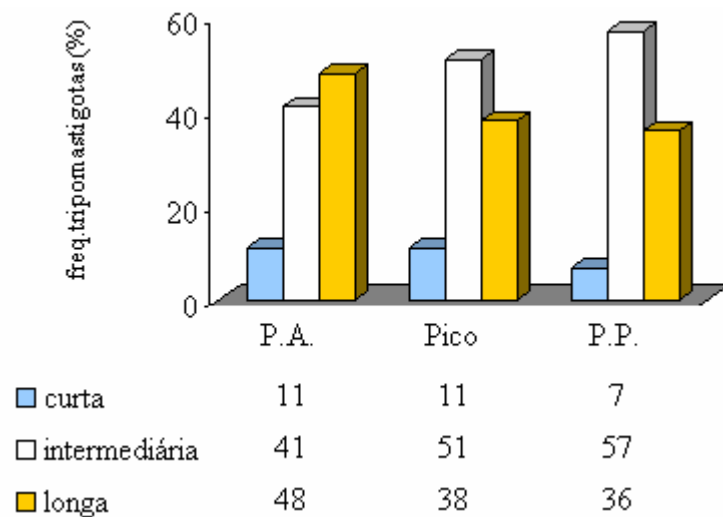


Figura 14. Frequência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, quanto ao comprimento total, apresentou os resultados das mensurações da Figura 15 e Apêndice B. As frequências de formas curtas, intermediárias e longas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa QM2, foram determinadas no 12°, 14° e 16° dias e demonstradas abaixo:

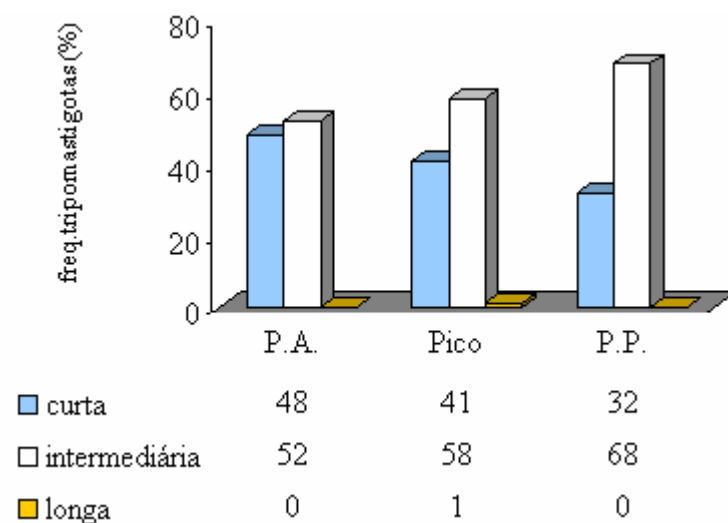


Figura 15. Frequência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* quanto ao comprimento total estão apresentados na Figura 16 e Apêndice C. As freqüências de formas curtas, intermediárias e longas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y, foram determinadas no 8º, 12º e 16º dias e indicadas abaixo:

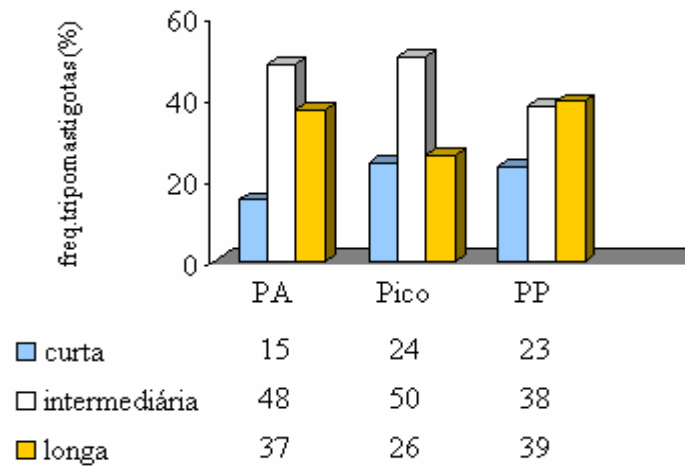


Figura 16. Freqüência das mensurações do comprimento total das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Apesar das modificações observadas nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico no que tange ao comprimento total das formas tripomastigotas sanguíneas, os dados foram reunidos num mesmo período para comparação entre as cepas.

As freqüências de formas curtas, intermediárias e longas de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão apresentados no Apêndice A, B, C e Figura 17:

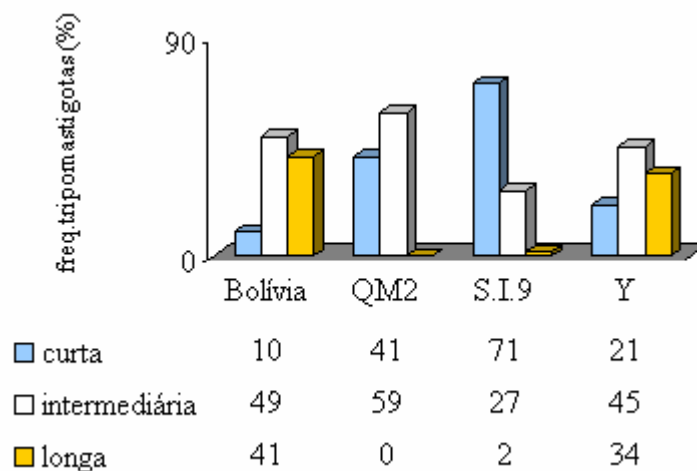


Figura 17. Freqüência das mensurações de comprimento total das formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Reunindo os dados dos três períodos parasitêmicos das cepas estudadas, incluindo a cepa S.I.9, cujos dados nestes períodos não foi possível obter devido a baixa parasitemia da mesma, a cepa que apresentou os maiores percentuais de comprimento total curto foi a S.I.9 (71% - Figura 17 - Apêndice B), a cepa QM2 apresentou os maiores percentuais de comprimento total intermediário (59% - Figura 17 – Apêndice B) e a cepa que apresentou maior percentual de comprimento total longo foi a cepa Bolívia (41% - Figura 17 – Apêndice A).

Os intervalos de medida escolhidos para as formas com comprimento do flagelo curto foram 4,0 a 7,1 μm (quartil inferior), para as formas com comprimento do flagelo intermediário foram 7,2 a 10,3 μm (interquartis), para as formas com comprimento do flagelo longo foram 10,4 a 24,8 μm (quartil superior), parâmetros sumarizados na Tabela 03.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia quanto ao comprimento do flagelo estão apresentados na Figura 18 e Apêndice A. As freqüências de flagelos curtos, intermediários e longos de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, foram determinadas no 11º, 14º e 17º dias e descritas abaixo:

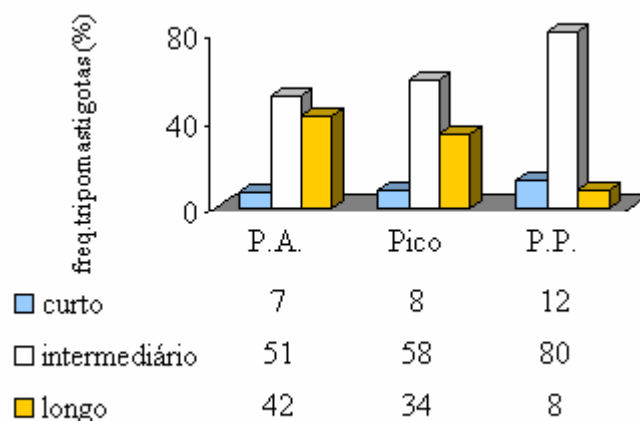


Figura 18. Freqüência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, quanto ao comprimento do flagelo, estão apresentados na Figura 19 e Apêndice B. As freqüências de flagelos curtos, intermediários e longos de formas

tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa QM2, foram determinadas no 12°, 14° e 16° dias e descritas abaixo:

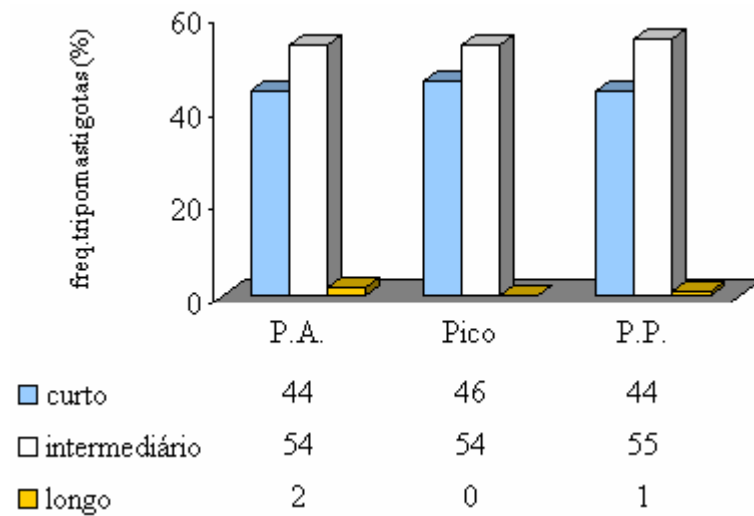


Figura 19. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, quanto ao comprimento do flagelo, estão apresentados na Figura 20 e Apêndice C. As frequências de flagelos curtos, intermediários e longos de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa Y, foram determinadas no 8°, 12° e 16° dias e descritas abaixo:

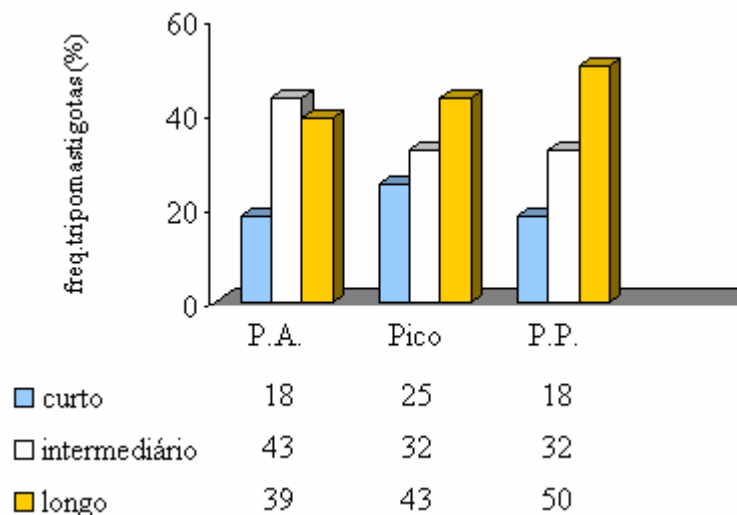


Figura 20. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Das três cepas estudadas, a Y foi a que mostrou maior percentual de flagelo longo: 50% no P.P., enquanto que QM2 apresentou em torno de 1% de flagelo longo (Figuras 20, 19, Apêndice C, B). Apesar de que nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico houve modificação no comprimento do flagelo, os dados foram reunidos num mesmo período para melhor compreensão das diferenças entre as cepas. As frequências de flagelos curtos, intermediários e longos de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão apresentados na Figura 21, Apêndice A, B, C e descritas abaixo:

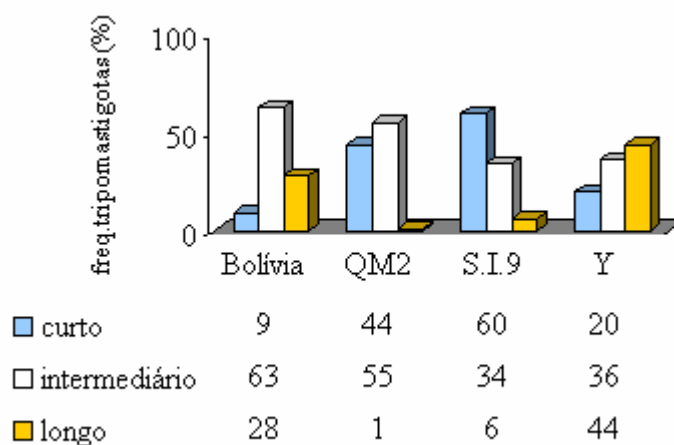


Figura 21. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Reunindo os dados dos três períodos parasitêmicos das cepas estudadas, incluindo a cepa S.I.9, as que apresentaram maiores percentuais de formas com flagelo curto foram as cepas QM2 e S.I.9 (44% e 60% - Figura 21, Apêndice B). As que apresentaram maiores percentuais de comprimento de flagelo longo foram as cepas Bolívia e Y (28% e 44% - Figura 21, Apêndice A,C), enquanto as cepas QM2 e S.I.9 apresentaram frequências muito baixas para esse parâmetro (1% e 6% - Figura 21, Apêndice B).

Os intervalos de medida estabelecidos, quanto à área do cinetoplasto, situaram-se entre 0,2 a 0,6 μm^2 para os cinetoplastos pequenos (quartil inferior), 0,7 a 1,1 μm^2 para os cinetoplastos intermediários (interquartil) e 1,2 a 2,6 μm^2 para os cinetoplastos grandes (quartil superior), parâmetros sumarizados na Tabela 03.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi* quanto à área do cinetoplasto estão apresentados na Figura 22 e Apêndice A. As frequências de cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes de formas

tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, foram determinadas no 11°, 14° e 17° dias e descritas abaixo:

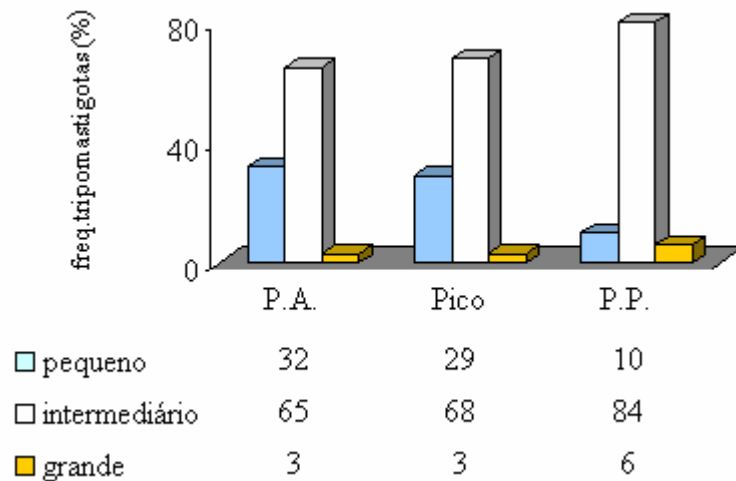


Figura 22. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, quanto à área do cinetoplasto estão apresentados na Figura 23 e Apêndice B. As frequências de cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa QM2, foram determinadas no 12°, 14° e 16° dias e descritas abaixo:

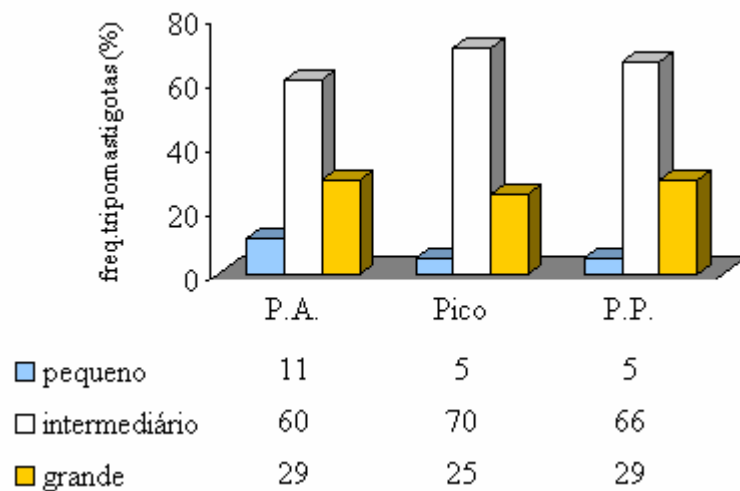


Figura 23. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, quanto à área do cinetoplasto estão apresentados na Figura 24 e Apêndice C. As frequências de cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y, foram determinadas no 8º, 12º e 16º dias e apresentadas abaixo:

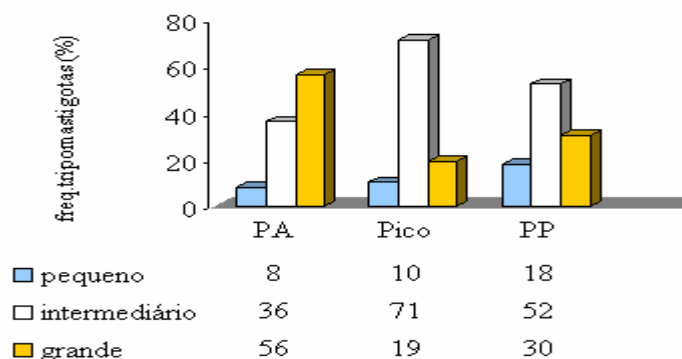


Figura 24. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os dados foram reunidos num mesmo período para cada cepa, apesar das modificações observadas nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico quanto à área do cinetoplasto, para melhor compreensão das diferenças entre as cepas. As frequências dos cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão apresentadas na Figura 25, Apêndice A, B, C e descritas abaixo:

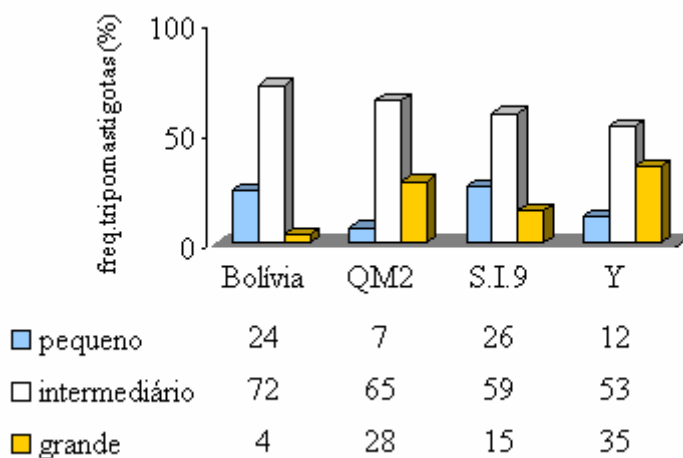


Figura 25. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Os intervalos de medida escolhidos para os núcleos pequenos, intermediários e grandes para as cepas estudadas foram 0,7 a 2,0 μm^2 (quartil inferior), 2,1 a 3,1 μm^2 (inter-quartis), 3,2 a 6,7 μm^2 (quartil superior) respectivamente (Tabela 03).

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Bolívia, quanto à área do núcleo estão apresentados na Figura 26 e Apêndice A. As frequências de núcleos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, foram determinadas no 11º, 14º e 17º dias e demonstradas abaixo:

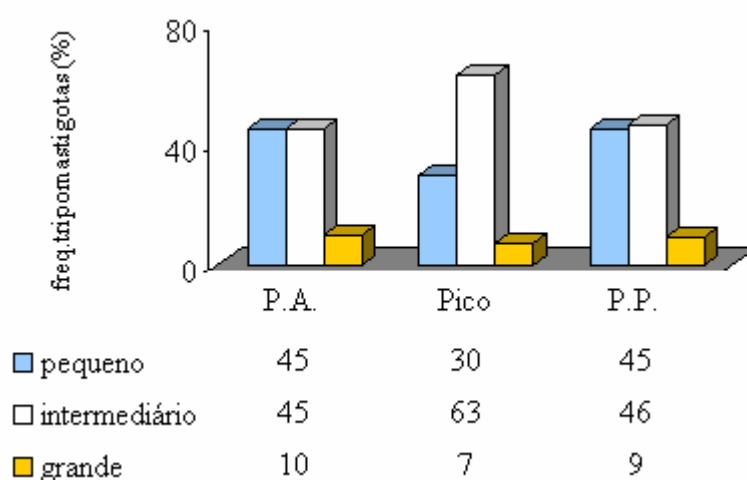


Figura 26. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa QM2, quanto à área do núcleo apresentou os resultados das mensurações representados na Figura 27 e Apêndice B. As frequências de núcleos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa QM2, foram determinadas no 12º, 14º e 16º dias e descritas abaixo:

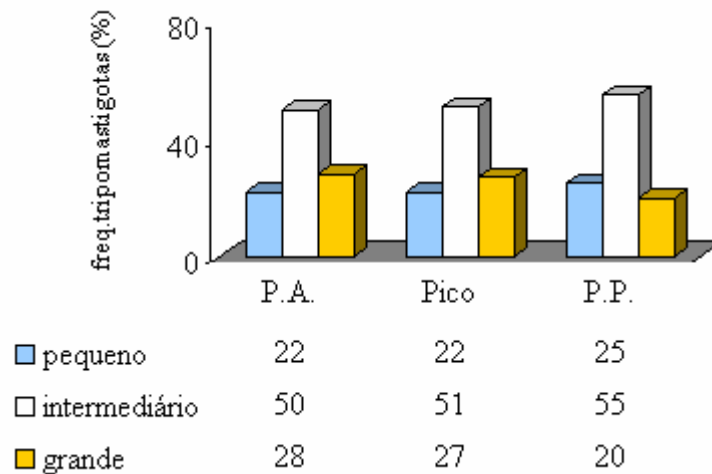


Figura 27. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, quanto à área do núcleo estão apresentados na Figura 28 e Apêndice C. As frequências de núcleos pequenos, intermediários e grandes de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa Y, foram determinadas no 8º, 12º e 16º dias e descritas abaixo:

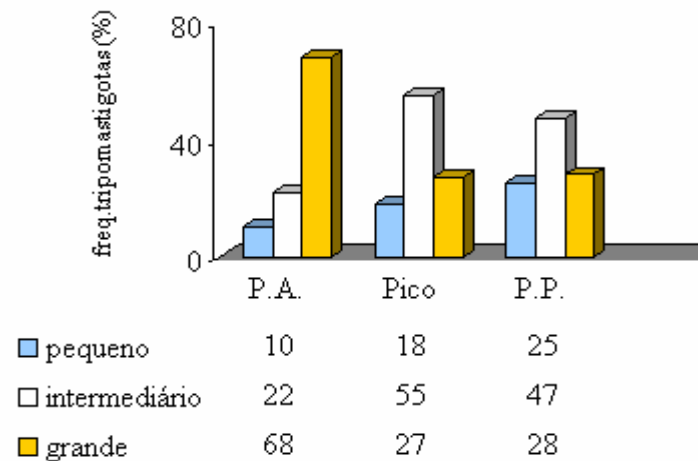


Figura 28. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações das formas tripomastigotas sanguíneas quanto à área do núcleo estão apresentados Figura 29 - Apêndice A, B e C. Observou-se que nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico houve modificação na área do

núcleo, mas para melhor compreensão entre as cepas e inclusão da cepa S.I.9 os dados foram reunidos num mesmo período. As frequências das áreas de núcleos pequenos, intermediários e grandes das formas tripomastigotas sanguíneas, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, foram as seguintes:

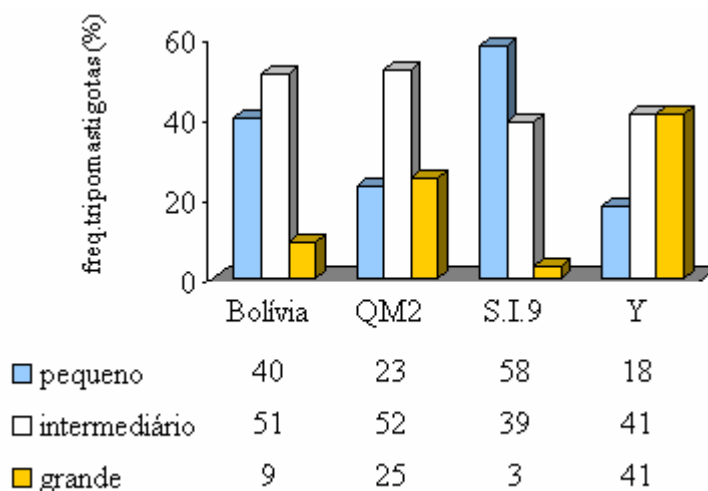


Figura 29. Frequência da área do núcleo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Das quatro cepas estudadas, a cepa S.I.9 apresentou o maior percentual de núcleos pequenos (58% - Figura 29, Apêndice B), a cepa QM2 apresentou os maiores percentuais de núcleos intermediários (52% - Figura 29, Apêndice B), enquanto a cepa Y apresentou os maiores percentuais de núcleos grandes (41% - Figura 29, Apêndice C).

Os intervalos de medida escolhidos para os índices nucleares baixos, intermediários e altos para as cepas em estudo foram 0,5 a 1,0 (quartil inferior), 1,1 a 1,8 (interquartis) e 1,9 a 3,5 (quartil superior) respectivamente (Tabela 03).

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi* quanto ao índice nuclear (IN) estão apresentados na Figura 30 e Apêndice A. As frequências de IN baixos, intermediários e altos de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, foram determinadas no 11º, 14º e 17º dias e descritas abaixo:

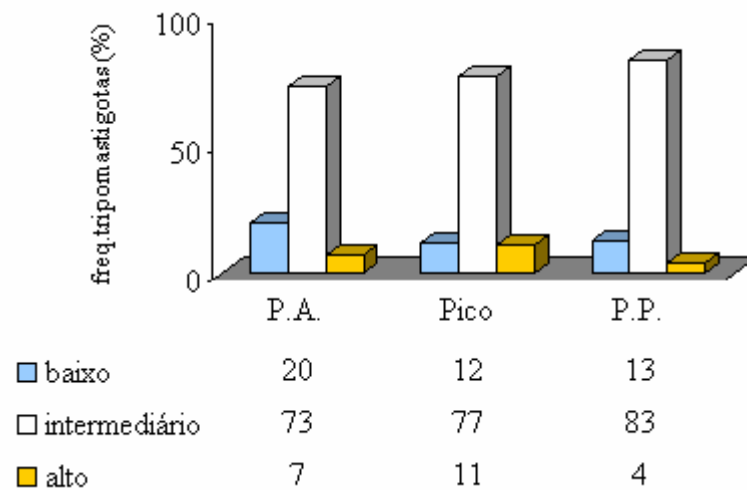


Figura 30. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Bolívia, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa QM2, quanto ao índice nuclear (IN) estão apresentados na Figura 31 e Apêndice B. As frequências de IN baixos, intermediários e altos de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, da cepa QM2, foram determinadas no 11º, 14º e 17º dias e descritas abaixo:

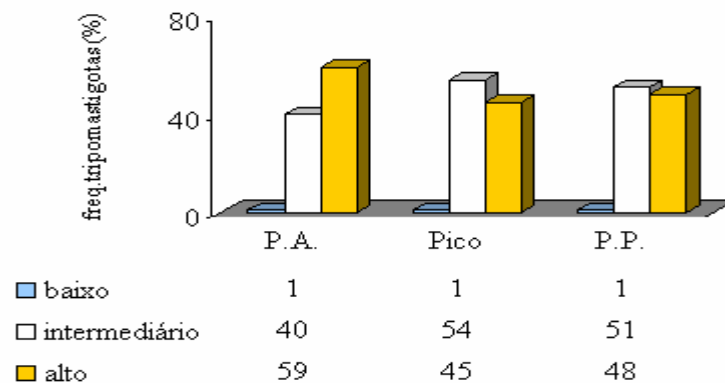


Figura 31. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa QM2, nos períodos anteriores ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações efetuadas para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, quanto ao índice nuclear (IN) estão apresentados na Figura 32 e Apêndice C. As frequências de IN baixos, intermediários e altos de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y, foram determinadas no 8º, 12º e 16º dias e descritas abaixo:

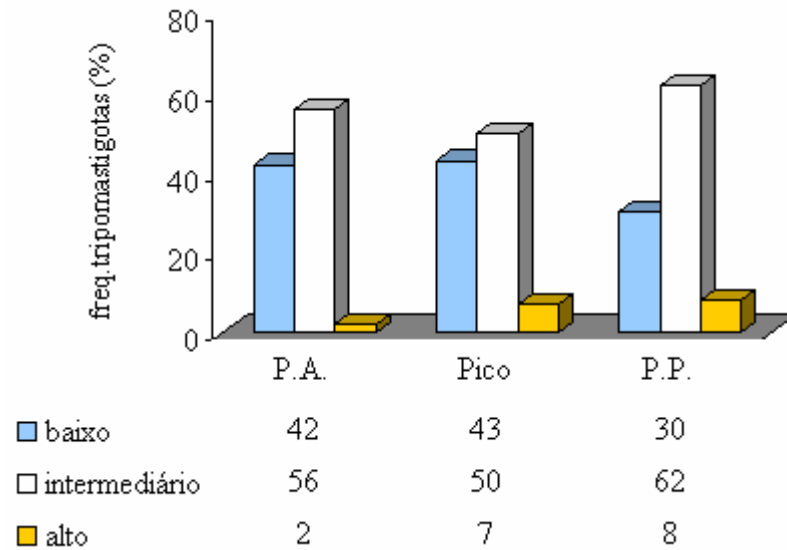


Figura 32. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico.

Os resultados das mensurações das formas tripomastigotas sanguíneas quanto ao índice nuclear (IN) estão apresentados na Figura 33 e Apêndice A, B e C. Apesar de que nos períodos anterior ao pico, pico parasitêmico e posterior ao pico houve modificação relevante no índice nuclear, os dados foram reunidos num mesmo período, para melhor comparação entre as cepas. As frequências de índice nuclear (IN) baixo, intermediário e alto para a cepa Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão descritas abaixo:

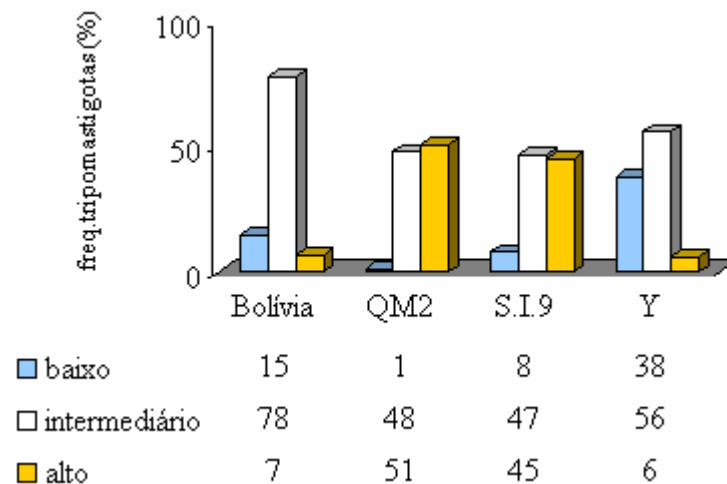


Figura 33. Frequência das mensurações do índice nuclear das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Conclui-se que a cepa Y além de apresentar predominância de formas finas (38% no P – Figura 12, Apêndice C) e longas (39% no PP - Figura 16, Apêndice C), também apresenta predominância de cinetoplastos grandes (35% - Figura 25, Apêndice C) e núcleos grandes (41% - Figura 29, Apêndice C). A cepa Bolívia apresentou predominância de

menores áreas para o cinetoplasto (32% no PA – Figura 22, Apêndice A) e núcleo (45% no PA - Figura 26, Apêndice A). Na cepa QM2 foi observada predominância de formas largas (39% no PA - Figura 11, Apêndice B) e curtas (48% no PA - Figura 15, Apêndice B).

4.4 Mensuração das formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de meio de cultura LIT.

As mensurações dessas formas estão expressas no Apêndice D.

Na escolha dos intervalos de medidas, foi usado o critério de agrupamento de todas as mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estabelecendo-se três intervalos: do valor mínimo ao 1º quartil, do 1º quartil ao 3º quartil e do 3º quartil ao valor máximo, estes intervalos estão sumarizados na Tabela 04 e se referem aos parâmetros: área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (AN), largura (L), flagelo (FL), distância da extremidade anterior ao meio do núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), comprimento total (T) e índice nuclear (IN).

Tabela 04. Resultados estatísticos em quartis das mensurações de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

	Mensuração	A.C. ¹	A.N. ²	L	FL	PN	NA	T	IN
25%	↕ Mínima	0,3	0,9	1,1	3,8	1,7	2,5	13,0	0,1
	↕ 1º quartil	0,6	1,7	1,8	8,1	4,4	7,7	23,3	0,4
50%	↕ Mediana	0,7	2,1	2,2	9,9	5,5	11,4	27,6	0,5
	↕ 3º quartil	0,9	2,9	2,8	11,9	7,1	14,8	31,3	0,8
25%	↕ Máxima	1,7	6,8	5,0	28,0	14,3	26,4	43,7	2,2

¹área do cinetoplasto, ²área do núcleo, L : largura, FL : flagelo, PN: distância da extremidade posterior ao meio do núcleo, N.A. : distância da extremidade anterior ao meio do núcleo, T: comprimento total = PN+NA+FL, IN: índice nuclear.

Os intervalos de medida escolhidos para a largura das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas finas foram 1,1 a 1,7 µm (quartil inferior), para as formas intermediárias foram 1,8 a 2,8 µm (interquartis) e para as formas largas foram 2,9 a 5,0 µm (quartil superior), sumarizados na Tabela 04.

As frequências de formas finas, intermediárias e largas de epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão representadas na Figura 34, Apêndice D e descritas abaixo:

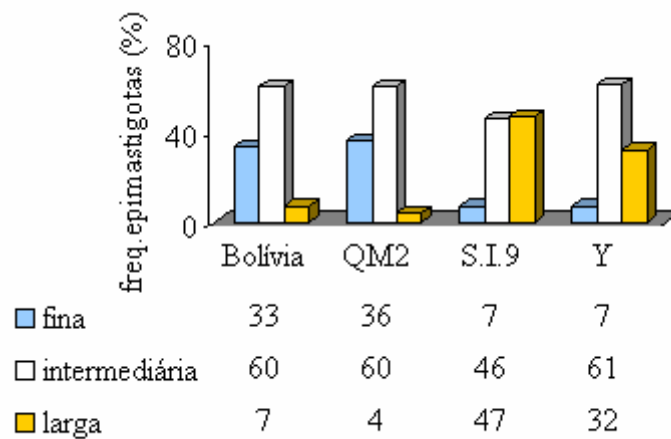


Figura 34. Frequência das mensurações de largura das formas epimastigotas de *T. cruzi*, em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Neste estudo, das quatro cepas estudadas, as que apresentaram maior percentual de formas finas foram as cepas Bolívia e QM2 (33% e 36% - Figura 34, Apêndice D); as cepas que apresentaram os maiores percentuais de formas intermediárias foram as cepas Bolívia, QM2 e Y (60%, 60%, 61% - Figura 34, Apêndice D), as que apresentaram maior percentual para formas largas foram as cepas S.I.9 e Y (47% e 32% - Figura 34, Apêndice D).

Os intervalos de medida escolhidos para o comprimento total das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas curtas foram 13,0 a 23,2 μm (quartil inferior), para as formas intermediárias foram 23,3 a 31,3 μm (interquartis) e para as formas largas foram 31,4 a 43,7 μm (quartil superior), estes intervalos estão sumarizados na Tabela 04.

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao comprimento total, estão apresentados na Figura 35 e Apêndice D. As frequências de formas curtas, intermediárias e longas de epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

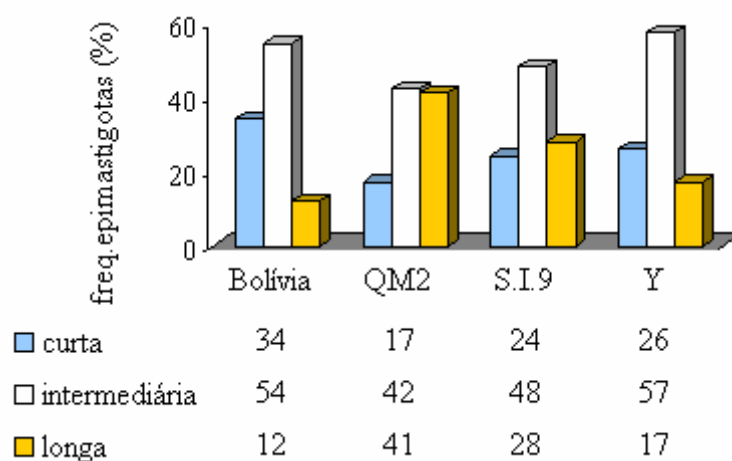


Figura 35. Frequência das mensurações de comprimento total das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa que apresentou maior percentual da forma curta foi cepa Bolívia (34% - Figura 35, Apêndice D); a cepa que apresentou maior percentual da forma intermediária foi a cepa Y (57% - Figura 35, Apêndice D) enquanto que a cepa que apresentou maior percentual da forma longa foi a cepa QM2 (41% - Figura 35, Apêndice D).

Os intervalos de medida escolhidos para o comprimento do flagelo das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas com flagelos curtos foram 3,8 a 8,0 μm (quartil inferior), para as formas com flagelos intermediários foram 8,1 a 11,9 μm (interquartis) e para as formas com flagelos longos foram 12,0 a 28,0 μm (quartil superior) sumarizados na Tabela 04. Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao comprimento do flagelo, estão apresentados na Figura 36 e Apêndice D. As frequências de formas com flagelos curtos, intermediários e longos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

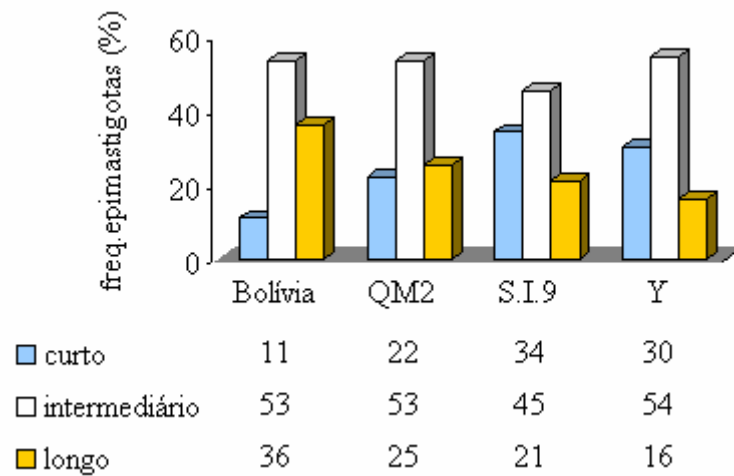


Figura 36. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa que apresentou o maior percentual de comprimento do flagelo curto foi a cepa S.I.9 (34% - Figura 36, Apêndice D); a cepa que apresentou o maior percentual de comprimento do flagelo intermediário foi a cepa Y (54% - Figura 36, Apêndice D); a cepa que apresentou o maior percentual de comprimento do flagelo longo foi a cepa Bolívia (36% - Figura 36, Apêndice D).

Os intervalos de medida escolhidos para a área do cinetoplasto das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas com áreas pequenas, intermediárias e grandes foram 0,3 a 0,5 μm^2 , 0,6 a 0,9 μm^2 e 1,0 a 1,7 μm^2 respectivamente (Tabela 04). Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, da cepa Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto à área do cinetoplasto, estão apresentados na Figura 37 e Apêndice D. As frequências das áreas de cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes das formas epimastigotas de *T. cruzi*, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão descritas abaixo:

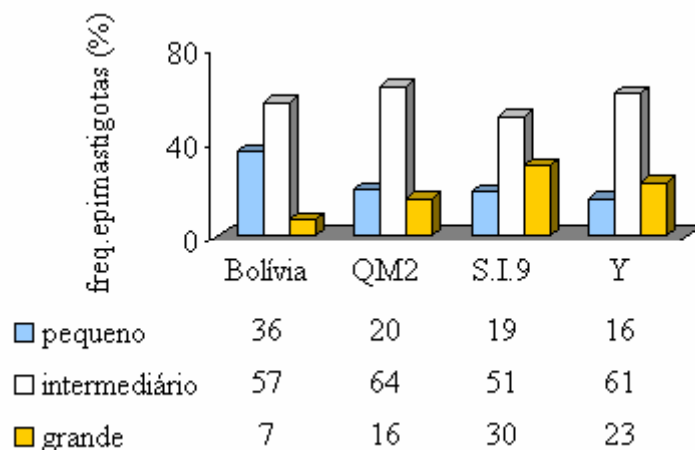


Figura 37. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas em meio de cultura LIT das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa Bolívia apresentou os maiores percentuais de cinetoplasto pequeno (36% - Figura 37, Apêndice D), a cepa QM2 apresentou os maiores percentuais de cinetoplastos intermediários (64% - Figura 37, Apêndice D), enquanto a cepa S.I.9 apresentou os maiores percentuais de cinetoplastos grandes (30% - Figura 37, Apêndice D).

Os intervalos de medida escolhidos para a área do núcleo das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas com áreas pequenas, intermediárias e grandes foram 0,9 a 1,6 μm^2 , 1,7 a 2,9 μm^2 e 3,0 a 6,8 μm^2 respectivamente (Tabela 04).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto à área do núcleo, estão apresentados na Figura 38 e Apêndice D. As frequências das áreas de núcleos pequenos, intermediários e grandes das formas epimastigotas de *T. cruzi*, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

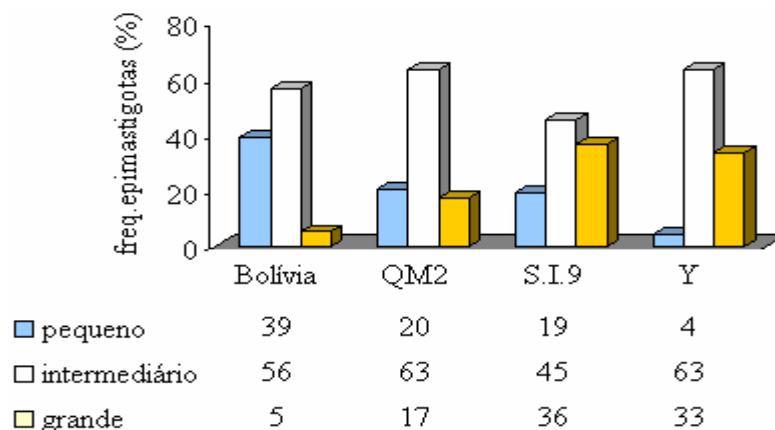


Figura 38. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa Bolívia apresentou os maiores percentuais de núcleos pequenos (39% - Figura 38, Apêndice D); as cepas QM2 e Y apresentaram os maiores percentuais de núcleos intermediários (63% - Figura 38, Apêndice D); enquanto a cepa S.I.9 apresentou os maiores percentuais de formas com núcleos grandes (36% - Figura 38, Apêndice D).

Os intervalos de medida escolhidos para o índice nuclear (IN) das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas com IN(s) baixos, intermediários, e altos foram 0,1 a 0,3; 0,4 a 0,8 e 0,9 a 2,2 respectivamente (Tabela 04).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao IN estão apresentados na Figura 39 e Apêndice D. As freqüências de IN(s) baixos, intermediários e altos das formas epimastigotas de *T. cruzi*, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

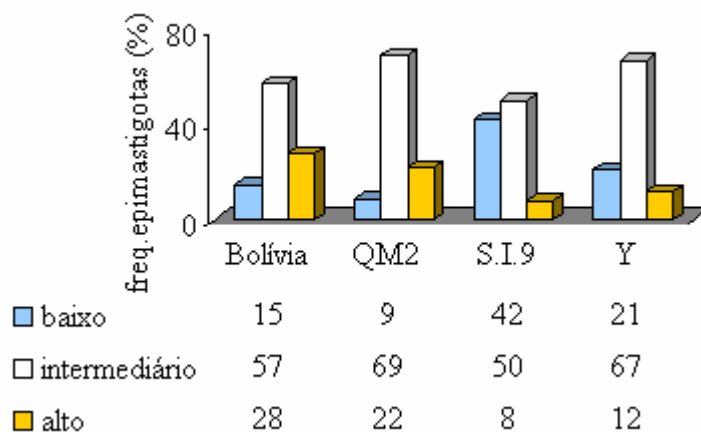


Figura 39. Freqüência das mensurações de índice nuclear das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura LIT, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa S.I.9 apresentou os maiores percentuais de IN baixo (42% - Figura 39, Apêndice D); a cepa QM2 apresentou os maiores percentuais de IN intermediário (69% - Figura 39, Apêndice D); as cepas Bolívia e QM2 apresentaram os maiores percentuais de IN altos (28% e 22% - Figura 39, Apêndice D).

4.5 Mensuração das formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de fezes de triatomíneo.

As mensurações dessas formas estão expressas no Apêndice C.

Na escolha dos intervalos de medidas das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, foi usado o critério de

agrupamento de todas as mensurações, estabelecendo-se três intervalos: do valor mínimo ao 1º quartil, do 1º quartil ao 3º quartil e do 3º quartil ao valor máximo, esses intervalos estão sumarizados na Tabela 05 e referem-se aos parâmetros: área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (AN), largura (L), flagelo (FL), distância da extremidade anterior ao meio do núcleo (NA), distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), comprimento total (T) e índice nuclear (IN).

Tabela 05. Resultados estatísticos das mensurações em quartis de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas em fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

	Mensuração	A.C. ¹	A.N. ²	L	FL	PN	NA	T	IN
25%	↕ Mínima	0,2	0,6	0,7	3,4	1,2	1,5	11,1	0,1
	↕ 1º quartil	0,5	1,5	1,9	7,0	3,6	5,2	19,2	0,4
50%	↕ Mediana	0,7	2,0	2,5	8,9	5,7	8,5	25,4	0,7
	↕ 3º quartil	0,9	2,7	3,3	11,8	8,1	14,6	32,5	0,9
25%	↕ Máxima	3,0	6,5	7,5	28,5	17,0	27,7	51,1	2,9

¹área do cinetoplasto, ²área do núcleo, L : largura, FL : flagelo, PN: distância da extremidade posterior ao meio do núcleo, N.A. : distância da extremidade anterior ao meio do núcleo, T: comprimento total = PN+NA+FL, IN: índice nuclear.

Os intervalos de medida escolhidos para a largura das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas finas foram 0,7 a 1,8 µm (quartil inferior), para as formas intermediárias foram 1,9 a 3,3 µm (interquartis) e para as formas largas foram 3,4 a 7,5 µm (quartil superior) sumarizados na Tabela 05.

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto à largura, estão apresentados na Figura 40 e Apêndice E. As frequências de formas finas, intermediárias e largas de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

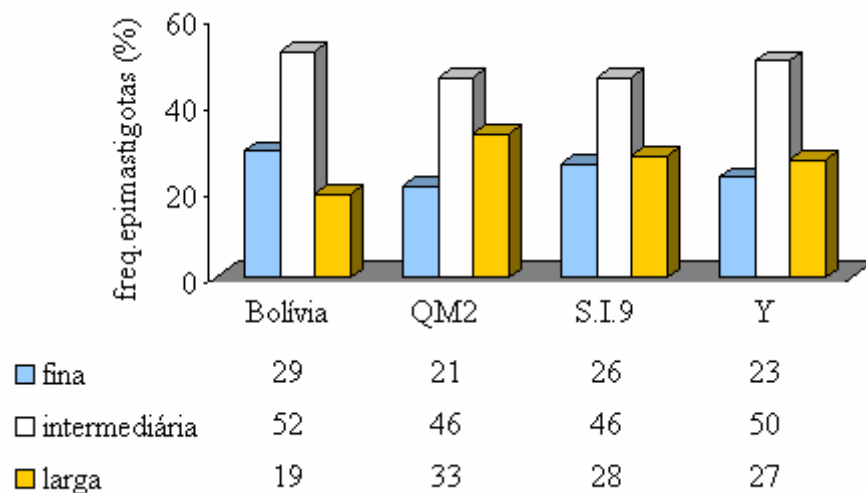


Figura 40. Frequência das mensurações de largura das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

As quatro cepas apresentaram percentuais para formas finas similares (29%, 21%, 26% e 23% - Figura 39, Apêndice E). A cepa Bolívia apresentou o maior percentual para formas intermediárias (52% - Figura 40, Apêndice E). A cepa QM2 apresentou maior percentual de formas largas (33% - Figura 40, Apêndice E).

Os intervalos de medida escolhidos para comprimento total das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas curtas foram 11,1 a 19,1 μm (quartil inferior), para as formas intermediárias foram 19,2 a 32,5 μm (interquartis) e para as formas longas foram 32,6 a 51,1 μm (quartil superior), sumarizados na Tabela 05.

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao comprimento total, estão apresentados na Figura 41 e Apêndice E. As frequências de formas curtas, intermediárias e longas de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

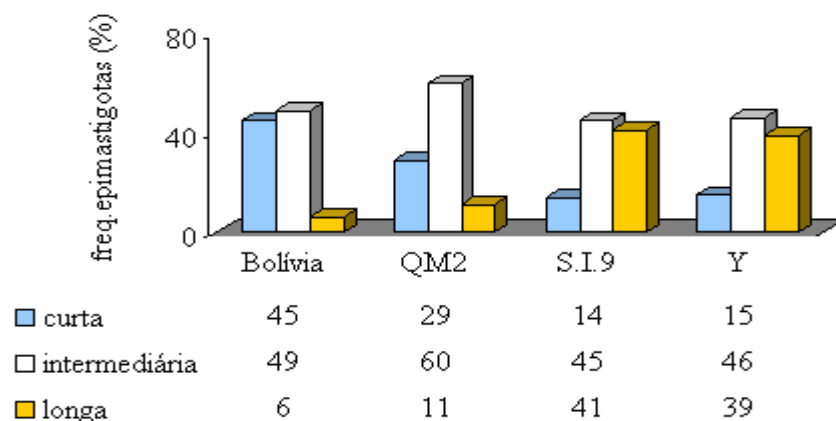


Figura 41. Frequência das mensurações de comprimento total das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa Bolívia apresentou o maior percentual de comprimento total curto (45% - Figura 41, Apêndice E); a cepa QM2 apresentou o maior percentual de comprimento total intermediário (60% - Figura 41, Apêndice E); enquanto as cepas S.I.9 e Y apresentaram maior percentual de comprimento total longo (41% e 39% - Figura 41, Apêndice E).

Os intervalos de medida escolhidos para comprimento do flagelo das formas epimastigotas de *T. cruzi* para as formas com flagelo curto foram 3,4 a 6,9 μm , para as formas com flagelo intermediário foram 7,0 a 11,8 μm e para as formas com flagelo longo foram 11,9 a 28,5 μm (Tabela 05).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao comprimento do flagelo, estão apresentados na Figura 42 e Apêndice E. As frequências de flagelos curtos, intermediários e longos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

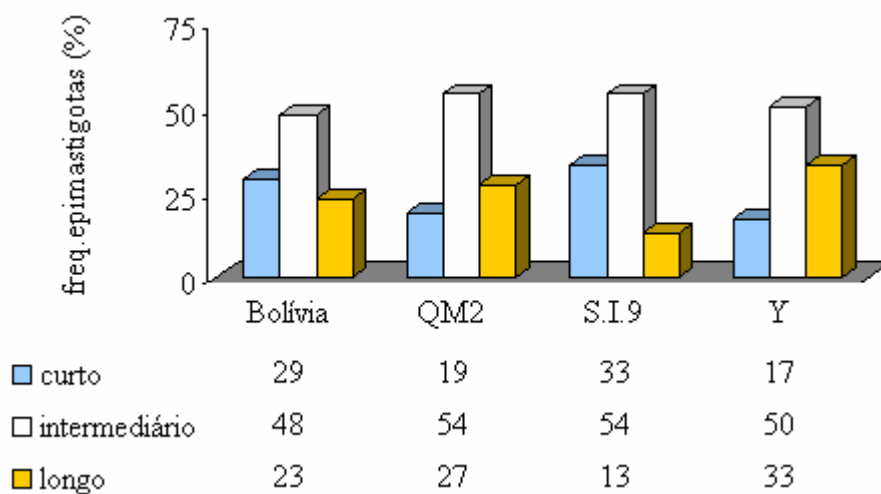


Figura 42. Frequência das mensurações de comprimento do flagelo das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa S.I.9 apresentou maior percentual de flagelos curtos (33% - Figura 42, Apêndice E); as cepas QM2 e S.I.9 apresentaram os maiores percentuais de flagelos intermediários (54% - Figura 42, Apêndice E) e a cepa Y apresentou o maior percentual de flagelos longos (33% - Figura 42, Apêndice E).

Os intervalos de medida escolhidos para as áreas de cinetoplastos das formas epimastigotas de *T. cruzi* para áreas pequenas, intermediárias e grandes foram 0,2 a 0,4 μm^2 , 0,5 a 0,9 μm^2 e 1,0 a 3,0 μm^2 (Tabela 05).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto à área do cinetoplasto, estão apresentados na Figura 43 e Apêndice E. As frequências das áreas de cinetoplastos pequenos, intermediários e grandes das formas epimastigotas de *T. cruzi*, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

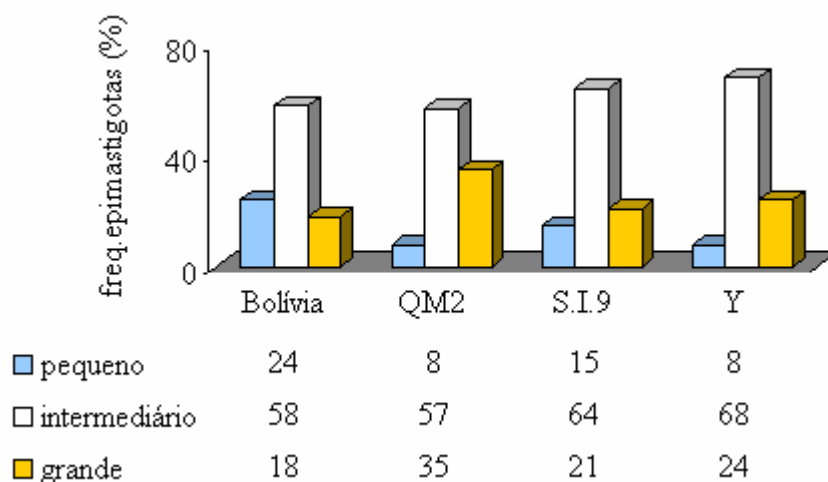


Figura 43. Frequência das mensurações da área do cinetoplasto das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa Bolívia apresentou maior percentual de cinetoplasto pequeno (24% - Figura 43, Apêndice E); a cepa Y apresentou o maior percentual de cinetoplastos intermediários (68% - Figura 43, Apêndice E); a cepa QM2 apresentou o maior percentual de cinetoplastos grandes (35% - Apêndice E).

Os intervalos de medida escolhidos para as áreas de núcleos das formas epimastigotas de *T. cruzi* para áreas pequenas, intermediárias e grandes foram 0,6 a 1,4 μm^2 , 1,5 a 2,7 μm^2 e 2,8 a 6,5 μm^2 (Tabela 05).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, da cepa Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto à área do núcleo, estão apresentados na Figura 44 e Apêndice E. As frequências das áreas de núcleos pequenos, intermediários e grandes para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y estão descritas abaixo:

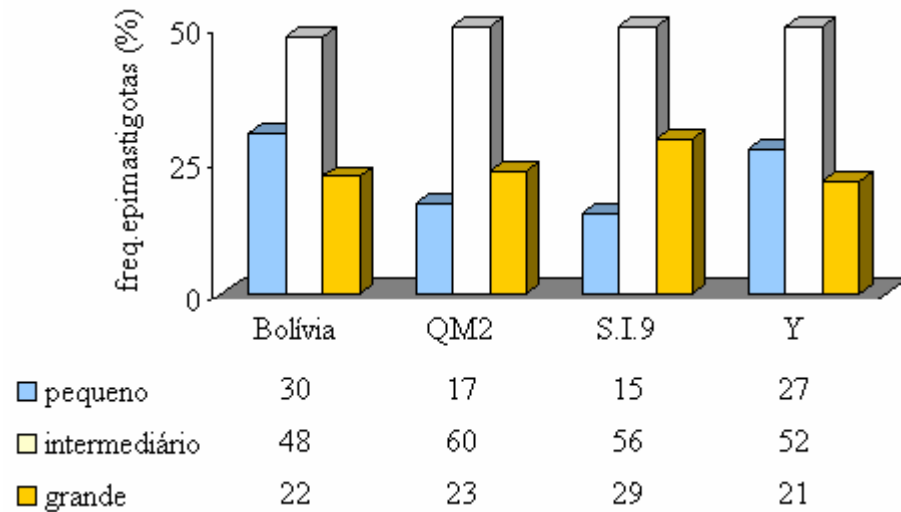


Figura 44. Frequência das mensurações da área do núcleo das formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

A cepa Bolívia apresentou maior percentual de núcleo pequeno (30% - Figura 44, Apêndice E); a cepa QM2 apresentou o maior percentual de núcleo intermediário (60% - Figura 44, Apêndice E); a cepa S.I.9 apresentou o maior percentual de núcleo grande (29% - Apêndice E).

Os intervalos de medida escolhidos para os índices nucleares (IN) das formas epimastigotas de *T. cruzi* para os IN baixos, intermediários e altos foram 0,1 a 0,3, 0,4 a 0,9 e 1,0 a 2,9 (Tabela 05).

Os resultados das mensurações das formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, quanto ao índice nuclear (IN) estão apresentados na Figura 45 e Apêndice E. As frequências de índices nucleares baixos, intermediários e altos das formas epimastigotas de *T. cruzi*, para as cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y, estão descritas abaixo:

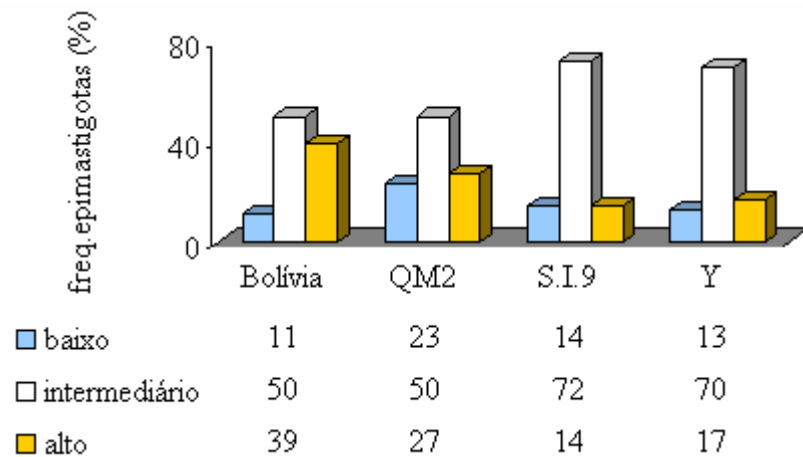


Figura 45. Frequência das mensurações dos índices nucleares das formas epimastigotas *T. cruzi*, obtidas de fezes de triatomíneo, das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

O parâmetro índice nuclear da forma epimastigota foi considerado baixo (0,1 a 0,3) intermediário (0,4 a 0,9) e grande (1,0 a 2,9) sumarizados na Tabela 05. A cepa QM2 apresentou o maior percentual de IN baixo (23% - Figura 45, Apêndice E); as cepas S.I.9 e Y apresentaram os maiores IN intermediários (72% e 70% - Figura 45, Apêndice E); a cepa Bolívia apresentou o maior percentual de IN alto (39% - Figura 45, Apêndice E).

A cepa QM2 apresentou maior percentual de formas largas (33% - Figura 40, Apêndice E); As cepas S.I.9 e Y apresentaram maior percentual de comprimento total longo (41% e 39% - Figura 41, Apêndice E); a cepa Bolívia apresentou predominância de cinetoplasto pequeno (24% - Figura 43, Apêndice E), núcleos menores (30% - Figura 44, Apêndice E) e IN altos (39% - Figura 45, Apêndice E).

5 DISCUSSÃO

5.1 Formas tripomastigotas sanguíneas

Com o crescimento científico quanto aos diferentes aspectos que levam a patogenia da doença de Chagas, sabe-se que os aspectos morfológicos são características determinantes no tipo de alteração orgânica funcional na fase crônica da doença. Dessa forma, uma padronização daquilo que foi estabelecido até o presente momento como base para classificação das formas morfológicas de *T. cruzi* foi revisto neste trabalho.

SILVA (1959) caracterizou as formas finas, intermediárias e largas de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, do seguinte modo:

Formas finas apresentam o cinetoplasto relativamente afastado da extremidade posterior, corpo com aspecto sinuoso, flagelo livre curto e o núcleo difuso. Formas largas apresentam o cinetoplasto bastante próximo da extremidade posterior, o núcleo é ovóide e mais denso e o flagelo livre mais longo. As formas intermediárias tem caracteres intermediários.

Neste trabalho utilizou-se a denominação preconizada por SILVA (1959), quanto às dimensões da largura das formas tripomastigotas. Ao examinar esfregaços sanguíneos obtidos de camundongos infectados, confirmou-se as observações de SILVA (1959), conforme pode ser verificado na Figura 05 (a), (b), (c), Figura 06 (d), (e), (f) e Figura 07(g), (h), (i), isto é formas tripomastigotas sanguíneas finas, intermediárias e largas. No entanto mensurou-se também o comprimento das formas tripomastigotas e para esse parâmetro utilizou-se as denominações curto, intermediário e longo.

5.2 Formas epimastigotas em meio de cultura LIT

BRUMPT (1912) propôs que a forma tripomastigota metacíclica se origina da epimastigota por um processo de estiramento da membrana ondulante e migração do cinetoplasto para a posição posterior.

CAMARGO (1964) demonstrou que o aumento das formas tripomastigotas na população de flagelados de uma cultura resulta da metamorfose de formas epimastigotas. Epimastigotas típicas com corpo largo e longo, núcleo esférico, cinetoplasto em haste anterior ao núcleo, flagelo livre longo foram encontrados com tripomastigotas típicos, com corpo delgado, núcleo fusiforme, cinetoplasto arredondado e posterior ao núcleo e flagelo curto. Durante um período curto precedendo a fase estacionária da cultura, observou uma grande variabilidade de formas intermediárias entre epimastigotas e tripomastigotas.

Neste estudo observou-se que o cinetoplasto ocupa distintas localizações nas formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de meio de cultura LIT, Figura 08(a,b), onde o cinetoplasto se encontra anterior ao núcleo; Figura 08(c, d) com cinetoplasto lateral ao núcleo e Figura 08(e) com cinetoplasto posterior ao núcleo (forma tripomastigota). Sugere-se a partir dessas observações que essas mudanças de posição do cinetoplasto podem ser interpretadas como transformação das formas epimastigotas para tripomastigotas. Tais transformações estão de acordo com a proposta de BRUMPT (1912) e os experimentos de CAMARGO (1964).

5.3 Mensurações de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Desde os estudos realizados por Chagas em 1909, vários autores propuseram diversas denominações de modo a caracterizar as diferenças quanto à largura e ao comprimento das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (SILVA 1959, BRENER & CHIARI 1963, BELDA NETO 1974). As denominações fina, intermediária e larga utilizadas neste trabalho seguem a terminologia utilizada por Silva (1959). Entretanto a definição precisa do que cada autor refere como forma tripomastigota curta/longa, fina/larga ou intermediária é ainda controversa. No intuito de esclarecer essa indefinição, mensurou-se as cepas Bolívia, QM2 e Y, a fim de definir parâmetros numéricos quanto à largura (fina, intermediária, larga) e comprimento (curto, intermediário, longo).

Os resultados das mensurações efetuadas no período PA mostram que a cepa Y apresentou maior porcentagem de formas finas em relação às cepas Bolívia e QM2 (Figura 12, 10, 11). No período Pico a cepa Y também mostrou maior percentual de formas finas

quando compara-se com as cepas Bolívia e QM2 (Figura 12, 10, 11). No período PP a cepa QM2 apresentou predomínio de formas largas em relação às cepas Bolívia e Y (Figura 11, 10, 12). No que se refere ao comprimento, no período AP, a cepa QM2 mostrou maior quantidade de formas curtas e nenhuma forma longa (Figura 15). A forma intermediária quanto ao comprimento da cepa QM2, nos períodos AP e P, mostrou predomínio em relação às cepas Bolívia e Y. Já no período PP ocorreu predomínio da forma longa da cepa Y (Figura 16, 14, 15).

Diante da análise das mensurações das três cepas nos três períodos de parasitemia, as cepas Bolívia e QM2 mostraram uma predominância de formas sanguíneas largas quando comparadas às finas durante o seguimento da infecção (Figura 10,11 - Apêndice A,B). Contrariamente uma predominância de formas finas foi observada para a cepa Y quando comparada às formas largas (Figura 12 - Apêndice C). Esses resultados confirmam os estudos de BRENER & CHIARI (1963) que também encontraram predominância de formas finas para a cepa Y. No entanto esses autores realizaram a classificação de fina, larga e anormalmente larga baseados somente em observações visuais sem efetuar mensuração. Nos estudos de BRENER (1969) a porcentagem de formas finas e largas no sangue foi determinada por exame de pelo menos 300 formas tripomastigotas em preparações sanguíneas a fresco sob contraste de fase e aumento x 450 (cepas ABC, Berenice, FL). Esse estudo também baseou-se somente em observações visuais para identificar as formas finas, largas e anormalmente largas, isto é, não foi feita mensuração. ARAÚJO & CHIARI (1988) estudaram 300 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepas CL, MR e Y) e as classificaram em formas finas, largas e muito largas da mesma forma subjetiva, isto é, sem mensurá-las.

Os resultados das mensurações de largura e comprimento das formas tripomastigotas das cepas Bolívia, QM2 e Y de *T. cruzi*, mostraram três padrões distintos quanto à largura e comprimento: formas finas de 0,6 a 1,3µm, intermediárias de 1,4 a 2,1µm, largas de 2,2 a 5,5µm, curtas de 13,5 a 19,5µm, intermediárias de 19,6 a 24,7 e longas de 24,8 a 43,8µm (Tabela 03).

Provavelmente as mensurações que caracterizaram as formas finas e intermediárias, correspondam às formas finas da cepa Y aludidas por BRENER & CHIARI (1963), que, no entanto não mensuraram a largura e sim o comprimento. A respeito da cepa QM2 de *T. cruzi*, os resultados observados por MARTINS (2005) corroboram com os nossos, que mostram um percentual elevado (39% no PA) de formas largas para essa cepa (Figura 11 - Apêndice B). Também é necessário enfatizar que um percentual de 48% (PA) e 39% (PP) de formas longas foram observadas ao se mensurar as formas tripomastigotas das cepas Bolívia e

Y, respectivamente (Figura 14, 16 - Apêndice A,C), ao passo que a cepa QM2 se apresentou com somente uma forma longa (Figura 15 - Apêndice B). Essas observações estão de acordo com aqueles encontrados por BARATA (1988) para a cepa Y e MARTINS (2005) para a cepa QM2. Quando observados nos interquartis, os quais compreendem 50% da área central de distribuição, um percentual maior que 50% de tripomastigotas com comprimento intermediário foi observado, entretanto em alguns casos como a cepa Bolívia (41% no período PA) e cepa Y (38% no período PP) para formas intermediárias, as formas longas compreenderam 48% e 37% respectivamente (Figura 14,16 - Apêndice A,C). Os diferentes parâmetros estudados neste trabalho permitiram estabelecer padrões numéricos, de modo a definir o que é uma cepa fina, intermediária e larga; assim como curta, intermediária e longa, quanto ao comprimento.

A cepa Bolívia apresentou os maiores percentuais de cinetoplastos pequenos e intermediários no PA (32% e 65% - Figura 22, Apêndice A); enquanto a cepa que apresentou maiores percentuais de cinetoplastos grandes foi a Y no PA (56% - Figura 24, Apêndice C); o que condiz com o valor máximo encontrado por MARTINEZ (2004) para área do cinetoplasto dessa cepa.

Das quatro cepas estudadas, a cepa que apresentou os maiores percentuais de IN baixo foi a Y (38% - Figura 33, Apêndice C), a cepa Bolívia apresentou os maiores percentuais de IN intermediários (78% - Figura 33, Apêndice A), enquanto as cepas QM2 e S.I.9 apresentaram maiores percentuais de INs altos (51% e 45% - Figura 33, Apêndice B). Na cepa QM2 praticamente não foram encontrados INs baixos (1% - Figura 33, Apêndice B). O menor índice nuclear encontrado para a cepa QM2 por MARTINS (2005) foi 1,24 μ m.

5.4 Mensurações de formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de meio de cultura LIT.

No tocante às formas epimastigotas coletadas de meio LIT, preconizou-se os parâmetros de largura (fina/ intermediária / larga : 1,1 a 1,7 μ m/ 1,8 a 2,8 μ m / 2,9 a 5,0 μ m), comprimento total (curto/ intermediário/longo: 13,0 a 23,2 μ m/ 23,3 a 31,3 μ m /31,4 a 43,7 μ m), área do núcleo (pequeno/ intermediário/ grande : 0,9 a 1,6 μ m²/ 1,7 a 2,9 μ m²/ 3,0 a 6,8 μ m²), área do cinetoplasto (pequeno/ intermediários/ grande: 0,3 a 0,5 μ m²/ 0,6 a 0,9 μ m²/ 1,0 a 1,7 μ m² e índice nuclear (baixo/ intermediário/ alto: 0,1 a 0,3 / 0,4 a 0,8 / 0,9 a 2,2), que podem ser agora utilizados como padrão de referência para futuras mensurações ou inter-relação dessas formas com as patologias causadas.

5.5 Mensurações de formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de fezes de triatomíneo.

Quanto às formas epimastigotas obtidas de fezes de triatomíneo, também preconizou-se os parâmetros de largura (fina/ intermediária / larga : 0,7 a 1,8 μ m/ 1,9 a 3,3 μ m/3,4 a 7,5 μ m), comprimento total (curto/intermediário/longo: 11,1 a 19,1 μ m /19,2 a 32,5 μ m/32,6 a 51,1 μ m), área do núcleo (pequeno/ intermediário/grande : 0,6 a 1,4 μ m² / 1,5 a 2,7 μ m² / 2,8 a 6,5 μ m²), área do cinetoplasto (pequeno/ intermediários/ grande: 0,2 a 0,4 μ m² / 0,5 a 0,9 μ m² /1,0 a 3,0 μ m² e índice nuclear (baixo/ intermediário/ alto: 0,1 a 0,3 / 0,4 a 0,9 / 1,0 a 2,9), que também podem ser utilizados como padrão de referência para futuras mensurações ou inter-relação dessas formas com as patologias causadas.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos dados por nós avaliados o presente trabalho estabeleceu padrões numéricos para diferentes características morfológicas de *T. cruzi* quanto às formas tripomastigotas sanguíneas, epimastigotas de meio de cultura LIT e epimastigotas de triatomíneo no tocante aos conceitos de finas/intermediárias/largas, curtas/intermediárias/longas, bem como área do cinetoplasto e nuclear quanto aos conceitos pequeno/intermediário/grande e ainda índice nuclear baixo/intermediário/longo.

Esses dados são inéditos visto poderem de agora em diante serem utilizados como padrão de medidas de diferentes formas de *T. cruzi* e poder associados a outros fatores relacionar essas características morfométricas com as alterações patogênicas da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.G; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**, v.70, p. 32-42, 1970.
- ANDRADE, S.G. Caracterização de Cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. **Rev. Pat. Trop.** v.3, n. 1, p. 65 -121, 1974.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G. Correlation entre isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.77: 796-799, 1983.
- ANDRADE, V.; BARRAL NETTO, M.; ANDRADE S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz J. Med. Biol. Res.** v.18,n.4, p. 499-505, 1985.
- ANDRADE, S.G. and MAGALHÃES, J.B. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.30,n.1, p:27-35, 1997.
- ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: Clonal structure of parasites strains and the importance of principal clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, 185 -197, 1999.
- ARAUJO, S.M. de e CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C₃H isogênicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.83, p: 175 - 181, 1988.
- ARAUJO, T.C.; CASTRO, J. & CASTRO, S.L. Doença de Chagas. Manual para experimentação animal. **ed. Fiocruz, Inst. Oswaldo Cruz**, 2000.
- BARATA, J.M.S. et al. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana no Estado do Acre (Brasil) e sua correlação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Rev. Saúde públ., S.Paulo**, v.22, p. 401-10, 1988.
- BARRETO, M.P. Tripanossomo semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v.7, n. 5, p. 305 - 315, 1965.
- BELDA NETO, F.M. Estudo sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.8, p. 27-36, 1974.
- BRENER, Z. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasit., Liverpool**, v.59, n.1, p. 19-25, 1965.
- BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 63, p. 215-20, 1969.

BRENER, Z.; Intraespecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinguishing characteristics. **PAHO Sci. Publ.**, v.347, p.11-21. 1977.

BRENER, Z. Symposium on new approaches in research on American Trypanosomiasis. **Bol Oficina Sanit Panam. Spanish**. Aug; v.83, n.2, p.106-18, 1977.

BRENER, Z.; WENDEL, S.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In : Chagas Disease – American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. **ISBT Brazil'92**, São Paulo, Brazil, 1992. Disponível em < <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter3.html>.> acesso em 25/7/2005.

BRENER, Z. e CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.5, n.5, p. 220-224, 1963.

BRUMPT, E. *Schizotrypanum cruzi* – different phases of its cycle. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.5, p.261-2, 1912.

BRUMPT, E. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. **Bull. Soc. path. exot.** v.5, p.360-367, 1912.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, p: 93 – 100, 1964.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. s.p. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Osw. Cruz. Rio de Janeiro**, v. 1, n.2, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, E.; Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Tripanosomiasis americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.30,n.3, p.387-416, 1935.

COSTA, J.; ARGOLLO, A. and FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa** **1385**: 47-58, 2006.

COSTA, J. and FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **102**: 87-90, 2007.

COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; RUBENS, J.; PEREIRA, N.C. & SILVA, J.R.; *Trypanosoma* do “complexo cruzi” em reservatório silvestre do Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 8, p. 134-8, 1966.

DAWSON, B. e TRAPP, R.G. Bioestatística: Básica e Clínica. *Ed. McGraw-Hill Rio de Janeiro*, **3**, 364, 2003.

DEANE, M.P.; KLOETZEL, J. & Milder, R. Polimorfism of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.18, p. 145-6, 1976.

DELANÖE, M. e DELANÖE, P. À propos du *Schizotrypanum cruzi*. **Bull. Soc. Path. Exot.** v.5, p.599-602, 1912.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Tese laureada pela Fac. Med. do Rio. **Trabalho do Inst. Oswaldo Cruz**. pp. 1 – 115, 1933.

DIAS, E. *Tripanosoma cruzi* ou *Schizotrypanum cruzi* ? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.29, n.10, p. 203-227, 1934.

DIAS, E. Revisão geral dos Hemoflagelados de Chirópteros. Estudo do *Schizotrypanum* do *Phyllostomus hastatus*: identidade com *Schizotrypanum cruzi* **IX Reunião Soc .Argentina Patol. Reg.**, Buenos Aires, v.1, p: 10-88, 1936.

DIAS, E. Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Corollia perspicillata* do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 35, p. 399- 409, 1940.

DIAS, E. e FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Mem.do Inst Oswaldo Cruz**, v. 38, n.3, 1943.

FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETTO, M.P. & CARVALHEIRO, J.R. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* XXIV. Variação dos dados biométricos obtidos em amostras do *T. cruzi* isoladas de casos humanos de Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,v. 2, p. 1-8, 1968.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C. e BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemíptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). **Zootaxa**, v. 670, p. 1-12, 2004.

FUNAYAMA, G.K e PRADO JÚNIOR,J.C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi*.**Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v-8, p. 75-81, 1974.

GALVÃO, C; CARCAVALLO, R; ROCHA, D, D, A, S; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannet, 1919 (Hemíptera, Reduviidae) an their geographical distribuitoin, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1 - 36, 2003.

GALVÃO, C. and ANGULO, V.M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. **Zootaxa**. **1241**: 61-8, 2006.

HOARE, C.A.E.; BROOM, J.C.; Morphological and taxonomic study on mammalian trypanosomes. IV. Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma* e *T. vivax*.**Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg**, v.31, n.5, p. 517-534; 1938.

HOWELLS, R.E. and CHIARI, E. Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. **Ann. Trop. Med. Parasito**, v. 69, p. 435-48, 1975.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*; effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. **Parasitol Res**. v.83, p.781 - 788, 1997.

LIMA, V.S.; MANGIA, R.H.; CARREIRA, J.C.; ,ARCHEWSKI, R.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: correlations of biological aspects of the life cycle in mice and triatomines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n.3, p. 397-402, 1990.

MARTINEZ, I.; ROSA, J. A. da . Characterization of two strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from specimens of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) collected in wild enviromente. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, Suppl. 13, p. 161, 2003.

MARTINI, A. S. Patogenicidade de cepa Bolívia de *Trypanosoma cruzi*, na fase aguda da infecção experimental, análise histopatológica e morfométrica do pâncreas e glândulas salivares parótidas e submandibular de camundongos. Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. UNESP, 1988.

MARTINS, L. P. A. Verificação da Suscetibilidade de três espécies Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) a infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. Araraquara, 1999. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

MARTINS, L. P. A. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* CHAGAS , 1909 (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) a partir de triatomíneos silvestres do estado do Rio Grande do Sul. Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, 2005.

MELLO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.** Jun; v.64, n.3, p. 475-82, 1978.

MILES, M.A., LANHAM, S.M., SOUZA, A.A, PÓVOA, M.(1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R. Soc. Trop. Med Hyg.**, 74: 221-237.

PEARSON, K. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples of the same population, with special reference to recent work on the identily of trypanosome strains. **Biometrika**, v.10, p.85-143, 1914.

PINTO, C. Tripanosomiasis Cruzi (Doença de Carlos Chagas) no Rio Grande do Sul. Brasil. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p. 443 – 537, 1942.

PONSTAN, M.; DVORAK, J.A.; MCDANIEL, J.P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN – mice with two clones isolated from a common source. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** May; v.32, n.3, p. 497-506, 1983.

PONSTAN, M.; BAILEY, J.J.; DVORAK, J.A.; MCDANIEL, J.P.; POTTALA, E.W. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and eletrocardiographical responses to chronic infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Nov, v. 37,n.3, p. 541-9, 1987.

RECOMMENDATIONS FROM A SATELLITE MEETING. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p. 429-432, 1999.

RIBEIRO, R.D. e CAMARGO, C.A. Ciclo do *Trypanosoma cruzi* extra-aparelho digestivo de triatomíneos. I. Encontro de formas amastigotas nas paredes do estômago de *Dipetalogaster maximus*. **Rev. Brasil Biol.**, v.42, n.2, p. 381-385, 1982.

RIBEIRO, R.D.; BARRETO, M.P.; BELDA NETO, F.M.; CORREA, S.T.; FERRIOLLI FILHO F. Reservoirs and will vectors of *Trypanosoma cruzi*. LXXV: Natural *T. cruzi* infection of monkey *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758). **Rev. Bras. Biol.** c Fev; v.40, n.1, p. 51-8, 1980.

RIBEIRO, R.D.; FERRIOLLI FILHO, F. e BELDA NETO, F.M. Comportamento de subamostras do *trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. **Rev. Bras. Biol.**, v.42, p. 51-4, 1982.

RIBEIRO, R.D., BELDA NETO. F.M, PRADO JR. J.C., ALBUQUERQUE. S. Comportamento de Formas Sanguícolas do *Trypanosoma cruzi* obtidas de camundongos utilizados como filtros biológicos, em cultura e em triatomíneo. **Rev. Saúde públ., São Paulo**, v.20, n.2, p. 129-32, 1986.

ROSA, J.A.da, PINTO, M.C., FERNANDES, M.Z.T., MARTINEZ, I., ABREU, K.A., SPERANZA, L.; VARGAS, S.F.S. Isolation of *Trypanosoma cruzi* strains from *Triatoma sordida* collected in peridomestic enviroment in Santo Inácio, Bahia. **XX Meeting of the SBPZ**. P. 156, 2004.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, 20: 329-334, 1947.

SANDOVAL, C. M.; PABÓN, E.; JURBERG, J. & GALVÃO, C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**. **1443**: 55-64, 2007.

SCHOFIELD, C.J. *Trypanosoma cruzi*: The vector-parasite paradox. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **95** (4): 535-44, 2000.

SILVA, L.H.P. da; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et Biologica**, v.20, n.3, p.191-208, 1953

SILVA, L.H.P. da. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 1, p. 99-118, 1959.

SILVEIRA, A.C; VINHAES, M.C. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.231, n.2, p.15-60, 1998.

SOUTO, R.P., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., CAMPBELL, D.A., ZINGALES, B. DNA markes define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.83, p.141-152, 1996.

TORRES, C. B. M.. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda).I . Alterações parenquimatosas. **Trabalho do Inst. Osw. Cruz**. Tese inaugural. Fac de Méd. do Rio. Tipografia Leuzinger., v.1, n. 98, 1917.

TIBAYRENC, M. and AYALA, F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277-292 (1988).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Scientific working group on Chagas Disease Buenos Aires, Argentina, 2005. Disponível em < <http://www.who.int>.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Chagas. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v.3, p.276-294, 1911.

ZELEDÓN, R. and VIETO, P.L. Comparative studies of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. verpertilionis* Battaglia, 1904 from Costa Rica, **J. Parasitol., Lancaster**, v.44, p.499-502, 1958.

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.M.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of r RNA and mini-exon gene sequences. **Inst.J. Parasitol.**, v.28, p. 105-12, 1998.

APÊNDICE A – Resultados e respectivas frequências das mensurações da largura, comprimento, flagelo, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Bolívia.

Cepa	Bolívia							
	PA	Pico	PP	PA	Pico	PP	total	
Mensuração	freq°	freq°	freq°	%	%	%		%
largura(µm)								
0,6 - 1,3	18	12	8	16	10	7	38	11
1,4 - 2,1	77	76	76	66	63	65	229	65
2,2 - 5,5	21	32	33	18	27	28	86	24
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100
compr. (µm)								
13,5 - 19,5	13	13	8	11	11	7	34	10
19,6 - 24,7	47	61	67	41	51	57	175	49
24,8 - 43,8	56	46	42	48	38	36	144	41
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100
flagelo(µm)								
4,0 - 7,1	8	10	15	7	8	12	33	9
7,2 - 10,3	59	70	93	51	58	80	222	63
10,4 - 24,8	49	40	9	42	34	8	98	28
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100
A.C. ² (µm ²)								
0,2 - 0,6	37	34	12	32	29	10	83	24
0,7 - 1,1	76	82	98	65	68	84	256	72
1,2 - 2,6	3	4	7	3	3	6	14	4
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100
A.N. ³ (µm ²)								
0,7 - 2,1	52	35	53	45	30	45	140	40
2,2 - 3,1	52	76	54	45	63	46	182	51
3,2 - 6,7	12	9	10	10	7	9	31	9
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100
IN ⁴								
0,5 - 1,0	23	15	15	20	12	13	53	15
1,1 - 1,8	85	92	97	73	77	83	274	78
1,9 - 3,5	8	13	5	7	11	4	26	7
n° formas	116	120	117	100	100	100	353	100

¹ frequência, ² comprimento, ³ área do cinetoplasto, ⁴ área do núcleo,

⁴ índice nuclear, PA = período anterior ao pico, Pico = período no parasitêmico, PP = período posterior ao pico parasitêmico.

APÊNDICE B – Resultados e respectivas frequências das mensurações da largura, comprimento, flagelo, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa QM2 e S.I.9.

Cepa	QM2						S.I.9			
	PA	Pico	PP	PA	Pico	PP	total		total	
Mensuração	freq°	freq°	freq°	%	%	%		%		%
largura(µm)										
0,6 - 1,3	16	14	11	13	12	10	41	11	25	21
1,4 - 2,1	57	64	67	48	53	57	188	53	85	71
2,2 - 5,5	46	42	39	39	35	33	127	36	10	8
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100
compr. °(µm)										
13,5 - 19,5	57	49	38	48	41	32	144	41	85	71
19,6 - 24,7	62	70	79	52	58	68	211	59	33	27
24,8 - 43,8	0	1	0	0	1	0	1	0	2	2
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100
flagelo(µm)										
4,0 - 7,1	52	55	51	44	46	44	158	44	72	60
7,2 - 10,3	64	65	65	54	54	55	194	55	41	34
10,4 - 24,8	3	0	1	2	0	1	4	1	7	6
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100
A.C. ² (µm²)										
0,2 - 0,6	13	6	6	11	5	5	25	7	31	26
0,7 - 1,1	71	84	77	60	70	66	232	65	71	59
1,2 - 2,6	35	30	34	29	25	29	99	28	18	15
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100
A.N. ³ (µm²)										
0,7 - 2,1	26	26	30	22	22	25	82	23	69	58
2,2 - 3,1	60	62	64	50	51	55	186	52	47	39
3,2 - 6,7	33	32	23	28	27	20	88	25	4	3
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100
IN ⁴										
0,5 - 1,0	1	1	1	1	1	1	3	1	10	8
1,1 - 1,8	48	65	60	40	54	51	173	48	56	47
1,9 - 3,5	70	54	56	59	45	48	180	51	54	45
n° formas	119	120	117	100	100	100	356	100	120	100

¹ frequência, ² comprimento, ³ área do cinetoplasto, ⁴ área do núcleo, ⁵ índice nuclear, PA = período anterior ao pico, Pico = período no parasitêmico, PP = período posterior ao pico parasitêmico.

APÊNDICE C – Resultados e respectivas frequências das mensurações da largura, comprimento, flagelo, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* da cepa Y.

Cepa	Y						total	
	PA	Pico	PP					
Mensuração	freq°	freq°	freq°	%	%	%		%
largura(μm)								
0,6 - 1,3	32	45	22	27	38	18	99	28
1,4 - 2,1	75	59	72	62	50	60	206	57
2,2 - 5,5	13	15	26	11	12	22	54	15
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100
compr. °(μm)								
13,5 - 19,5	18	29	28	15	24	23	76	21
19,6 - 24,7	58	59	45	48	50	38	160	45
24,8 - 43,8	44	31	47	37	26	39	123	34
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100
flagelo(μm)								
4,0 - 7,1	22	30	21	18	25	18	73	20
7,2 - 10,3	51	38	39	43	32	32	128	36
10,4 - 24,8	47	51	60	39	43	50	158	44
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100
A.C.² (μm²)								
0,2 - 0,6	10	12	22	8	10	18	44	12
0,7 - 1,1	43	85	62	36	71	52	190	53
1,2 - 2,6	67	22	36	56	19	30	125	35
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100
A.N.³ (μm³)								
0,7 - 2,1	12	21	30	10	18	25	63	18
2,2 - 3,1	26	66	57	22	55	47	149	41
3,2 - 6,7	82	32	33	68	27	28	147	41
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100
IN 4								
0,5 - 1,0	50	52	36	42	43	30	138	38
1,1 - 1,8	67	59	74	56	50	62	200	56
1,9 - 3,5	3	8	10	2	7	8	21	6
n° formas	120	119	120	100	100	100	359	100

¹ frequência, ²comprimento, ³área do cinetoplasto, ⁴área do núcleo,

⁴ índice nuclear, PA = período anterior ao pico, Pico = período no parasitêmico, PP = período posterior ao pico parasitêmico.

APÊNDICE D – Resultados e respectivas frequências das mensurações da largura, comprimento, flagelo, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear das formas epimastigotas obtidas de meio de cultura LIT de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Cepa	Bolívia	QM2	S.I.9	Y	Bolívia	QM2	S.I.9	Y
Mensuração	freq°	freq°	freq°	freq°	%	%	%	%
largura(µm)								
1,1 - 1,7	34	42	7	8	33	36	7	7
1,8 - 2,8	61	69	44	70	60	60	46	61
2,9 - 5,0	7	5	45	37	7	4	47	32
n° formas	102	116	96	115	100	100	100	100
compr.¹ (µm)								
13,0 - 23,2	35	19	23	30	34	17	24	26
23,3 - 31,3	55	49	46	65	54	42	48	57
31,4 - 43,7	12	48	27	20	12	41	28	17
n° formas	102	116	96	115	100	100	100	100
flagelo (µm)								
3,8 - 8,0	11	26	33	35	11	22	34	30
8,1 - 11,9	54	61	43	62	53	53	45	54
12,0 - 28,0	37	29	20	18	36	25	21	16
n° formas	102	116	96	115	100	100	100	100
A.N.² (µm²)								
0,9 - 1,6	40	23	18	5	39	20	19	4
1,7 - 2,9	57	73	43	72	56	63	45	63
3,0 - 6,8	5	20	35	38	5	17	36	33
n° formas	102	116	96	115	100	100	100	100
A.C.³ (µm²)								
0,3 - 0,5	37	23	18	18	36	20	19	16
0,6 - 0,9	58	74	49	71	57	64	51	61
1,0 - 1,7	7	19	29	27	7	16	30	23
n° formas	102	116	96	116	100	100	100	100
IN.⁴								
0,1 - 0,3	15	10	40	25	15	9	42	21
0,4 - 0,8	58	80	48	80	57	69	50	67
0,9 - 2,2	29	26	8	14	28	22	8	12
n° formas	102	116	96	119	100	100	100	100

¹ frequência,² comprimento,³ área do núcleo,⁴ área do cinetoplasto, 4 índice nuclear

APÊNDICE E – Resultados e respectivas frequências das mensurações da largura, comprimento, flagelo, área do núcleo, área do cinetoplasto e índice nuclear das formas epimastigotas obtidas de fezes de triatomíneo de *T. cruzi* das cepas Bolívia, QM2, S.I.9 e Y.

Cepa	Bolívia	QM2	S.I.9	Y	Bolívia	QM2	S.I.9	Y
Mensuração	freq°	freq°	freq°	freq°	%	%	%	%
largura(µm)	freq	freq	freq	freq	29	21	26	23
0,7 - 1,8	29	23	29	26	52	46	46	50
1,9 - 3,3	52	49	51	57	19	33	28	27
3,4 - 7,5	19	35	31	30	100	100	100	100
n° formas	100	107	111	113				
compr.¹(µm)								
11,1 - 19,1	45	31	15	17	45	29	14	15
19,2 - 32,5	49	64	50	52	49	60	45	46
32,6 - 51,1	6	12	46	44	6	11	41	39
n° formas	100	107	111	113	100	100	100	100
flagelo(µm)								
3,4 - 6,9	29	20	37	19	29	19	33	17
7,0 - 11,8	48	58	60	57	48	54	54	50
11,9 - 28,5	23	29	14	37	23	27	13	33
n° formas	100	107	111	113	100	100	100	100
A.N²(µm²)								
0,6 - 1,4	30	18	17	30	30	17	15	27
1,5 - 2,7	48	64	62	59	48	60	56	52
2,8 - 6,5	22	25	32	24	22	100	100	100
n° formas	100	107	111	113				
A.C³(µm²)								
0,2 - 0,4	24	9	17	9	24	8	15	8
0,5 - 0,9	58	61	71	77	58	57	64	68
1,0 - 3,0	18	37	23	27	18	35	21	24
n° formas	100	107	111	113	100	100	100	100
IN⁴								
0,1 - 0,3	11	25	15	15	11	23	14	13
0,4 - 0,9	50	53	80	79	50	50	72	70
1,0 - 2,9	39	29	16	19	39	27	14	17
n° formas	100	107	111	113	100	100	100	100

¹ frequência,² comprimento,³ área do núcleo,⁴ área do cinetoplasto, ⁴ índice nuclear