

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO**

**Estudo morfológico, ultraestrutural e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do Rio de Janeiro**

**CRISTINA SANTOS DA SILVA**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Estudo morfológico, ultraestrutural e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do Rio de Janeiro**

**CRISTINA SANTOS DA SILVA**

*Sob a Orientação da Doutora*

**Nadja Lima Pinheiro**

*e Co-orientação da Doutora*

**Jacenir Reis dos Santos Mallet**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, Área de Concentração em Biologia Animal

Seropédica, RJ

Março de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**CRISTINA SANTOS DA SILVA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Dra. Nadja Lima Pinheiro - UFRRJ**  
(orientadora)

---

**Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet - FIOCRUZ/RJ**  
(co-orientadora)

---

**Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves – FIOCRUZ/RJ**  
(membro da banca examinadora)

---

**Dr. Marcos José dos Santos - UFRRJ**  
(membro da banca examinadora)

593.10438

S586e

T

Silva, Cristina Santos da, 1972-  
Estudo morfológico,  
ultraestrutural e histopatológico  
de amostras silvestres de  
Trypanosoma cruzi isoladas de  
Triatoma vitticeps (Stal, 1859) no  
Estado do Rio de Janeiro / Cristina  
Santos da Silva. - 2006.  
87f. : il.

Orientador: Nadja Lima Pinheiro.  
Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Instituto de Biologia.  
Bibliografia: f. 71-85.

1. Tripanossomo - Rio de  
Janeiro(Estado) - Teses. 2.  
Tripanossomo - Morfologia - Teses.  
3. Tripanossomo - Histologia -  
Teses. 4. Triatoma - Rio de  
Janeiro(Estado) - Teses. I.  
Pinheiro, Nadja Lima. II.  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro.Instituto de Biologia.  
III. Título.

*Dedico à Deus.*

*Aos meus pais, Hésio Moreira da Silva  
e Luzia Santos da Silva,*

*Aos meus irmãos, Cristiane Santos da  
Silva e Júlio César Santos da Silva*

*e ao meu filho Thiago que apesar da  
ausência em momentos importantes de  
sua vida, soube me compreender, amar,  
ser carinhoso, amoroso e acima de  
tudo, amigo...*

*Dedico à Dra. Jacenir Reis  
dos Santos Mallet pelo total  
apoio, ensinamentos, carinho  
e amizade.*

*Dedico à Dra. Teresa Cristina  
Monte Gonçalves por confiar  
e acreditar-me, como também  
pelo carinho e amizade.*

## *Que Deus não permita*

*Que Deus não permita que eu perca o ROMANTISMO, mesmo sabendo que as rosas não falam...*

*Que eu não perca o OTIMISMO, mesmo sabendo que o futuro que nos espera pode não ser tão alegre...*

*Que eu não perca a VONTADE DE VIVER, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...*

*Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles acabam indo embora de nossas vidas...*

*Que eu não perca a vontade de AJUDAR AS PESSOAS, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, reconhecer e retribuir esta ajuda...*

*Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo que inúmeras forças querem que eu caia...*

*Que eu não perca a VONTADE DE AMAR, mesmo sabendo que a pessoa que eu mais amo pode não sentir o mesmo sentimento por mim...*

*Que eu não perca a LUZ E O BRILHO NO OLHAR, mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo escurecerão meus olhos...*

*Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos...*

*Que eu não perca a RAZÃO, mesmo sabendo que as tentações da vida são inúmeras e deliciosas...*

*Que eu não perca o SENTIMENTO DE JUSTIÇA, mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu...*

*Que eu não perca o meu FORTE ABRAÇO, mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos...*

*Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VER, mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e escorrerão por minha alma...*

*Que eu não perca o AMOR POR MINHA FAMÍLIA, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exigiria esforços incriveis para manter a sua harmonia...*

*Que eu não perca a vontade de DOAR ESTE ENORME AMOR que existe em meu coração, mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido e até rejeitado...*

*Que eu não perca a vontade de SER GRANDE, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...*

*E acima de tudo...*

*Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!*

*Que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...*

*A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR!*

*Francisco Cândido Xavier*

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Dra. **Jacenir Reis dos Santos Mallet** e Dra. **Teresa Cristina Monte Gonçalves** pelo incentivo e ensinamentos constantes desde o meu ingresso ao Núcleo de Morfologia e Ultraestrutura de Artrópodes Vetores, ainda na Iniciação Científica.

À Dr. **Nadja Lima Pinheiro** por ter me orientado e acreditado neste trabalho.

Ao Dr. **Marcos Antonio José dos Santos** pela atenção e colaboração na realização deste trabalho.

À Dra. **Suzete Araújo Oliveira Gomes** pelo incentivo, amizade, sugestões e apoio demonstrado.

À Doutoranda **Simone Patrícia Carneiro de Freitas**, pela amizade e também por ter me ajudado em momentos de dificuldade.

À Dra. **Elizabeth Ferreira Rangel**, pelo incentivo constante.

Ao professor **Edalton Reis**, pela forte amizade, colaboração nos experimentos desenvolvidos e incentivos constantes para o ingresso neste curso.

Aos meus amigos do Curso de Entomologia Médica em especial para a Doutoranda **Ana Laura Carbajal de la Fuente**, e Especialistas **Joyce Mendes**, **Nathanielly Rocha**, **Shenia Novo** e **William Marques**.

À Especialista **Simone Castro** por ter sido atenciosa, amiga e ter me ajudado não só neste trabalho como também em momentos especiais.

Aos alunos do curso de especialização em Entomologia Médica: **Andrei Guedes**, **Sandra Bonifácio**, **Daniele Lima** e **Daniele Misael** pelo companheirismo e amizade demonstrada.

Ao Professor **Alfredo Carlos** pelo auxílio inestimável em vários momentos, bem como pela sua amizade.

À Professora **Mariângela Ziccardi**, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Adalberto José da Silva Rivea Rodrigues**, **Ana Paula Rufino Amaro Sant'Anna** e **Lenice de Oliveira Gonçalves**, técnicos do Núcleo de Ultraestrutura de Artrópodes Vetores, pelo apoio e forte amizade.

Aos estudantes **Amanda Sampaio**, **Luana Marins Silveira**, e **Leandro Borges**, pela amizade e apoio.

À **Angela**, **Ester Lucia**, e **Simone**, secretárias do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, pela atenção, e ajuda, meu muito obrigada.

À todos da Coleção de Tripanosomatídeos em especial para **Dra. Maria Auxiliadora de Souza**, **Barbara Neves dos Santos**, **Dayse Cristina Britto Branco**, **Edna Maria da Silva** e **Sheila Medeiros dos Santos Pereira**, pela colaboração, boa vontade e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos que conquistei no Curso de Pós Graduação em Biologia Animal, que mesmo distantes, estiveram unidos durante os momentos difíceis, em especial para **Danielle Anjos dos Santos e Nilza Felizardo**.

Ao **William Costa Rodrigues** pela atenção, amizade e companheirismo em todos os momentos.

A **Clarice Machado**, aluna do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, por ter me ajudado a realizar experimentos do trabalho em momentos de extrema necessidade.

À **Agra**, secretária da Pós-graduação em Biologia Animal da UFRRJ, que me ajudou em todos os momentos de necessidade.

Aos **professores e aos alunos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRRJ** por todos os preciosos ensinamentos.

**E a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente que por ventura eu não tenha citado, obrigada.**

## RESUMO

Silva, Cristina Santos. Estudo morfobiológico, ultraestrutural e histopatológico de amostras silvestres isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do Rio de Janeiro. 85 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2006.

*Triatoma vitticeps*, espécie de hábito silvestre com distribuição geográfica restrita aos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia. Em Minas Gerais e Espírito Santo vêm invadindo o domicílio, e às vezes é encontrado domiciliado freqüentemente com taxas altas de infecção por *Trypanosoma cruzi*. O alvo deste estudo é avaliar a diversidade de parasitas em três áreas (duas no município de Santa Maria Madalena e uma em Conceição de Macabu) por parâmetros morfobiológico, biométrico, ultraestrutural e histopatológico. Sete isolados identificados como *T. cruzi*, foram mantidos em NNN+LIT+20% de soro fetal bovino. Estudos morfométricos e de diferenciação celular foram baseados nas formas epimastigotas e tripomastigotas obtidas nas curvas de crescimento no 4º, 7º, 10º, 13º, 17º e 20º dias para as amostras SMM32, SMM53, SMM81, SMM98, SMM100 da área A, SMM36 da área B, e SMM1 da área F e estendidos do 23º, 27º, 30º, 33º, 37º e 40º para as amostras SMM36 e SMM98. O crescimento máximo foi observado no 4º dia para SMM100 (45.000 células/ $\mu$ l); no 7º dia para SMM53 (52.750 células/ $\mu$ l); no 10º dia para SMM 1 (21.000 células/ $\mu$ l) e SMM32 (33.125 células/ $\mu$ l); no 13º dia para SMM81 (46.000 células/ $\mu$ l) e no 20º dia para a amostra SMM36 (54.375 células/ $\mu$ l). A amostra SMM32 e SMM100 apresentaram crescimento depois de um leve declínio. A taxa de metaciclogênese era menor que 30% nos isolados SMM32, SMM53, SMM100 e SMM1 e mais alto que 80% em SMM81 e SMM98. Com o aumento de dias de avaliação da curva de crescimento, a amostra SMM36 apresentou crescimento máximo no 33º dia (90.125 células/ $\mu$ l) declinando ao final (40º dia). Estes resultados demonstram uma diversidade no comportamento destes isolados. A morfometria foi baseada nas formas epimastigotes e tripomastigotas encontradas no 10º, 17º e 20º dias da curva de crescimento, também sugere a heterogeneidade destes isolados. Embora a maioria dos dados sobre a ultraestrutura de *T. cruzi* tenham sido obtidos de formas epimastigotas mantidas em meio de cultura, o estudo realizado nas formas isoladas de triatomíneos mostrou as mesmas estruturas típicas presentes tais como cinetoplasto, microtúbulos subpeliculares, bolsa flagelar e axonema. A amostra SMM36 produziu uma alta mortalidade em camundongos inoculados com tripomastigotas. Os resultados histopatológicos com 10 e 60 dias após infecção mostram um intenso tropismo para músculo cardíaco e intenso infiltrado mononuclear. Estes resultados evidenciam a diversidade de parasitos que infectam espécimes de *T. vitticeps*, enfatizando o hábito silvestre desta espécie e a complexidade epidemiológica da região estudada.

Palavras chave: Histopatologia, morfobiologia, *Trypanosoma cruzi*

## ABSTRACT

Silva, Cristina Santos. Morphobiological, ultrastructural and histopathological study in sylvatic strains isolated from *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in the State of Rio de Janeiro. 94 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2006.

*Triatoma vitticeps* is a wild species with restricted geographic distribution to the States of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais and Bahia. In Minas Gerais and Espírito Santo it is invading the domicile, being found sometimes domiciliated, frequently with high rates of infection by *Trypanosoma cruzi*. The aim of this study is to evaluate the parasite diversity in the three sites (two in the municipality of Santa Maria Madalena and one in Conceição de Macabu) through morphobiology, biometric, ultrastructural and histopathological parameters. Seven isolates identified as *T. cruzi* were maintained in NNN+LIT+20% bovine fetal serum. Morphometric studies and cellular differentiation were based on epimastigotes and trypomastigotes forms obtained in the growth curves in the 4, 7, 10, 13, 17 and 20<sup>o</sup> days for SMM32, SMM53, SMM81, SMM98, SMM100 proceeding from the area A, SMM36 proceeding from area B, SMM 81 and SMM1 proceeding from area F and extended to 23, 27, 30, 33, 37 and 40<sup>o</sup> days to the SMM 36 and SMM 98 samples. The maximum growth was observed in the 4<sup>th</sup> day for SMM100 isolate (45.000 parasites/ $\mu$ l); the 7<sup>th</sup> day for SMM53 (52.750 parasites/ $\mu$ l) the 10<sup>th</sup> day for SMM1 (21.000 parasites/ $\mu$ l) and SMM32 (33.125 parasites/ $\mu$ l); the 13<sup>th</sup> day for SMM81 (46.000 parasites/ $\mu$ l) and 20<sup>th</sup> day for SMM36 (54.375 parasites/ $\mu$ l) and SMM98 (44.000 parasites/ $\mu$ l). The SMM32 and SMM100 isolates return to grow after a slight decline. The rate of metacyclogenese was lesser than 30% in SMM32, SMM53, SMM100 and SMM1 isolates and higher than 80% in SMM81 and SMM98 isolates. These results demonstrate diversity in the behavior of these isolates. Morphometrical analysis based on epimastigotes and trypomastigotes forms found in the 10<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the growth curve, suggests heterogeneity. Although the majority ultrastructural data of *T. cruzi* has been obtained from epimastigote forms maintained in culture was media, this study carried out with isolated forms from triatomines showing the same typical structures present as the kinetoplast, the sub-pellicular microtubules, the flagellar pocket and the axoneme. The SMM36 strain was the most lethal a high mortality. Histopathological results with 10 and 60 days after inoculation have shown an intense tropism for cardiac muscle and intense mononuclear infiltrate. These results give evidences of the diversity of parasites that infection specimens of *T. vitticeps*, emphasizing the wild habit of this species and the epidemiological complexity of studied region.

Key words: Histopathology, morphobiology, *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
Figura 2.	<i>Triatoma vitticeps</i> .....	19
Figura 3.	Distribuição geográfica de <i>Triatoma vitticeps</i> .....	20
Figura 4.	Vista Geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena-RJ.....	21
Figura 5.	Vista Geral da área A.....	21
Figura 6.	Vista Geral da área B.....	22
Figura 7.	Vista Geral da área C.....	22
Figura 8.	Esquema demonstrativo dos parâmetros avaliados para a realização do estudo morfométrico dos tripanosomatídeos (baseado em Hoare, 1972)....	23
Figura 9.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM32).....	37
Figura 10.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM53).....	38
Figura 11.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM81).....	39
Figura 12.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM98).....	40
Figura 13.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM100).....	41
Figura 14.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM36).....	42
Figura 15.	Estudo morfométrico de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , encontradas nos 10°, 17° e 20° dias da curva de crescimento (amostra SMM1).....	43
Figura 16.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM100) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	44
Figura 17.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM53) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> :	

	diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	45
Figura 18.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM32) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	46
Figura 19.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM1) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	47
Figura 20.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM81) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	48
Figura 21.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM36) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	49
Figura 22.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (amostra SMM98) isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> : diferenciação e crescimento celular em meio LIT.....	50
Figura 23.	Extensão da curva de crescimento e diferenciação celular para a amostra SMM36 (do 20° ao 40 dia°).....	51
Figura 24.	Extensão da curva de crescimento e diferenciação celular para a amostra SMM98 (do 20° ao 40 dia°).....	51
Figura 25.	Análise da curva de crescimento e diferenciação celular do 0 ao 40° dia de curva de crescimento para a amostra SMM36.....	52
Figura 26.	Análise da curva de crescimento e diferenciação celular do 0 ao 40° dia de curva de crescimento para a amostra SMM98.....	52
Figura 27.	Mortalidade dos camundongos.....	53
Figura 28a e b.	Formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> .....	54
Figura 29.	Formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> .....	55
Figura 30a.	Forma tripomastigota; b: Aspectos de rosetas de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> .....	56

Figura 31.	Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> . 7.000x f-flagelo; bf-bolsa flagelar; c-cinetoplasto; n-núcleo.....	57
Figura 32.	Aspecto geral de miocárdio de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM98. Coloração H-E. Aumento: 20X.....	58
Figura 33.	Histopatologia de miocárdio de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM 98, com presença de infiltrado mononuclear (seta). Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	58
Figura 34.	Miocárdio de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM 98, com presença de infiltrado mononuclear (seta) e espaços intercelulares (*). Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	59
Figura 35.	Miocárdio de camundongo necropsiado com 10 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM 36, com presença de infiltrado mononuclear (seta) e espaços intercelulares (*). Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	59
Figura 36.	Intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM98, apresentando indícios de degeneração celular e necrose. Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	60
Figura 37.	Intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM98, apresentando infiltrado mononuclear. Coloração: H-E. Aumento: 20x.....	60
Figura 38.	Detalhe de um grande infiltrado mononuclear presente no intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM98. Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	61
Figura 39.	Presença de infiltrado mononuclear no fígado de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM98. Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	61
Figura 40.	Infiltrado mononuclear presente no córtex renal de camundongo necropsiado com 10 dias após inóculo de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtido da amostra SMM36. Coloração: H-E. Aumento: 40x.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Crescimento e diferenciação celular em meio LIT (~27,3) de amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> , isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> (Dados do 4º ao 20º dia).....	29
Tabela 2.	Crescimento e diferenciação celular em meio LIT (~27,3) de amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> , isoladas de <i>Triatoma vitticeps</i> (Dados do 20º ao 40º dia).....	30
Tabela 3.	Medidas das formas epimastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas no 10º dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses está a variação.....	31
Tabela 4.	Medidas das formas tripomastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas no 17º dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses está a variação.....	32
Tabela 5.	Medidas das formas tripomastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Trypanosoma cruzi</i> encontradas no 20º dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses está a variação.....	33
Tabela 6.	Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM36, isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência.....	34
Tabela 7.	Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM36, isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência (segundo inóculo).....	34
Tabela 8.	Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM98, isolada de <i>Triatoma vitticeps</i> no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência.....	35
Tabela 9.	Xenodiagnóstico de triatomíneos alimentados em camundongos inoculados com a amostra SMM98 (após 23 dias), isolados de <i>Triatoma vitticeps</i> no Estado do Rio de Janeiro.....	35
Tabela 10.	Xenodiagnóstico de triatomíneos alimentados em camundongos inoculados com a amostra SMM98 (após 60 dias), isolados de <i>Triatoma vitticeps</i> no Estado do Rio de Janeiro.....	36

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1.	A doença de Chagas.....	2
1.2	Os vetores.....	2
1.3.	<i>Triatoma vitticeps</i> .....	4
1.4.	Reservatórios silvestres.....	5
1.5.	O parasito: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.6.	Fases do desenvolvimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
1.7.	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
1.8.	Fatores determinantes da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
1.9.	Metaciclogênese.....	8
2	Revisão de Literatura.....	9
3	Material e Métodos.....	13
3.1.	Procedência dos parasitos.....	13
3.2.	Cultivo dos isolados.....	13
3.3.	Curvas de Crescimento.....	14
3.4.	Avaliação e quantificação de formas encontradas.....	14
3.5.	Confecção de esfregaços.....	14
3.6.	Estudo morfométrico.....	15
3.7.	Estudo Ultraestrutural.....	15
3.8.	Infecção experimental.....	16
3.9.	Análise da parasitemia.....	16
3.10.	Mortalidade dos camundongos.....	16
3.11.	Técnicas histológicas	17

3.12.	Histopatologia.....	17
3.13.	Obtenção do xenodiagnóstico.....	18
4	Resultados Gerais.....	24
4.1.	Curvas de crescimento.....	24
4.2.	Curva de Crescimento das amostras SMM36 e 98.....	24
4.3.	Metaciclogênese.....	24
4.4.	Metaciclogênese das amostras SMM36 e 98.....	25
4.5.	Estudo morfométrico.....	26
4.6.	Análise Ultraestrutural.....	26
4.7.	Resultados da infecção experimental e parasitemia.....	26
4.7.1	Parasitemia.....	26
4.7.2.	Mortalidade – Amostra SMM36.....	27
4.7.3.	Mortalidade – Amostra SMM98.....	27
4.7.4.	Xenodiagnóstico.....	28
4.7.5.	Estudo histopatológico.....	28
5	Discussão.....	63
5.1.	Curvas de crescimento – Resultados Gerais.....	63
5.2.	Metaciclogênese.....	63
5.3.	Estudo morfométrico.....	64
5.4.	Análise Ultraestrutural.....	65
5.5.	Resultados da infecção experimental e parasitemia.....	65
5.5.1.	Parasitemia.....	65
5.5.2.	Xenodiagnóstico.....	66
5.5.3.	Estudo histopatológico.....	67
6	Conclusões.....	68
7	Considerações finais.....	70



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana acomete de 9 a 11 milhões de pessoas em cerca de 18 países do continente americano, sendo responsável por danos sociais extremamente graves, com cerca de 90 a 120 milhões de pessoas expostas ao risco de adquirir a infecção, correspondendo a cerca de um quarto da população da América Latina (OMS, 1991; DIAS, 2000; WHO, 2002; MARTINS, *et al.*, 2003). Esta doença, assim como seu agente etiológico, o parasito *Trypanosoma cruzi*, foram descobertos por CHAGAS (1909), na cidade de Lassance, em Minas Gerais. O pesquisador, neste ano, isolou o parasito inicialmente de um triatomíneo, *Panstrongylus megistus*, encontrando-o em seguida no sangue de gato e posteriormente, no sangue de uma menina chamada Berenice. Mais tarde, seguiram-se as descobertas de *T. cruzi* em um tatu, *Dasypus novemcinctus* (CHAGAS, 1912) e em macacos CHAGAS (1924), bem como uma revisão pelo mesmo autor, do ciclo evolutivo deste parasito (CHAGAS, 1913).

SILVA (1985) revisando a literatura no período anterior a 1909, verificou a referência ao “mal do engasgo”, denominação popular referente às manifestações clínicas do megaesôfago, relatada por médicos e cientistas estrangeiros em viagens pelo Brasil no século XIX, não sendo referida a presença de triatomíneos nestas regiões.

Porém, a presença de *T. cruzi* em nosso continente, ao que tudo indica ocorre de longa data, possivelmente a partir da invasão do homem que habitava em cavernas. Tecidos encontrados em amostras de corpos mumificados indicam através de análises moleculares, resultados positivos que comprovaram a presença de fragmentos constituintes do genoma do kinetoplasto deste protozoário, o que demonstra perspectivas sobre sua evolução, futuros estudos sobre sua patogeneidade e virulência do parasito (FERREIRA, 2000).

ROTHHAMMER (1985) em estudos arqueológicos, evidenciou em múmias encontradas ao norte do Chile, sinais da forma crônica da doença de Chagas, com datação de 4.000 anos, ou seja, aproximadamente em 2500 aC. Nesta época, segundo SCHOFIELD (1988), já havia a participação ativa do triatomíneo, no caso *Triatoma infestans*, na transmissão da doença.

Na América Latina, a principal forma de transmissão da doença é a vetorial, responsável por 80% a 90% dos casos, sendo realizada pelas fezes do triatomíneo contendo formas infectantes, deixadas próximas ao local da picada ou em mucosas, quando inseto realiza o repasto sanguíneo. A transmissão transfusional é responsável por 8% a 18% dos casos descritos e a transmissão congênita (0,5% a 2%) segundo DIAS & COURA (1997). O aumento de casos por transfusão sanguínea vem sendo caracterizado como “urbanização da doença” em estudos de SOUZA *et al.* (1997), podendo ocorrer em áreas de doença endêmica ou não, na América do Sul, na América Central, e em países livres da transmissão vetorial, como Estados Unidos e Canadá (GRANT *et al.*, 1989; NICKERSON *et al.*, 1989; SCHMUNIS, 1991). A transmissão congênita está geralmente associada há nascimentos prematuros, abortamentos e placentites, ocorrendo em várias áreas da América do Sul (BITTENCOURT, 1976; AZOGUE *et al.*, 1985).

Outros mecanismos de transmissão da doença já foram observados. DEANE *et al.* (1984) observaram o ciclo completo do *T. cruzi* nas glândulas peri-anais do gambá, o qual pode disseminar as formas infectantes do parasito quando libera a secreção glandular.

A transmissão por via oral também tem sido referida por alguns autores, através da ingestão de alimentos contaminados. Um surto de doença de Chagas agudo ocorreu no

município de Catolé do Rocha, no estado da Paraíba, em 26 indivíduos que ingeriram caldo de cana contaminado pela presença de vetores infectados, ou por excretas destes, ou ainda por secreções de gambás, presentes na região (SHIKANAI-YASUDA *et al.* 1991). Segundo SOARES *et al.* (1987) *T. cruzi* pode permanecer infectivo em caldo de cana por períodos de 1 a 24 horas. Outros casos de transmissão por via oral são descritos na literatura, como é o caso de um surto ocorrido em Teutônia, no Rio Grande do Sul, por contaminação de alimentos contaminados. Segundo NERY-GUIMARÃES *et al.* (1968), os primeiros três casos relatados na Amazônia de contaminação pelo suco de açaí foram registrados em 1966, por contaminação via oral. A palmeira de açaí, juntamente com a de bacaba, cujo suco também é consumido na região e a de babaçu, são conhecidas por abrigar triatomíneos na região Norte do Brasil (VALENTE *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001), e mais recentemente os casos relatados em Santa Catarina. De acordo com MAZZA *et al.* (1936), a amamentação também é uma forma de transmissão por via oral.

Segundo BRENER & GAZZINELLI (1997), a doença de Chagas no homem, ocorre sob uma forma aguda com um período de incubação de 8 a 10 dias após a transmissão vetorial. No local da penetração das formas infectantes aparece um processo inflamatório chamado chagoma de inoculação, o qual, quando ocorre nas pálpebras ou na região da mucosa oftálmica é conhecido como sinal de Romana, em homenagem ao seu descobridor. A forma aguda da doença pode se apresentar de duas formas: aparente ou inaparente. No primeiro caso, ocorre uma alta parasitemia, com morbidade e mortalidade maior, principalmente em crianças de baixa idade. Os doentes apresentam febre, astenia, cefaléia, anorexia, mal-estar geral, sudorese, dores musculares, às vezes vômitos e diarreia, sendo possível a linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, edema generalizado ou de face e/ou de membros inferiores, exantema e raramente, meningo-encefalite. São também freqüentes sinais e sintomas de cardiopatia aguda, com miocardite e pericardite. Decorridas 2 a 12 semanas, caso o paciente resista, a parasitemia e o quadro febril tendem a desaparecer, ocorrendo transição para a forma crônica da doença. Entretanto, se houver tratamento adequado, ocorre evolução para a cura. Na forma inaparente, a doença pode até passar despercebida, uma vez que o paciente não apresenta sintomas, sendo neste caso, uma doença subclínica.

Estes casos podem evoluir para uma forma crônica indeterminada, o que ocorre na maioria dos casos não tratados, sem sintomas ou com manifestações clínicas, cardíacas, digestivas ou nervosas, e exames eletrocardiográficos e radiológicos normais, sendo a doença evidenciada por sorologia ou métodos parasitológicos, sendo a forma mais freqüente em áreas endêmicas e entre doadores de sangue infectados. Pode evoluir para forma crônica determinada após muitos anos ou persistir por toda a vida em 40 a 50% dos casos (LARANJA, 1956). Apresenta predominância de cardiopatia crônica chagásica, progressiva, acometendo 10 a 40% dos chagásicos crônicos, podendo evoluir de modo benigno, permitindo sobrevida de muitos anos, ou de forma maligna, com insuficiência cardíaca e morte (DIAS & COURA, 1997).

## 1.2 Os Vetores

A ordem Hemiptera representa cerca de 60.000 espécies, constituindo-se no grupo dominante de insetos de metamorfose simples (hemimetábolos). A ordem é dividida em subordens, sendo as principais: Heteroptera, Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha. Pertencem a esta ordem os conhecidos percevejos, chupanças, pulgões, fede-fedes, cigarras e outros. Caracterizam-se por possuírem as peças bucais adaptadas ao hábito picador-sugador, no qual as mandíbulas e maxilas se modificaram em estiletos esclerotinizados, alojados em um rostro,

uma cavidade do lábio, e ausência de palpos. O tamanho corporal varia de menos de um até cerca de 100 mm. Apresentam distribuição cosmopolita sendo a maior parte das espécies terrestres, embora alguns grupos estejam associados à água, vivendo na superfície ou submersos. A maioria alimenta-se de tecidos vegetais, alguns de fluidos animais e outros são hematófagos. Segundo RICHARDS & DAVIES (1984), os mais antigos registros fósseis datam do Permiano. Possivelmente, a ordem surgiu no Carbonífero, tendo sua maior diversificação no mesozóico, aliada à emergência das plantas com flores, já que as peças bucais destes insetos são altamente eficientes na extração de fluidos vegetais.

A primeira divergência entre heterópteros e homópteros se deu na aquisição, pelos primeiros, do hábito hematófago. Deste modo, a fitofagia de Heteroptera representaria um hábito secundário. Ainda, segundo estes autores, a vida aquática de alguns grupos de Heteroptera só foi possibilitada após o aparecimento do hábito carnívoro.

Os insetos vetores da doença de Chagas estão situados taxonomicamente na subfamília Triatominae, a qual compreende de 137 espécies CARCAVALLO et al. (2000). Atualmente se reconhecem 17 gêneros distribuídos em seis tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini.

A principal forma de transmissão é a vetorial, quando o parasito é transmitido ao hospedeiro através dos insetos hematófagos. Dentre as várias espécies de triatomíneos, os representantes dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, são os de relevância central para a transmissão da doença. Há espécies totalmente adaptadas ao domicílio como o *Triatoma infestans* (WHO, 1991), enquanto outras habitam o peridomicílio ou ambientes silvestres. Na Colômbia, *Triatoma dimidiata* que é o segundo vetor em importância no país, tem hábitos muito diferentes de *Rhodnius prolixus*. Suas colônias são pequenas e encontradas em casas da área urbana. Na área rural é encontrado nos três ambientes: silvestre, entre pedras ou tocas de animais dos quais se alimentam; no peridomicílio, em refúgios artificiais que o homem propicia (em montes de lenha, materiais de construção ou galinheiros), podendo alimentar-se de diferentes fontes, consequentemente aumentando a possibilidade de infectar-se com *T. cruzi* ou *T. rangeli*, visando esporadicamente os domicílios humanos; e em ambientes estritamente domiciliares, alimentando-se de animais sinantrópicos e domésticos, inclusive o homem.

A primeira espécie de triatomíneo relatada na literatura foi *Cimex rubro-fasciatus*, descrita por DE GEER (1773) e posteriormente designada por LAPORTE (1933) como espécie tipo do gênero *Triatoma* segundo LENT & WYGODZINSKY (1979).

De acordo com USINGER et al. (1966), inicialmente, os triatomíneos conviviam com roedores, no vale de Cochabamba, adaptados às habitações do homem pré-colombiano. Outra evidência de que a convivência de triatomíneos com os povos indígenas vem desde a época pré-colombiana, é a nomenclatura variada utilizada para identificação destes insetos, fato não observado em tribos Guarani, as quais não apresentavam qualquer palavra que definisse esses insetos, em seu vocabulário SCHOFIELD (1988).

No Brasil, a primeira referência sobre a presença de uma espécie de triatomíneo no domicílio, foi *Panstrongylus megistus* relatado por GARDNER (1942) ao descrever em suas expedições no nordeste brasileiro realizadas entre 1836 e 1841.

A maior parte das espécies de triatomíneos ocupa habitat silvestre, outros circulam tanto no ambiente silvestre como no peridomiciliar e uns poucos tem realizado a transição completa a habitação humana segundo LENT & WYGODZINSKY (1979). Na natureza, os triatomíneos estão associados a diferentes animais. Alguns exibem uma estreita relação com alguns hospedeiros e o hábito alimentar fica restrito a ele.

As espécies de maior importância epidemiológica são aquelas que estão adaptadas aos domicílios humanos, que participam da transmissão e que possuem alta dispersão. Na

Argentina, Bolívia, Brasil, os vetores mais importantes são *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*; mais especificamente no nordeste brasileiro, outras espécies podem assumir papel especial como *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus*. No Paraguai e norte da Argentina, o principal vetor é o *Triatoma sordida*. Na América Central, Colômbia e Venezuela, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* são considerados os mais importantes (COSTA 1999; COSTA *et al.*, 2002).

### 1.3 *Triatoma vitticeps*

No presente estudo, amostras de *Trypanosoma cruzi* foram isoladas de *Triatoma vitticeps*, descrito por STAL (1859), capturados na localidade de Triunfo, Município de Santa Maria Madalena (GONÇALVES *et al.*, 1998).

*Conorhinus vitticeps*, hoje *Triatoma vitticeps* descrito por Stal (1859) que determinou o Rio de Janeiro como sua localidade tipo, muito embora sem registro definido em relação real localização tratava-se de cidade ou Estado.

Neiva (1914), registrou a ocorrência de *T. vitticeps* na localidade de Conceição de Macabu, distrito do Município de Macaé, hoje Município de Conceição de Macabu. LENT (1942) sugeriu que esta fosse considerada a localidade tipo para *T. vitticeps*. Em outro estudo realizado por PINTO (1931 apud LENT 1942) assinalou sua presença em Magé e LENT (1942) em Nova Friburgo. No estado de Minas Gerais, foi encontrada por Martins *et al.* (1940) e no Espírito Santo citado por (LENT, 1942).

Este triatomíneo possui atual distribuição geográfica restrita aos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (SILVEIRA *et al.*, 1984; CORRÊA, 1986).

Posição sistemática de *Triatoma vitticeps*:

Reino: Animal  
Filo: Arthropoda  
Subfilo: Mandibulata  
Classe: Insecta  
Ordem: Hemiptera  
Subordem: Heteroptera  
Superfamília: Triatominae  
Tribo: Triatomini  
Gênero: *Triatoma* (Laporte, 1832)  
Espécie: *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859)

O primeiro registro de infecção de *Triatoma vitticeps* por *T. cruzi*, foi realizado por NEIVA (1914), em um espécime procedente de Conceição de Macabu. De hábito primariamente silvestre, pela primeira vez foi encontrado colonizando o domicílio em mais de sete municípios; e se mostrando muito evidente em Cachoeiro do Itapemirim por (SANTOS *et al.*, 1969).

Formas semelhantes a *T. cruzi*, foram analisadas em espécimes encontrados em Alfredo Chaves, ES (4%) por SANTOS *et al.* 1969; em Cachoeiro do Itapemirim e Guarapari (25,2%) por SILVEIRA *et al.* 1983 ambos no (ES). 35,2%, FERREIRA *et al.* (1986) em 12 municípios do Estado do Rio de Janeiro; 63,70%, SESSA & CARIAS (1986) em 19

municípios do Estado do Espírito Santo e 70,2% e 51,8% respectivamente para fêmeas e machos por DIAS et al. (1989), também no (ES).

Embora apresente alto índice de infecção por *Trypanosoma cruzi*, e frequente presença no domicílio em determinadas localidades, são remotas as chances de transmissão, pois *Triatoma vitticeps* apresenta lentidão ao defecar, (Dias, 1955; DIOTAIUTI et al. 1987; GONÇALVES et al. 1988).

#### 1.4 Reservatórios silvestres

*Trypanosoma cruzi* possui uma grande diversidade genética e grande capacidade infectar uma gama de grupos de mamíferos. Porém, a estreita associação do parasito com hospedeiros particulares, desde sua origem até os dias atuais, é um aspecto que requer mais estudos.

A história evolutiva de *T. cruzi* está associada à radiação adaptativa da mastofauna e como também de focos enzoóticos dentro do continente americano. Roedores e primatas, em particular têm uma antiga história evolutiva na América do Sul, uma vez que, acredita-se, chegaram ao subcontinente, procedentes da África, há 38 milhões de anos (Oligoceno). Não se tem registros que confirmem esta associação (BARRETO, 1979; SCHOFIELD, 2000).

A maioria dos estudos realizados sobre *T. cruzi*, que citam animais silvestres como potenciais reservatórios, se restringem ao gambá (Didelphidae) que apresenta um hábito sinantrópico.

Sabe-se, entretanto, que o estudo das infecções naturais é fundamental para determinar os reservatórios de uma parasitose. Um reservatório é definido como espécie ou complexo de espécies que mantém por longo tempo as populações do agente infeccioso (COURTENAY et al., 2002), cumprindo os seguintes quesitos:

Manter as diferentes subpopulações do parasito no espaço e tempo para cada ecossistema;

Ser fonte para a infecção humana e ou animal, através de uma carga parasitária, no sangue ou fluidos adequados para a transmissão;

Apresentar uma densidade populacional apropriada para facilitar o encontro mamífero-vetor, ou em alguns casos, mamífero-mamífero;

- Mostrar-se em simpatria permanente ou temporária com outros reservatórios, vetores ou serem sinantrópicos.

A virulência e a transmissibilidade são definidas, por ARAÚJO (2000) como a capacidade do parasito de se multiplicar dentro de qualquer micro-ambiente do hospedeiro, e de manter a carga parasitária adequada para passar ao próximo elo da cadeia de transmissão. Estes parâmetros, condicionados pela interação hospedeiro-parasito modulam o curso das parasitoses.

#### 1.5 O parasito: *Trypanosoma cruzi*

A infecção por *Trypanosoma cruzi* considerada, inicialmente uma enzootia, passou a ser caracterizada como uma zoonose, quando o homem invadiu o habitat silvestre, aproximando os triatomíneos do domicílio. Desta forma, a transmissão de *T. cruzi* ficou

constituída de um ciclo silvestre, onde o parasito circula entre os mamíferos e vetores silvestres; e um ciclo domiciliar, onde a infecção é assegurada pelo contato entre os mamíferos e vetores silvestres e sinantrópicos com os domésticos e domiciliados, inclusive o homem (BARRETTO, 1979; FORATTINI, 1980).

A disseminação desta infecção passa a ter fundamental importância, quando o homem e os animais domésticos susceptíveis à transmissão por *T. cruzi* estão no mesmo ambiente e também devido à ocupação dos triatomíneos ao ambiente domiciliar.

Agente etiológico da doença de Chagas, *T. cruzi* tem sido razão de inúmeros questionamentos, tanto pela sua morfologia, comportamento e biologia, quanto pelos aspectos clínicos que envolvem esta doença. Pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, este protozoário que apresenta formas morfológicas e características diferenciadas, pode apresentar variações em sua estrutura de acordo com sua localização no organismo do hospedeiro vertebrado ou invertebrado.

### **Posição taxonômica de *Trypanosoma cruzi*, segundo (LEVINE *et al.*, 1980):**

Reino: Protista; Subreino: Protozoa; Filo: Sarcomastigophora; Subfilo: Mastigophora; Classe: Zoomastigophora; Ordem: Kinetoplastida; Subordem: Trypanosomatina; Família: Trypanosomatidae; Gênero: *Trypanosoma*; Seção: Stercoraria; Subgênero: *Schizotrypanum*  
Espécie: *Trypanosoma cruzi*.

### **1.6 Fases do desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* evolui durante seu ciclo apresentando formas diferenciadas, que podem ser evidenciadas pela posição do cinetoplasto e a região nuclear. Os estágios de tripomastigota são evidenciados no mamífero e no inseto (formas infectantes), o cinetoplasto, localizado na região entre o núcleo e a extremidade posterior do corpo do parasito, possuindo uma membrana ondulante como nos epimastigotas, os flagelos emergem de uma bolsa flagelar de onde são implantados; as formas epimastigotas são mais largas e alongadas que as anteriores, a posição do cinetoplasto, está localizada na porção anterior ao núcleo, pois a bolsa flagelar estreita-se, abrindo lateralmente; as formas amastigota, estágios arredondadas, são bem curtos, e se multiplicam na região intracelular do mamífero incluindo o homem (REY, 1991; BRENER, 1999).

### **1.7 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

Este flagelado é um modelo estudado por vários grupos de pesquisa e seu ciclo biológico envolve dois processos intermediários: um no triatomíneo e o outro no mamífero incluindo o homem. Apresenta três fases de desenvolvimento morfológico e funcionais bem definidos, que são: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (DE SOUZA, 1984).

Dentro do inseto, posterior à ingestão das formas sanguícolas, encontram um meio favorável onde assumem a forma epimastigota. Estas formas replicam-se no do intestino do inseto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos (formas infectantes), já na porção posterior do intestino. Quando os insetos se alimentam de sangue, liberam as formas infectantes em suas excretas (fezes e urina) que no caso de infecção, penetram no corpo do

futuro hospedeiro através da ferida invadindo o tecido. O parasito diferencia-se em forma amastigota e que, por conseguinte, cai na corrente sanguínea, transformando-se em tripomastigota metacíclica, que é liberado no sistema circulatório, infectando novos tecidos.

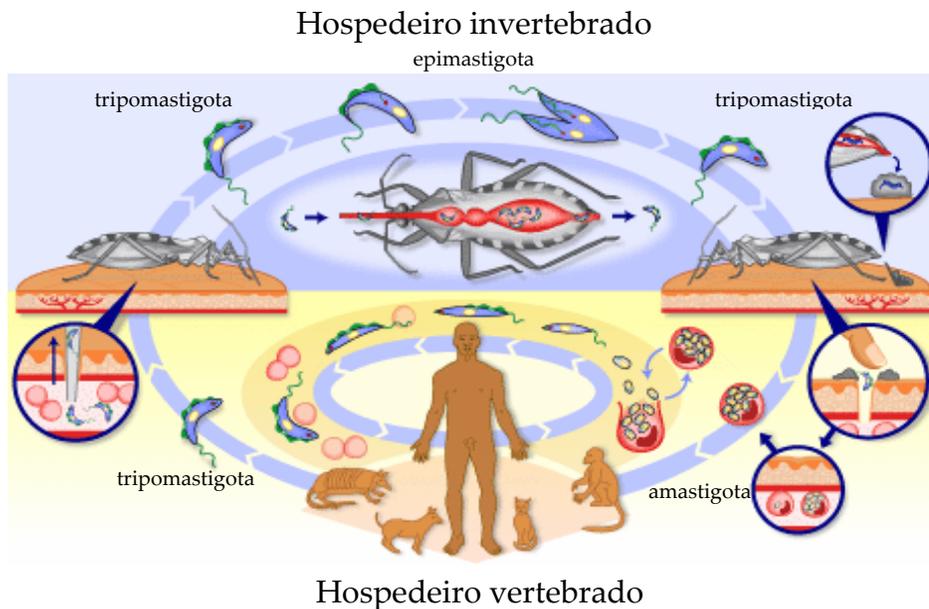
### 1.8 Fatores determinantes da infecção por *Trypanosoma cruzi*

Dentre os fatores que propiciam a ocorrência de infecção, estão o contato de pessoas com triatomíneos infectados com o parasito; o grau de antropofilia deverá ser bastante elevado; tempo mínimo entre a picada e a defecação; número e quantidade de evacuações, levando em conta o número de parasitos liberados nas fezes e urina do inseto vetor da doença de Chagas.

A infecção depende do percentual obtido pelas formas infectantes nas fezes e urina do barbeiro, como também sua capacidade de penetração associada ao nível de irritação e ao prurido apresentado pela reação alérgica decorrente da picada.

É importante enfatizar que as fezes estão misturadas à urina, onde são encontradas formas tripomastigotas metacíclicas que, em resposta ao estresse nutricional se diferenciam no tubo digestivo posterior do inseto a partir de formas epimastigotas.

Levando em consideração que a infecção se dá pelas fezes e urina do triatomíneo, é de grande importância que seja observado o tempo de defecação (COURA, 2003).



**Figura 1:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (Modificado de: TDR/Wellcome Trust. Acesso em: 1/02/2006 [www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm)).

### 1.9 Metaciclogênese

A busca por um sistema que estimulasse a diferenciação das formas epimastigotas de *T. cruzi* para tripomastigotas metacíclicas *in vitro* sempre foi prioridade entre os pesquisadores interessados em doença de Chagas, uma vez que o estabelecimento de um meio de cultivo definido facilitaria não somente o estudo do processo de diferenciação propriamente dito, mas também os estudos do metabolismo e das necessidades nutricionais do parasito (BRUN & JENNI, 1985).

Vários autores obtiveram formas metacíclica de *T. cruzi* em meios não definidos. CAMARGO (1964) comparou o crescimento e diferenciação de formas epimastigotas em dois meios líquidos: um completo – LIT (*Liver Infusion Tryptose serum medium*) e outro incompleto – LAS (*Lactoalbumin serum médium*), obtendo tripomastigotas metacíclico em ambos. CASTELLANI *et al.* 1967, desenvolveram duas variações do meio LIT que promovem níveis de diferenciação superiores a 70%. WOOD & PIPKIN (1969), utilizando um sistema baseado no meio GMA (*Grace's medium for Antheria*) desenvolvido por GRACE (1962), obtiveram grandes percentagens de formas tripomastigotas metacíclico. PAN & WYATT, (1971), desenvolveu dois meios líquidos chamados F-29 e F-32 para cultivo em série de formas amastigotas de *T. cruzi*. SULLIVAN (1982) desenvolveu um meio semi-definido, suplementando o meio GMA com 10% de soro fetal bovino, obtendo índices de diferenciação superiores a 90%.

As transformações morfogênicas de *T. cruzi*, após a ingestão sanguínea contendo formas tripomastigotas, ocorrem no trato digestivo do vetor, desde sua passagem por esferomastigotas e/ou epimastigotas metacíclicos, decorrente de uma série de divisões, até originarem as formas infectantes, fechando assim o ciclo evolutivo deste flagelado no triatomíneo. Esses fenômenos morfogênicos podem estar relacionados às alterações fisiológicas, a ação de fatores digestivos e hemolíticos podendo atuar diretamente na inibição ou não de sua evolução (BRONFEN *et al.*, 1997).

Segundo ÁVILA *et al.* (2003), o processo de metaciclogênese ocorre durante a transformação das formas epimastigotas em tripomastigosta metacíclicas (forma patogênica).

A metaciclogênese é um modelo apropriado para a investigação à cerca da diferenciação de *T. cruzi*, pois esse processo pode ser repetido *in vitro*, e através de procedimentos pré-estabelecidos promovendo a produção de formas tripomastigota (CONTREVAS *et al.*, 1985). Submetendo formas epimastigota ao estresse nutricional em meio artificial, utilizando a urina artificial de triatomíneo (TAU), pode-se também obter momentaneamente formas tripomastigota, como também, através da incubação, em meio suplementado e com adição de TAU 3AAG.

Muitos são os questionamentos a cerca da doença de Chagas, que ainda hoje é fator de risco para cerca de 120 milhões de pessoas na América Latina, que correm o risco de infecção.

A relevância deste trabalho está na possível correlação com o modelo experimental utilizado e entre os dados obtidos e os tipos de manifestações clínicas desta doença, já que a mesma ocorre em graus diferenciados e/ou, fases que apresentem alta ou baixa virulência e fase crônica em chagásicos.

Para compreender estes aspectos, objetivamos a caracterização morfobiológica, através de obtenção de curva de crescimento com a verificação da porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas (metaciclogênese). A caracterização morfométrica, nos tempos das curvas de crescimento. Além disso, pretendemos avaliar a distribuição das amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro; dentro de uma mesma área e entre as áreas de captura na localidade. Será também objetivo deste estudo, a análise histológica realizada através da inoculação em camundongos e avaliação de mortalidade, parasitemia, histopatologia assim como a realização de xenodiagnóstico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana tem sua epidemiologia condicionada pelos triatomíneos, por *Trypanosoma cruzi* e seus reservatórios.

A caracterização do parasito *T. cruzi*, procedente de diferentes hospedeiros, através de técnicas morfológicas, biológicas, bioquímicas, moleculares e/ou sorológicas LAINSON *et al.* (1979); MONTOYA *et al.* (2003) visa contribuir para o esclarecimento do significado biológico, com repercussão dessa variabilidade na clínica e na epidemiologia dessa enfermidade, sendo importantes para o desenvolvimento de métodos imunoprofiláticos e terapêuticos.

O polimorfismo apresentado por este parasito tem sido objeto de estudo desde a sua descoberta por CARLOS CHAGAS (1909), quando este assinalou e atribuiu, ao dimorfismo sexual, as diferentes formas encontradas nos diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados e nos meios de cultura. DIAS (1940), baseado no estudo biométrico e comportamental de parasitos isolados de morcegos, observou uma semelhança de outros tripanosomatídeos com *T. cruzi* e sugeriu a existência do grupo *cruzi*. A partir de então, o termo “*Trypanosoma cruzi* – like” passou a ser usado para identificar os parasitos aparentemente indistinguíveis morfológicamente de *T. cruzi*, encontrados em animais provenientes ou não de áreas endêmicas. Entretanto, BARRETTO (1965) considerou que alguns ítems seriam importantes para o diagnóstico de *T. cruzi*, sugerindo os seguintes parâmetros para caracterização: 1) semelhança morfológica; 2) coincidência dos dados biométricos, particularmente o comprimento total médio e o índice nuclear médio; 3) cultivabilidade em meio ágar-sangue; 4) evolução no tubo digestivo de triatomíneos com desenvolvimento de tripanosomos metacíclicos no intestino posterior; 5) infectividade para animais de laboratório; 6) multiplicação natural ou experimental nos tecidos do hospedeiro vertebrado; 7) desenvolvimento de imunidade contra amostras virulentas de origem humana.

Entretanto, têm sido escassos os estudos em busca de resultados que promovam um melhor entendimento à cerca da correlação entre o polimorfismo e o comportamento biológico por *T. cruzi*. Essas dificuldades aumentam ainda mais quando se tenta correlacionar os aspectos patogênicos aos morfológicos, como também os respectivos casos clínicos, tanto no homem como em animais experimentais (FERRIOLLI-FILHO *et al.*, 1968; ANDRADE *et al.*, 1970; BELDA-NETO, 1974).

Segundo BRENER (1969), através da morfologia, ou seja, os tipos de formas encontradas, finas ou largas, podem ter maior ou menor afinidade celular, dependendo de sua espessura, onde as mais delgadas seriam capazes de penetrar mais rapidamente nas células dos vertebrados do que as formas mais largas. A ação patogênica do parasito para o hospedeiro também seria muito variável e segundo ANDRADE (1970), isso deve a diversos fatores, dentre eles as características morfológicas.

A análise gênica de *T. cruzi* em estágios específicos, poderá contribuir para a avaliação crítica dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão genética em tripanosomatídeos (ÁVILA *et al.*, 2003; MINNING *et al.*, 2003).

Estudos realizados por LAURIA-PIRES *et al.* (1997), mostraram que linhagens clonais derivadas de estoques de parasitos, podem ter características biológicas diferentes às apresentadas do isolado original de paciente chagásico, e que marcadores comportamentais, como também estudos em níveis moleculares adicionais podem ser utilizados para uma caracterização de estoques de *T. cruzi*, a fim de identificar se possível, as correlações com a patologia.

Além das técnicas morfológicas, a análise de isoenzimas tem sido largamente empregada em estudos taxonômicos e de caracterização de *T. cruzi*, constituindo-se em um bom marcador epidemiológico da doença de Chagas. A primeira abordagem sobre a heterogeneidade de *T. cruzi* foi feita por MILES *et al.* (1977) quando distingüiram dois grupos enzimáticos, um relacionado com o habitat silvestre, e outro com o habitat domiciliar, ambos definidos posteriormente como tipo I e tipo II, respectivamente. Associando os isolados de diferentes habitats, MILES *et al.* (1980) distingüiram três padrões denominando-os de Z1, Z2 e Z3, sendo Z1 e Z3 referentes ao habitat silvestre e Z2 ao domicílio.

Entretanto, PINHO *et al.* (1996) ao encontrarem os zimodemas (Z1 e Z2) no habitat silvestre demonstraram a complexidade do ciclo silvestre, tornando-se questionável a padronização estabelecida por (MILES *et al.*, 1977, 1980 e 1981).

A definição destes padrões vem possibilitando o esclarecimento da dinâmica deste parasito entre os habitats silvestre e domiciliar, associada aos hospedeiros (vertebrados e invertebrados), contribuindo, desta forma, para uma melhor compreensão epidemiológica da área estudada (STEINDEL *et al.*, 1995; PINHO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1997).

FERNANDES *et al.* (1994), mostraram a importância da investigação a cerca da presença de triatomíneos passíveis de infecção por *T. cruzi* que circulam no peridomicílio e intradomicílio, representando assim, um elo importante na transmissão da doença de Chagas.

A evidenciação de novos zimodemas, além dos clássicos Z1, Z2 e Z3, vêm demonstrando a heterogeneidade nos perfis isoenzimáticos de isolados de *T. cruzi* (LÓPEZ-OLMOS *et al.*, 1998). A dificuldade de correlacionar os padrões isoenzimáticos com os aspectos biológicos, pode ser explicadas pela influência que os parasitos sofrem em decorrência da dispersão do vetor, da migração do hospedeiro vertebrado e das próprias características geográficas (altitude/clima), assim como do processo de seleção entre as cepas (TIBAYRENC *et al.*, 1986, TIBAYRENC & AYALA, 1988).

Além das abordagens citadas, a aplicação da microscopia eletrônica tem trazido inúmeras contribuições ao estudo dos protozoários patogênicos utilizando também técnicas como a criofratura, citoquímica, imunocitoquímica, reconstrução tridimensional e microanálise de raios-X, dentre outras. Nos últimos 25 anos, os estudos têm sido direcionados principalmente para o conhecimento da superfície celular analisando o glicocálice, a bicamada lipídica e os microtúbulos sub-peliculares (DE SOUZA, 2002).

Estudos sobre a organização tridimensional dos parasitos, revelados através de réplicas de células submetidas à técnica de criofratura e o uso de lectinas conjugadas a ouro coloidal demonstraram a composição dos glicoconjugados distribuídos na membrana do corpo e do flagelo (PIMENTA *et al.*, 1989).

Estes estudos sobre a superfície celular, abordando os componentes proteicos, lipídicos e glicoproteicos, estão fundamentados no importante papel que representa a interação parasito x hospedeiro vertebrado e invertebrado.

Do ponto de vista morfológico, a superfície celular pode ser considerada como composta de três estruturas: glicocálice, microtúbulos subpeculiares e bicamada lipídica. O glicocálice de *T. cruzi* mostra-se como um revestimento muito delgado nas formas epimastigotas e amastigotas, enquanto que nas formas tripomastigotas são mais evidentes, segundo (DE SOUZA, 1999).

A invasão de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos e células musculares por endocitose, através de adesão e internalização mediados por diferentes componentes capazes de reconhecer especificamente formas epi ou tripomastigotas, vem sendo intensamente analisada sob o ponto de vista morfológico e citoquímico da interação parasito-célula hospedeira (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 1992).

Estudos morfológicos mostraram significativas diferenças em algumas organelas durante o processo de metaciclo-gênese, tendo sido estes estudos complementados por análises estereológicas em cortes ultrafinos para microscopia eletrônica (SOARES *et al.*, 1992).

Além destes, o isolamento da membrana plasmática com a finalidade de estudar frações purificadas contribuiu enormemente para definir suas propriedades imunológicas, conteúdo enzimático e papel funcional. (DE SOUZA, 1999).

As abordagens citadas acima bem como a análise de estruturas internas como os microtúbulos subpericulares, o citoplasma, vesículas pinocíticas, lisossomas e estruturas multivesiculares dentre outras, tem sido amplamente investigadas através das cepas padrão, pouco se conhecendo sobre estas em parasitos isolados de triatomíneos silvestres.

A compreensão do processo de metaciclo-gênese pode contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos em relação à doença de Chagas. Durante a metaciclo-gênese *in vivo*, as formas epimastigotas diferenciam-se no intestino, aderindo ao epitélio retal do inseto antes que a transformação ocorra (BÖKER & SCHAUB, 1984; DE SOUZA, 1984). Estas formas encontradas se aderem através do flagelo e também indiretamente por interdigitações com outros parasitos (KOLLIEN *et al.*, 1998). Estudos desenvolvidos por BÖKER & SCHAUB (1984); ZELEDON *et al.* (1984) mostram também que seria um pré-requisito, a diferenciação das formas durante a infecção, onde estariam envolvidas interações de moléculas hidrofóbicas intraespecíficas no epitélio cuticular no intestino do inseto.

Trabalhos posteriores mostram que o desenvolvimento da metaciclo-gênese de *T. cruzi* estaria sendo estimulada por ativadores cíclicos do adenilato ciclase (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988; FRAIDENRAICH *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 1995). Embora diversos fatores sejam identificados, os mecanismos e os eventos envolvidos para o início da metaciclo-gênese permanecem desconhecidos. Contudo, os processos envolvidos nas mudanças morfológicas que ocorrem durante a diferenciação de *T. cruzi* estão relacionados à expressão dos diversos genes específicos (HEARTH *et al.*, 1990; COOPER *et al.*, 1991; BONALDO *et al.*, 1991; SCHENKMAM *et al.*, 1994; DI NÓIA *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 1995; TOMÁS & KELLY, 1996; TOMÁS *et al.*, 1997).

Vários estudos têm demonstrado que a diversidade morfológica de *T. cruzi*, reflete no comportamento biológico e na patogenicidade das amostras coletadas em regiões diferentes ou mesmo entre amostras de uma mesma região. Também tem sido evidente em vários estudos, que a variação das lesões e aspectos clínicos da doença de Chagas é determinada pelo histotropismo das diferentes cepas de *T. cruzi*, que é predominante ou específico para certos tipos de células dos mamíferos, principalmente macrófagos, neurônios, células musculares esqueléticas e cardíacas. Dentre estes, BALDINEZ (1945), assinalou um reticulotropismo ou um miotropismo de diferentes cepas de *T. cruzi* em cães e cobaias; ANDRADE & ANDRADE (1966), compararam as lesões da cepa Y, reticulotrópica e as da cepa Colombiana, miotrópica, e mostraram que os tropismos eram mais intensos em animais imunodeprimidos; ANDRADE *et al.* (1970), realizaram a caracterização morfobiológica e histopatológica de diferentes cepas

de *T. cruzi* baseada no histotropismo das diferentes cepas; MELO & BRENER (1978), realizaram um estudo semelhante, mostrando o macrófago-tropismo das cepas Y e Berenice; CAMPOS (1927) descreveu uma cepa neurotrópica em camundongos, e ANDRADE (1985), assinalou, além das lesões em plexo de Auerbach, um parasitismo preferencial em neurônios e células satélites de gânglios nervosos com destruição neuronal pela cepa Y, em camundongos.

Estes estudos sobre a patogenicidade de *T. cruzi* em modelos experimentais tem procurado avaliar os graus de patogenicidade e histotropismo em infecções agudas e crônicas em camundongos e ratos. DEANE *et al.* (1963) compararam lesões causadas por algumas cepas de *T. cruzi*, isoladas de animais silvestres no Brasil, verificando diferenças marcantes na virulência, sem, entretanto evidenciar diferenças no histotropismo e no tipo de lesões. LAGUENS *et al.* (1980) estudaram a doença de Chagas crônica experimental de uma cepa muito patogênica (Tulahuén), acompanhando os animais durante muitos meses e verificando que as características imunológicas e histopatológicas são muito semelhantes às alterações que ocorrem na raça humana.

A análise de vários parâmetros de amostras de *T. cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*, na localidade de Triunfo, município de Santa Maria Madalena, Rio de Janeiro, foi realizada por GONÇALVES (2000), com abordagem sobre a ecologia de *T. vitticeps* e seu possível papel na transmissão do parasito, hábito alimentar do triatomíneo e alguns aspectos sobre a bioquímica e a biologia molecular de alguns isolados. Foram coletados durante dois anos de estudos na área, 465 espécimes de *T. vitticeps*, sendo examinados 202, dos quais 119 positivos para *T. cruzi*. Estes isolados foram obtidos diretamente do intestino dos insetos, e a seguir criopreservadas em nitrogênio líquido.

No presente estudo, sete amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*, capturados na localidade de Triunfo, Município de Santa Maria Madalena (GONÇALVES, *et al.*, 1998), foram caracterizados em nível morfológico, morfométrico, bioquímico, ultraestrutural e histopatológico.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Procedência dos parasitas

Os isolados estudados são provenientes de espécimes de *Triatoma vitticeps* coletados na localidade de Triunfo cuja latitude é de 22° 02' 52'' S e longitude de 41° 56', 32'' W, onde está situado o Município de Santa Maria Madalena como também Município de Conceição de Macabu, ambos do Estado do Rio de Janeiro. Foram isoladas de *Triatoma vitticeps* (Fig.2) cerca de 119 amostras de *Trypanosoma cruzi*, intituladas SMM, em áreas denominadas A, B, C, D, E e F por (GONÇALVES *et al.*, 1998) (Fig. 3).

Neste estudo foram utilizadas um total de sete amostras, cinco delas (SMM32, SMM53, SMM81, SMM98 e SMM100) isoladas dos triatomíneos capturados na área A (Figs. 4 e 5), área desmatada para dar lugar ao cultivo de banana, estando localizada a 250m de altitude e afastada 3.5km do povoado, e uma amostra (SMM36) da área B (Fig. 6), situada em um vale com vegetação preservada achando-se a 130m de altitude e distante 4 km do povoado. Estas duas áreas distam 2 km entre si sendo separadas por área montanhosa, com altitudes entre 400 a 900m, pertencentes à localidade de Triunfo, Município de Santa Maria Madalena. A sétima amostra (SMM1) é proveniente de triatomíneo capturado no povoado de Vista Alegre, do município vizinho de Conceição de Macabu, sendo denominada área F (Fig.3).

Após o isolamento das formas flageladas dos tripanosomatídeos, estas foram expostas a banho de gelo, misturando-se 2ml da cultura em 10% de glicerol estéril. Posterior a uma homogeneização, as amostras foram distribuídas em tubos estéreis próprios para criopreservação (NUNC), em seguida deixados na geladeira, ainda no banho de gelo por 30 minutos e posteriormente no freezer por 45 minutos, e finalmente, mantidos em nitrogênio líquido à -196°. Estas amostras encontram-se depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

### 3.2 Cultivo dos isolados

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras criopreservadas de acordo com o procedimento descrito acima. A cada etapa experimental, as amostras eram retiradas do nitrogênio líquido, e a partir daí crescidas e mantidas em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio NNN (NOVY & MACNEAL 1904, NICOLE 1908) acrescido de LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO 1964), como fase líquida, suplementado de 30% de soro fetal bovino. Os tubos permaneceram incubados em estufa do tipo BOD (FANEM) a 27,3°C, repicadas periodicamente a intervalos de 14 dias, para manutenção das amostras. A partir destes procedimentos, seguiram-se as metodologias específicas para as curvas de crescimento, morfometria, morfologia e histopatologia.

### **3.3 Curvas de crescimento:**

As amostras foram mantidas em meio NNN acrescido de LIT suplementado com 20% de SFB (soro fetal bovino) e, posteriormente, submetidas a quatro repiques, dois em meio NNN+LIT e dois em meio LIT, respectivamente.

A contagem para a curva de crescimento foi feita em câmara de Neubauer após diluição em salina estéril a 1:10 ou 1:100. As contagens foram iniciadas após a semeadura de  $2 \times 10^6$  organismos no último repique em meio LIT, sendo este considerado como zero dia, realizado com auxílio de contador manual. As demais leituras da curva foram feitas no 4º, 7º, 10º, 13º, 17º e 20º dias, porém para as amostras SMM 98 da área A e SMM36 da área B estendeu-se do 23º, 27º, 30º, 33º, 37º e 40º dia devido aos picos encontrados em curvas de crescimento realizadas anteriormente. Para as demais contagens, foram retiradas as médias de duas contagens em câmaras para cada amostra, a fim de se obter resultados precisos, no caso de grande margem de erro em um dos quadrantes da câmara de Neubauer, a contagem foi realizada novamente a fim de respeitar e tornar os resultados confiáveis.

A partir das médias foram confeccionados gráficos para a avaliação do crescimento das amostras em estudo.

### **3.4 Avaliação e Quantificação das formas encontradas**

Paralelamente à contagem na câmara de Neubauer, foram confeccionados esfregaços nos mesmos dias das contagens para avaliação e quantificação das formas encontradas, a partir do 4º ao 20º dia para todas as amostras, exceto as SMM36 e 98 que se estenderam até o 40º dia.

Estabeleceu-se que cada contagem cessaria quando fosse obtido um total de 200 parasitos para cada forma encontrada, em cada lâmina observada ao microscópio óptico e a quantificação foi obtida com auxílio de contador manual.

Em seguida, foi feita a verificação da porcentagem relativa à variação de formas encontradas nas lâminas em estudo.

### **3.5 Confecção de Esfregaços:**

Foram feitas distensões das formas dos estágios de epimastigotas e tripomastigotas. Estes esfregaços foram fixados com metanol por 10 minutos e corados pelo método de Giemsa tamponado (pH 7.2), após tratamento pelo HCl por 10 minutos. O tratamento com HCl, consiste no preenchimento da lâmina com uma solução de HCl 5N durante 10 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas várias vezes em um filete de água corrente retirando todo o resíduo de HCl. Estas foram deixadas secar e a seguir cobertas uniformemente com a solução corante de Giemsa tamponado durante 1 hora. Após lavar rapidamente em um filete de água as lâminas foram deixadas secando naturalmente.

#### **Solução de Giemsa tamponado:**

**Solução corante** – Para cada lâmina utilizam-se 3ml da solução tampão de coloração e para cada ml de tampão três gotas de Giemsa.

### **Tampão de Coloração:**

**Solução estoque** (preparar 1 litro de água e reservar na geladeira a 4 ° C)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2M - 280 ml

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,2M - 720 ml

### **Solução para uso:**

100 ml da solução estoque completando-se o volume a 1000ml com água destilada.

### **3.6 Estudo morfométrico:**

A morfometria foi realizada com base nas formas oriundas de culturas axênicas em meio NNN + LIT, dos estágios de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, do 10°, 17° e 20° dias, encontradas nos esfregaços preparados nos dias de leitura da curva de crescimento. Os mesmos foram fixados com metanol por 10 minutos e corados pelo método de Giemsa tamponado (pH 7.2), após tratamento pelo HCl por 10 minutos, conforme descrito no ítem acima.

Após a secagem, as lâminas foram montadas com Permount, devidamente identificadas e levadas ao microscópio óptico acoplado com câmara-clara, onde foram desenhados 30 formas epimastigotas e 30 formas tripomastigotas de cada lâmina observada.

Os seguintes parâmetros para mensuração foram utilizados: C – comprimento do corpo (sem o flagelo); L – largura do corpo (ao nível do meio do núcleo); F – comprimento do flagelo livre; PN – distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA – distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA) – índice nuclear (DIAS E FREITAS 1943); KN – distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK – distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN) – índice do cinetoplasto (DEANE & DAMASCENO 1961), (Fig. 8).

As medições foram feitas, em centímetros, com o auxílio de um curvímeter marca Tokyo Sakurai e posteriormente convertidas para milímetros utilizando-se um fator de correção. De modo a padronizar os resultados, as medições foram realizadas por uma única pessoa.

### **3.7 Estudo Ultraestrutural**

Para a análise ultraestrutural, as amostras foram retiradas dos tubos que continham meio LIT, nos mesmos dias das contagens da curva de crescimento, centrifugadas a 900g, e após a retirada do sobrenadante, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.4, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão.

➤ **Microscopia eletrônica de varredura:**

Após a fixação, o material foi colocado sobre uma lamínula revestida com poli-L-lisina para adesão dos parasitos. As lamínulas foram a seguir desidratadas em gradientes crescentes de etanol e submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico utilizando-se CO<sub>2</sub> superseco. Em seguida receberam cobertura de ouro em aparelho Balzers, com atmosfera de argônio, para então serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310.

➤ **Microscopia eletrônica de transmissão:**

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em gradientes crescentes de acetona, infiltrados e incluídos em Epon. Posteriormente a este processo, foram obtidos cortes ultrafinos, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10.

### **3.8 Infecção Experimental**

Os protocolos descritos a seguir tiveram por objetivo a observação da parasitemia, mortalidade, histopatologia e xenodiagnóstico de alguns isolados em camundongos. Foram escolhidas as amostras SMM98 (área A) e SMM36 (área B). A escolha desses isolados se deve ao fato de que as mesmas foram consideradas em estudos prévios, morfobiologicamente diferentes do padrão estabelecido.

➤ **Modelo utilizado:**

A infecção foi realizada através de um inóculo de 0,3 ml de cultura por via intraperitoneal em um total de 20 camundongos *Swiss webster* machos pesando de 18 a 20 gramas, criados no CECAL - Biotério do Campus da Fiocruz - RJ. Destes, 10 camundongos foram utilizados para a amostra SMM98 (área A) e os outros 10 restantes para a amostra SMM36 (área B). Dentre os 10 camundongos de cada amostra, cinco foram utilizados como controle. Os camundongos foram marcados individualmente em partes do corpo pré-determinadas com ácido pícrico (coloração amarela), a fim de controlar mais precisamente cada animal, da seguinte forma:

➤ **Marcação dos camundongos:**

- 01-cabeça
- 02- cauda
- 03-dorso
- 04-perna dianteira esquerda
- 05-perna dianteira direita
- 06-perna traseira esquerda
- 07-perna traseira direita
- 08-cabeça e dorso
- 09-cabeça e cauda
- 10-cabeça e pernas traseiras

### **3.9 Análise da parasitemia**

Após a inoculação, os exames de controle de parasitemia foram realizados diariamente nos camundongos de ambas as amostras, examinando-se uma gota de sangue retirada da ponta da cauda para a realização da contagem dos parasitos entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico.

### **3.10 Mortalidade**

As observações para avaliação dos índices de mortalidade entre os camundongos inoculados foram realizadas diariamente em ambas as amostras.

### **3.11 Técnicas Histológicas:**

#### **➤ Microscopia Óptica**

Os camundongos foram sacrificados e em seguida foram fixadas em formaldeído a 10% .

As amostras fixadas foram desidratadas em álcool etílico – concentrações crescentes (70%; 80%; 90%; 96% e absoluto) permanecendo por 15 minutos em cada uma dessas soluções. Em seguida foi mergulhado em solução xilol-álcool (1:1) por 15 minutos. Após esse procedimento, o material foi colocado em três séries de xilol absoluto (I, II e III) por 15 minutos cada, objetivando com isso, a clarificação dos fragmentos. Por fim, foram imersas em dois banhos sucessivos de parafina histológica, sendo que a partir daí realizamos o emblocamento final. Os blocos foram submetidos a microtomia, resultando em cortes seriados com 3 µm de espessura e submetidos a técnicas de coloração de rotina (Hematoxilina-Eosina) utilizadas no laboratório de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UFRRJ. Os cortes obtidos foram observados em microscópio óptico da marca Zeiss, pertencentes à área supracitada.

#### **➤ Hematoxilina-Eosina (GURR, 1971)**

Os cortes foram desparafinados por três séries de xilol (I, II e III) e depois hidratados em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto, 96%, 80%, 70% e 50%), água corrente e água destilada, durante um a dois minutos, em cada fase. Posteriormente, foram imersos em Hematoxilina de Delafield para corar os núcleos durante trinta segundos e lavados em água corrente por dez minutos, para diferenciação. Logo após essa etapa, foram mergulhados em solução aquosa de Eosina por um minuto, sendo banhados em água destilada para retirar o excesso do corante. A essa etapa seguiu-se a desidratação em soluções de álcoois crescentes (96%, absoluto I, II e III). Os cortes foram clarificados em xilol e montados com lamínula usando-se entelan diluído.

Interpretação: a Hematoxilina é um corante básico, corando estruturas basófilas em roxo, como os núcleos; enquanto a Eosina é um corante ácido, corando estruturas acidófilas, como o citoplasma, fibras do tecido conjuntivo e musculares, em rosa.

### 3.12 Histopatologia

Os animais foram sacrificados com 20 dias após o inóculo inicial com as amostras SMM36 e 60 dias para a amostra SMM98. Após anestesia em câmara de CO<sub>2</sub> os camundongos foram necropsiados, e retirados o coração, rim, fígado, músculo da coxa, intestino delgado e intestinho grosso para o estudo histopatológico e verificação de histotropismo.

O material retirado foi fixado em formol a 10% . Em seguida foram submetidos à rotina histológica.

### 3.13 Obtenção do Xenodiagnóstico

Foram utilizadas quatro espécies de triatomíneos para posterior avaliação sobre a possibilidade de infecção nos insetos hematófagos utilizados no presente estudo, com o isolado de *T. cruzi*, amostra SMM98. Cinco ninfas de 5º estágio foram usadas para cada uma das seguintes espécies:

- *Panstrongylus megistus*;
- *Rhodnius prolixus*;
- *Triatoma infestans*;
- *Triatoma vitticeps*

### Alimentação:

Os camundongos foram separados individualmente em cristalizadores e imobilizados em sacos de nylon.

Os espécimes de triatomíneos foram distribuídos nos cristalizadores separadamente (a nível de espécie) para que os mesmos fossem alimentos nos camundongos previamente infectados.

A alimentação transcorreu no tempo máximo de três horas.

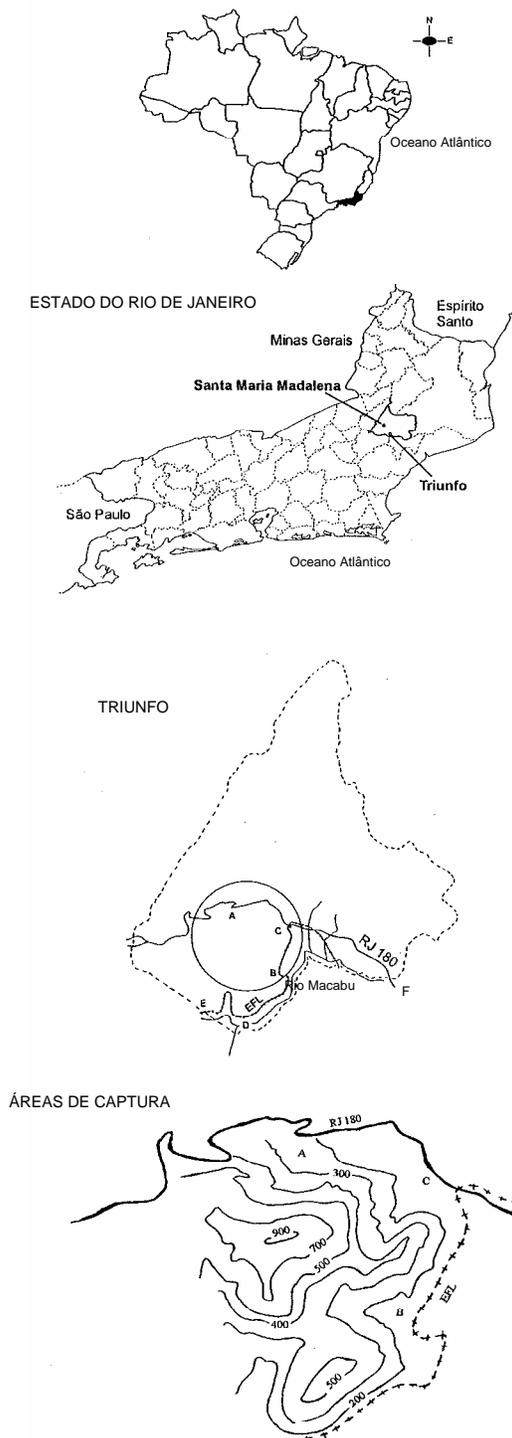
A primeira alimentação foi realizada utilizando-se camundongos inoculados com amostra SMM98. A segunda alimentação foi realizada utilizando-se camundongos livres de infecção por *T. cruzi*.

O primeiro exame ocorreu no intervalo de 23 dias posteriores à alimentação, colocando-se uma gota de salina e uma gota de fezes cada triatomíneo (separadamente) e analisado entre lâmina e lamínula e em seguida visto em microscópio óptico. .

O segundo exame foi realizado com 37 dias de intervalo, seguindo a rotina anterior.



**Fig. 2:** *Triatoma vitticeps*



**Fig.3:** Distribuição geográfica de *Triatoma vitticeps*

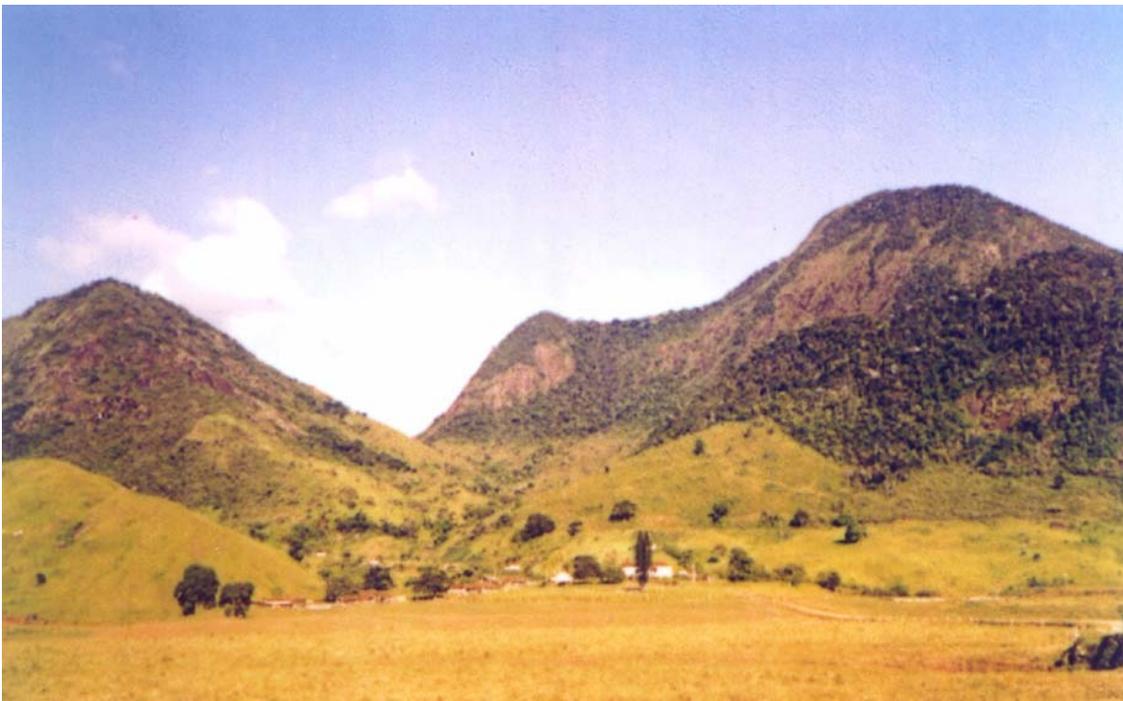


**Fig. 4 :** Vista geral da localidade de Triunfo, localizada no município de Santa Maria Madalena- RJ.

A; B e C = Áreas de captura de triatomíneos.



**Fig. 5:** Vista geral da área A.



**Fig. 6:** Vista geral da área B.



**Fig. 7:** Vista geral da área C (Sede do distrito de Triunfo).

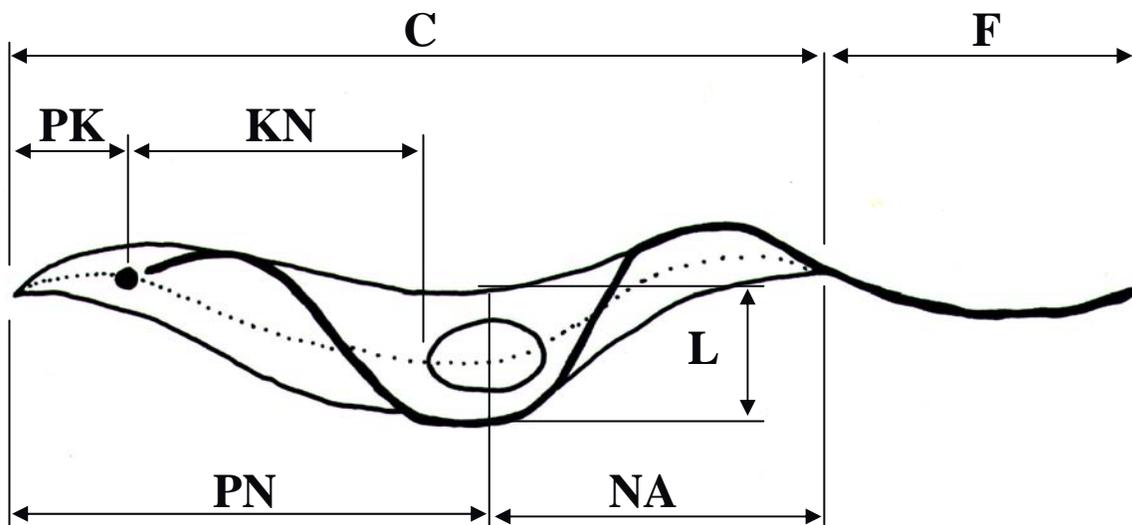


Fig. 8: Modificado de: Esquema demonstrativo dos parâmetros avaliados para realização do estudo morfométrico dos tripanosomatídeos (baseado em Hoare, 1972. C- comprimento do corpo sem o flagelo livre; L- largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F- comprimento do flagelo livre; PN- distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA- distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; KN- distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK- distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Curvas de Crescimento

#### Resultados gerais

Foram realizadas sete curvas de crescimento para as amostras SMM 1, 32, 36, 53, 81, 98 e 100 e duas novas curvas para as amostras SMM36 e 98.

O crescimento máximo em meio LIT das amostras analisadas foi observado no 4º dia para a amostra SMM100 (45.000 células/ $\mu$ l), no 7º dia para a SMM53 (52.750 células/ $\mu$ l), no 10º dia para as amostras SMM32 (33.125 células/ $\mu$ l) e SMM1 (21.000 células/ $\mu$ l), no 13º dia para a amostra SMM81 (46.000 células/ $\mu$ l) e no 20º dia para as amostras SMM36 (54.375 células/ $\mu$ l) e SMM98 (44.000 células/ $\mu$ l). As amostras SMM36 e SMM98 foram às únicas que voltaram a crescer após um sensível declínio (Tabela 1 e Fig: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22). Estes resultados demonstram a heterogeneidade encontrada nas diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*.

### 4.2 Curva de Crescimento das amostras SMM36 e 98

Conforme observado no item acima, as amostras SMM36 e 98 obtiveram crescimento máximo no 20º dia. Devido a este fato, foram realizados novos repiques para ambas as amostras com o objetivo de se avaliar o crescimento das mesmas até o 40º dia de curva de crescimento. Nas duas curvas de crescimento realizadas para as referidas amostras, foi obtido para a amostra SMM36, crescimento máximo no 33º dia (90.125 células/ $\mu$ l) seguida de declínio no final da curva (40º dia) (Fig.23). Assim como citado na curva de crescimento anterior, a amostra SMM98 também no 33º dia apresentou crescimento superior, onde foram observados (210.000 células/ $\mu$ l) porém neste caso, a amostra sofre picos durante a curva de crescimento (Tabela 2). Em relação às taxas de metaciclogênese, a amostra SMM36 possui 27,86% , enquanto que a SMM98, possui taxa média de 28,21%, ambas no 33º dia de curva de crescimento (Fig.24).

### 4.3 Metaciclogênese

Neste experimento, as taxas mais altas de metaciclogênese foram observadas entre o 10º e 20º dias, sendo nas amostras SMM1 e SMM100 (>20%) no 10º e 13º dias, respectivamente, a amostra SMM 36 (>90%) e SMM81 (>80%) no 17º dia e as amostras SMM 98 (>70%), SMM 53 (> 20%) e SMM 32 (>30%) no 20º dia. Dentre as amostras analisadas, a amostra SMM1 apresentou menor diferenciação (Tabela 1).

A amostra SMM1 revelou que formas epimastigotas aparecem em toda a curva de crescimento, enquanto que as formas tripomastigotas só aparecem a partir do 7º dia. No 10º dia esta amostra demonstrou crescimento máximo, decaindo do 13º dia ao 20º dia.

A amostra SMM100, assim como a amostra anterior exibiu formas epimastigotas em todo o processo de diferenciação e formas tripomastigotas a partir do dia 0, exceto no 4º dia da curva, sendo notado a partir do 7º dia aumentando gradativamente até o 13º dia e em seguida decaindo até o 20º dia.

A amostra SMM36, diferiu das anteriores, pois sofreu diferenciação a partir do 4º dia, onde são evidenciadas formas tripomastigotas que aparecem através de crescimento exponencial até o 17º dia, sendo que no 20º a quantidade de formas tripo é reduzida, mostrando que estas formas não sofrem um sensível declínio, o que é considerado habitual em outros estudos. Já as formas epimastigotas, sofreram um sensível declínio, a partir do 4º dia até o 17º dia, voltando a crescer no 20º dia.

A amostra SMM81 revela que as formas epimastigotas aparecem em toda a diferenciação, porém sofrem declínio a partir do 10º dia até o 17º dia, tornando a subir no 20º dia. Já as formas tripo podem ser evidenciadas somente a partir do 10º dia, chegando ao crescimento máximo no 17º dia e decaindo levemente no 20º dia.

Na amostra SMM98, observa-se a presença de formas epimastigotas em todos os dias de contagem, sendo que, a partir do 7º dia sofre um sensível declínio até o 20º dia. Já as formas tripomastigotas aparecem no início da diferenciação (0 hora), reduzindo sensivelmente no 4º dia e tornando a crescer até o 20º dia.

A amostra SMM53 exibiu formas epimastigotas em toda a diferenciação, sendo que é notado um discreto declínio do 10º dia ao 20º dia. As formas tripo somente puderam ser notadas a partir do 10º dia, aumentando levemente até o 20º dia.

A amostra SMM32, também apresentou formas epimastigotas em toda a diferenciação, porém sofre um discreto declínio do 10º dia ao 20º dia; já as formas tripo foram evidentes do 10º ao 20º dia, onde sofreram um sensível aumento.

#### **4.4 Metaciclôgenese das amostras SMM36 e SMM98**

A diferenciação celular nas amostras SMM36 e SMM98 foi observada até o 40º dia, onde pudemos verificar a ocorrência das maiores taxas de metaciclôgenese, apresentando mais de 40% no 33º dia e no 37º dia para as respectivas amostras (Tabela 2 e Figs. 23 e 24). As médias das taxas de metaciclôgenese para ambas as amostras, estiveram cerca de <30%, ou seja, obtiveram percentual bem próximos uma da outra.

A amostra SMM36 a partir do 23º dia continuou exibindo formas epimastigotas, sendo marcada por um sensível aumento no 40 dia, enquanto que as formas tripomastigotas, também estão presentes entre o 23º e 40º dia, porém neste último dia decaindo bruscamente, chegando a um número de células bastante reduzidos (Figs. 23 e 25).

Na amostra SMM98, poucas formas tripomastigotas foram evidenciadas no 23º dia, porém no 27º dia aumentaram bruscamente, decaindo do 30º dia ao 33º dia, sofrendo aumento máximo no 37º dia e decaindo novamente no 40º dia. Já as formas tripomastigotas puderam ser evidenciadas no 23º dia onde apresentou máxima diferenciação, decaindo no 27º dia, aumentando gradativamente até o 33º dia, decaindo novamente no 37º dia e tornando a subir no 40º dia de diferenciação. Esta diversidade pode ser melhor visualizadas nas (Figs. 24 e 26).

#### **4.5 Estudo Morfométrico**

A morfometria das amostras baseou-se nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, encontradas no 10º, 17º e 20º dias, procedentes das culturas utilizadas para curva de crescimento. Os dados morfométricos dos parâmetros analisados para as formas epi- e tripomastigotas encontram-se resumidos nas tabelas 3, 4 e 5 (Fig: 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

#### **4.6 Análise Ultraestrutural:**

Na análise ultraestrutural, por microscopia eletrônica de varredura, encontramos formas epimastigotas (Fig. 28 a e b) e tripomastigotas (Fig. 29 a e b) morfologicamente iguais ao *Trypanosoma cruzi* (Fig. 30 a), assim como também rosetas (Fig. 30 b) que são características próprias deste parasita.

Através da microscopia eletrônica de transmissão, em cortes ultrafinos, foi evidenciada a presença de núcleo, cinetoplasto, flagelo, alguns parasitos em divisão celular, Golgi, inclusões citoplasmáticas e outras estruturas típicas deste flagelado (Fig. 31).

Entretanto, organelas denominadas reservossomos encontrados no citoplasma de *T. cruzi*, não foram observados em nossos experimentos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que as dimensões dos estágios destas amostras estão na faixa de variação de *T. cruzi*.

#### **4.7 Resultados da infecção Experimental e Parasitemia**

##### **4.7.1 Parasitemia**

Neste trabalho após as avaliações sobre as curvas de crescimento para as sete amostras, observamos que as amostras SMM36 e SMM98 se destacaram entre as demais, mostrando um comportamento diferenciado. Por esse motivo, foram selecionadas para que fossem utilizadas em infecções experimentais, avaliação sobre a mortalidade, análise histológica como também o xenodiagnóstico.

No presente estudo, não foi possível realizar passagens (repiques) para avaliar o número de formas encontradas durante a parasitemia, pois os camundongos da amostra SMM36 apresentaram curto tempo de vida.

Os camundongos inoculados com a amostra SMM98, não apresentaram quantidade de formas de *Trypanosoma cruzi* e/ou, não foram encontrados parasitos nas análises realizadas em lâminas contendo distensões sanguíneas, sendo assim não foi possível realizar a avaliação quantitativa.

##### **4.7.2 Mortalidade - Amostra SMM36**

Neste experimento, dez camundongos foram inoculados com a amostra SMM36, proveniente da área B, localidade de Triunfo, município de Santa Maria Madalena, Rio de Janeiro. Nestes, foi realizado exame de sangue para detecção da presença de parasitos com o objetivo de verificar a virulência da amostra. O primeiro exame ocorreu seis dias após o inóculo, neste exame não foram observados parasitos, ou seja, para todos os camundongos a parasitemia foi considerada negativa (Tabela 6).

O segundo exame foi realizado oito dias após o inóculo inicial e foram observadas formas sanguíneas nos camundongos, exceto os camundongos 01 e 04 que foram ao óbito poucos dias após o primeiro exame .

Posteriormente, já no 10º dia de inóculo, morreram os seguintes camundongos: 02; 03; 05; 06; 07 e 08. Restando apenas os camundongos de número 09 e 10. Estes foram submetidos à punção cardíaca para infecção em dois novos camundongos sadios para confirmar, compreender e comparar através de novo inóculo, as altas taxas de mortalidade dos animais em estudo para a referida amostra.

Os dois camundongos foram examinados seis dias pós-inóculo e também não sobreviveram por mais de sete dias (Tabela 7). Após a morte foram necropsiados e as vísceras: rim, coração, intestino, pâncreas e músculos da coxa foram submetidas a técnicas específicas para histologia.

Esta amostra mostrou-se bastante virulenta, uma vez que a taxa de mortalidade foi bem alta.

O tempo de sobrevivência foi de no mínimo de sete dias e no máximo de 10 dias (Fig.27).

#### **4.7.3 Mortalidade - Amostra SMM98**

Os camundongos inoculados com a amostra SMM98, ao contrário da SMM36, demonstraram suportar a infecção por um longo período, o que confirma a hipótese dessa amostra apresentar menos virulência que a anterior, pois os animais sobreviveram de 18 dias a 60 dias após a inoculação dos animais. A taxa de mortalidade foi de 10% para os indivíduos testados (Tabela 8). Alcançados 60 dias após a infecção, os animais foram examinados nesta época para que fosse confirmada a infecção através do xenodiagnóstico e o estudo histopatológico.

O primeiro exame de sangue, que foi realizado seis dias após o inóculo, não apresentou positividade.

O segundo exame ocorreu com oito dias após o inóculo inicial e somente os camundongos 06 e 07 com oito dias de inoculados, apresentaram positividade (20%). Entretanto, estivessem positivos, em exames posteriores não mantiveram-se positivos.

Exames semanais continuaram sendo realizados até o 60º dia, porém não foram encontradas formas sanguíneas nos esfregaços realizados em sangue retirado da cauda de todos os camundongos inoculados com a amostra estudada, inclusive os camundongos 6 e 7.

Apenas um camundongo morreu (01) no 18º dia de infecção, os demais (02 ao10) perduraram até 60 dias. (Fig.27).

No 60º dia de inóculo, os camundongos 06 e 07 foram necropsiados para a realização do estudo histopatológico. Os camundongos 02, 03, 04 e 09 foram utilizados no xenodiagnóstico para possível confirmação de infecção dos animais.

#### **4.7.4. Xenodiagnóstico:**

O xenodiagnóstico é o método mais tradicional de se demonstrar *T. cruzi* circulantes e tem sido amplamente utilizado nas mais diversas situações epidemiológicas.

Neste experimento, um total de 20 ninfas de triatomíneos foram examinadas separadamente entre as cinco espécies estudadas. Após os 23 dias de infecção, os triatomíneos das espécies *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante o experimento, a positividade apenas pode ser observada em *Triatoma infestans*.

Baseado nos resultados obtidos, estendemos nossas observações até 60 dias de alimentação e/ou, 37 dias após o primeiro exame, tentado investigar a possibilidade de positividade nas espécies de triatomíneos estudados. Neste período foi realizado o segundo exame e o mesmo somente apresentou positividade para um dos 20 triatomíneos, confirmando que *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante os experimentos, mantendo-se infectado, apenas *Triatoma infestans* o que pode ser visualizado na Tabela 10.

#### **4.7.5 Estudo Histopatológico:**

Os exames histopatológicos mostraram que tanto a amostra SMM98 quanto a amostra SMM36 apresentam cardiotropismo (Fig. 32), uma vez que foram encontrados formas amastigotas de *T. cruzi* e infiltrado mononuclear algumas vezes de forma difusa (Fig. 33) e em outras formando aglomerados entre as células musculares (Figs. 34 e 35). Em alguns cortes evidenciamos alterações intersticiais com a observação de espaços entre as fibras musculares, sugerindo o início de um processo de degeneração tecidual (Figs. 34 e 35).

Evidências de miotropismo, ou seja, a presença de células parasitadas em músculos esqueléticos não foi observada nas duas amostras estudadas. Entretanto, notamos a presença de infiltrado mononuclear moderado principalmente em áreas perivasculares.

No intestino observa-se uma intensa vacuolização citoplasmática com indícios de degeneração celular e áreas em necrose (Fig. 36). A presença de infiltrado mononuclear é bastante evidente, não observou-se entretanto, células parasitadas (Figs. 37 e 38).

No fígado foram encontrados pequenos ninhos de formas amastigotas com moderado infiltrado mononuclear próximo (Fig. 39), assim como no rim (Fig. 40), onde além das áreas contendo estes infiltrados, também observa-se sinais de degeneração tecidual.

**Tabela T1T.** Crescimento e diferenciação celular em meio LIT (~27,3) de amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de *Triatoma vitticeps* (Dados do 4° ao 20° dia).

Amostras	Áreas	Crescimento		Metaciclôgênese	
		Médio células/ $\mu$ l	Máximo (célula/ $\mu$ l)	Taxa Média (%)	Taxa máxima (%)
SMM 32	A	20,17	33.125.000 (10° dia)	11,74	34,38 (20° dia)
SMM 53	A	34,25	52.750.000 (7° dia)	12,23	28,57 (20° dia)
SMM 81	A	26,39	46.000.000 (13° dia)	31,51	85,83 (17° dia)
SMM 98	A	36,20	44.000.000 (20° dia)	36,63	79,68 (20° dia)
SMM 100	A	24,46	45.000.000 (4° dia)	11,24	29,08 (13° dia)
SMM 36	B	32,10	54.375.000 (20° dia)	42,64	97,08 (17° dia)
SMM 1	F	13,66	21.000.000 (10° dia)	8,42	22,78 (10° dia)

**Tabela 2.** Crescimento e diferenciação celular em meio LIT (~27,3) de amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de *Triatoma vitticeps* (Dados do 20° ao 40° dia) - SMM36 e SMM98.

Amostras	Áreas	Crescimento		Metaciclôgênese	
		Médio células/ $\mu$ l	Máximo (célula/ $\mu$ l)	Taxa Média (%)	Taxa máxima (%)
SMM 98	A	114	210.000.000 (30° dia)	28,21	48,59 (37° dia)
SMM 36	B	73,06	90.125.000 (33° dia)	27,86	42,37 (33° dia)

**Tabela 3.** Medidas das formas epimastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no 10<sup>o</sup> dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses estão os valores mínimos e máximos.

Amostras	Áreas	Parâmetros de Mensuração				
		N	C	L	F	IN
SMM 32	A	30	21,1 $\pm$ 4,8 (8,7 – 31,3)	2,1 $\pm$ 0,4 (1,3 – 3,0)	9,0 $\pm$ 2,5 (4,4 – 13,9)	0,7 $\pm$ 0,2 (0,4 – 1,5)
SMM 53	A	30	23,3 $\pm$ 5,8 (12,2 – 36,5)	1,7 $\pm$ 0,3 (1,1 – 2,4)	7,9 $\pm$ 3,3 (3,5 – 17,4)	0,3 $\pm$ 0,1 (0,2 – 0,5)
SMM 81	A	30	19,9 $\pm$ 3,6 (12,2 – 26,1)	1,8 $\pm$ 0,5 (1,0 – 2,7)	6,4 $\pm$ 3,1 (2,2 – 12,2)	0,5 $\pm$ 0,2 (0,3 – 1,4)
SMM 98	A	30	19,1 $\pm$ 4,6 (12,2 – 29,6)	1,6 $\pm$ 0,3 (1,1 – 2,2)	6,4 $\pm$ 2,8 (2,2 – 13,9)	0,4 $\pm$ 0,1 (0,2 – 0,7)
SMM 100	A	30	18,7 $\pm$ 3,1 (13,9 – 25,2)	2,1 $\pm$ 0,3 (1,5 – 2,5)	6,1 $\pm$ 2,9 (2,2 – 15,2)	5,5 $\pm$ 1,4 (2,2 – 9,6)
SMM36	B	30	22,9 $\pm$ 4,1 (15,2 – 30,5)	2,1 $\pm$ 0,4 (1,3 – 2,8)	9,0 $\pm$ 2,4 (4,4 – 13,1)	0,3 $\pm$ 0,1 (0,2 – 0,7)
SMM1	F	30	17,8 $\pm$ 4,0 (9,6 – 25,2)	2,3 $\pm$ 0,3 (1,7 – 3,0)	4,7 $\pm$ 1,7 (2,2 – 9,6)	5,4 $\pm$ 1,7 (2,2 – 9,6)

C: comprimento do corpo sem o flagelo livre; L: largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA: distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA): índice nuclear, KN: distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN): índice do cinetoplasto; N: número de espécimes medidos.

**Tabela 4.** Medidas das formas tripomastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no 17º dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses estão os valores mínimos e máximos.

Amostras	Áreas	Parâmetros de Mensuração					
		N	C	L	F	IN	IK
SMM 32	A	20	16,9 $\pm$ 2,7 (12,2 – 22,6)	1,4 $\pm$ 1,2 (0,7 – 6,5)	7,1 $\pm$ 2,8 (4,4 – 15,2)	1,2 $\pm$ 0,4 (0,7 - 2,0)	0,4 $\pm$ 0,2 (0,1- 1,0)
SMM 53	A	20	26,2 $\pm$ 3,0 (20,9 - 34,8)	1,3 $\pm$ 0,3 (0,9 – 2,0)	6,1 $\pm$ 2,8 (0,9 – 13,1)	0,5 $\pm$ 0,1 (0,3 – 0,7)	3,0 $\pm$ 1,3 (6,3 – 0,9)
SMM 81	A	20	14,7 $\pm$ 2,7 (9,6 – 19,6)	0,8 $\pm$ 0,4 (0,4 – 2,2)	5,6 $\pm$ 3,0 (0,9 – 12,2)	1,0 $\pm$ 0,4 (0,5 – 1,7)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,0 – 0,8)
SMM 98	A	20	15,9 $\pm$ 2,6 (12,2 - 20,9)	0,9 $\pm$ 0,2 (0,4 – 1,3)	4,6 $\pm$ 1,9 (0,9 – 8,7)	1,2 $\pm$ 0,6 (0,7 – 2,7)	0,2 $\pm$ 0,1 (0,1 – 0,4)
SMM 100	A	20	10,7 $\pm$ 7,9 (0,0 – 20,9)	0,9 $\pm$ 0,7 (0,0 – 2,1)	3,3 $\pm$ 2,6 (0,0 – 8,7)	0,9 $\pm$ 0,4 (0,4 - 1,8)	1,5 $\pm$ 1,2 (0,7 – 6,2)
SMM 36	B	20	20,1 $\pm$ 3,3 (15,226,1)	0,8 $\pm$ 0,2 (0,41,3)	5,8 $\pm$ 1,9 (2,28,7)	1,0 $\pm$ 0,5 (0,53,0)	0,3 $\pm$ 0,1 (0,31,2)
SMM1	F	20	9,4 $\pm$ 6,9 (0,18,3)	0,8 $\pm$ 0,6 (0,02,1)	3,3 $\pm$ 2,7 (0,07,8)	1,0 $\pm$ 0,3 (0,61,7)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,00,8)

C: comprimento do corpo sem o flagelo livre; L: largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA: distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA): índice nuclear, KN: distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN): índice do cinetoplasto; N: número de espécimes medidos.

**Tabela 5.** Medidas das formas tripomastigotas ( $\mu\text{m}$ ) de *Trypanosoma cruzi* encontradas no 20<sup>o</sup> dia da curva de crescimento em meio LIT. Os dados representam a média e o desvio padrão; entre parênteses estão os valores mínimos e máximos.

Amostras	Parâmetros de Mensuração					
	N	C	L	F	IN	IK
SMM 32	20	17,3 $\pm$ 2,3 (13,1 -20,9)	1,0 $\pm$ 0,3 (0,5 - 1,7)	7,7 $\pm$ 2,3 (3,5 - 13,1)	1,1 $\pm$ 0,3 (0,8 - 1,7)	0,7 $\pm$ 0,8 (0,1 - 4,0)
SMM 53	20	25,5 $\pm$ 3,6 (16,1 -33,9)	1,3 $\pm$ 0,3 (0,9 - 2,2)	5,8 $\pm$ 2,1 (3,5 - 12,6)	0,5 $\pm$ 0,1 (0,3 - 0,7)	,4 $\pm$ 2,8 (0,9 -15,3)
SMM 81	20	14,1 $\pm$ 2,2 (10,9-20,9)	1,1 $\pm$ 0,2 (0,7 - 1,4)	5,0 $\pm$ 1,8 (0,9 - 8,7)	0,9 $\pm$ 0,4 (0,5 - 1,8)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,1 - 0,8)
SMM 98	20	16,9 $\pm$ 2,7 (13,1-22,6)	0,8 $\pm$ 0,2 (0,4 - 1,3)	4,3 $\pm$ 2,0 (0,9 - 7,8)	1,0 $\pm$ 0,4 (0,5 - 2,0)	0,3 $\pm$ 0,2 (0,0 - 1,0)
SMM 100	20	9,4 $\pm$ 6,9 (0,0 - 18,3)	0,8 $\pm$ 0,6 (0,0 - 2,2)	2,5 $\pm$ 2,3 (0,0 - 7,8)	0,9 $\pm$ 0,3 (0,6 - 1,8)	3,5 $\pm$ 2,1 (1,2 - 7,9)
SMM 36	20	19,1 $\pm$ 4,3 (13,1-27,0)	0,8 $\pm$ 0,2 (0,4 - 1,1)	5,9 $\pm$ 2,2 (2,2 - 8,7)	1,1 $\pm$ 0,8 (0,5 - 2,0)	0,2 $\pm$ 0,2 (0,3-1,2)
SMM 1	20	9,0 $\pm$ 6,7 (0,0 - 16,5)	0,7 $\pm$ 0,6 (0,0 - 1,7)	3,1 $\pm$ 3,2 (0,0 - 13,1)	0,9 $\pm$ 0,4 (0,2 - 1,8)	0,3 $\pm$ 0,3 (0,0 - 1,2)

C: comprimento do corpo sem o flagelo livre; L: largura do corpo ao nível do meio do núcleo; F: comprimento da porção livre do flagelo; PN: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do núcleo; NA: distância da extremidade anterior do corpo ao centro do núcleo; IN (PN/NA): índice nuclear, KN: distância do centro do cinetoplasto à margem do núcleo; PK: distância da extremidade posterior do corpo ao centro do cinetoplasto; IK (PK/KN): índice do cinetoplasto; N: número de espécimes medidos.

**Tabela 6.** Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM36, isolada de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência.

CAMUNDONGOS	POSITIVIDADE		SOBREVIVÊNCIA
	1º EXAME <sup>1</sup>	2º EXAME <sup>2</sup>	
<b>01</b>	(-)	(+)	7 dias
<b>02</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>03</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>04</b>	(-)	(+)	7 dias
<b>05</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>06</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>07</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>08</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>09</b>	(-)	(+)	10 dias
<b>10</b>	(-)	(+)	10 dias

<sup>1</sup>6 dias após o inóculo; <sup>2</sup>8 dias após o inóculo

**Tabela 7.** Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM36, isolada de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência.

CAMUNDONGOS	Positividade		Sobrevivência
	1º Exame <sup>1</sup>	2º Exame <sup>2</sup>	
<b>09</b>	(-)	--	<b>7 dias</b>
<b>10</b>	(-)	--	7 dias

<sup>1</sup>6 dias após o inóculo; <sup>2</sup>Não houve exame devido a morte dos animais antes do período de análise (8 dias após o inóculo)

**Tabela 8.** Parasitemia de camundongo após inoculação da amostra SMM98, isolada de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade e período de sobrevivência.

CAMUNDONGOS	POSITIVIDADE		SOBREVIVÊNCIA
	1º EXAME <sup>1</sup>	2º EXAME <sup>2</sup>	
<b>01</b>	(-)	(-)	<b>18 dias</b>
<b>02</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>03</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>04</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>05</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>06</b>	(-)	(+)	60 dias
<b>07</b>	(-)	(+)	60 dias
<b>08</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>09</b>	(-)	(-)	60 dias
<b>10</b>	(-)	(-)	60 dias

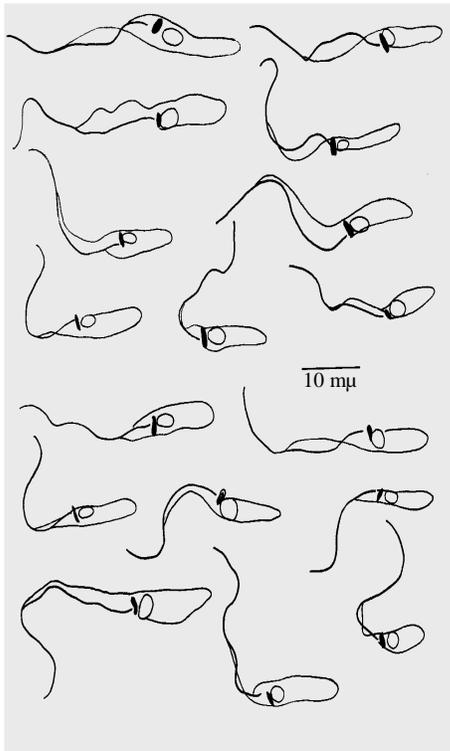
<sup>1</sup>6 dias após o inóculo; <sup>2</sup>8 dias após o inóculo

**Tabela 9.** Xenodiagnóstico de triatomíneos alimentados em camundongos inoculados com a amostra SMM98 (após 23 dias), isolados de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade.

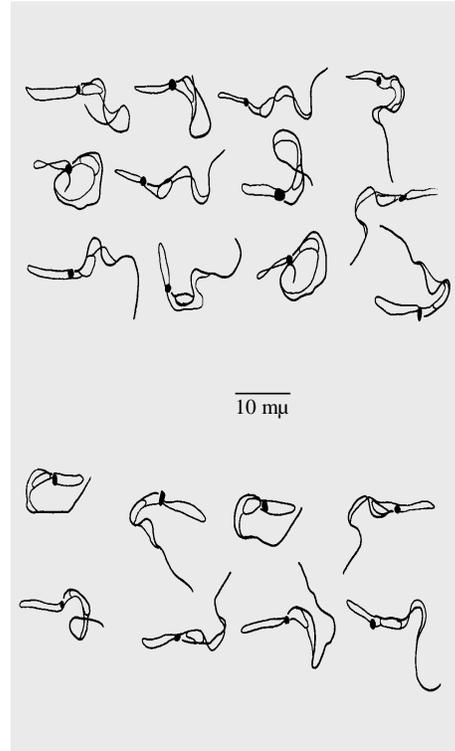
ESPÉCIES	Positividade/Ninfas de 5º estágio				
	1	2	3	4	5
<i>Panstrongylus megistus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Rhodnius prolixus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Triatoma infestans</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Triatoma vitticeps</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabela 10.** Xenodiagnóstico de triatomíneos alimentados em camundongos inoculados com a amostra SMM98 (após 60 dias), isolados de *Triatoma vitticeps* no Estado do Rio de Janeiro, com análise de positividade.

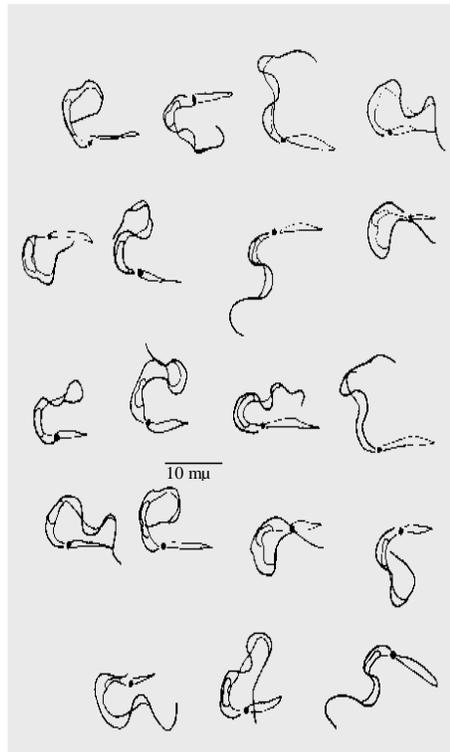
Espécies	POSITIVIDADE/NINFAS DE 5º ESTÁDIO				
	1	2	3	4	5
<i>Panstrogylus megistus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Rhodnius prolixus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Triatoma infestans</i>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Triatoma vitticeps</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)



Amostra SMM32 - 10º dia da curva de crescimento

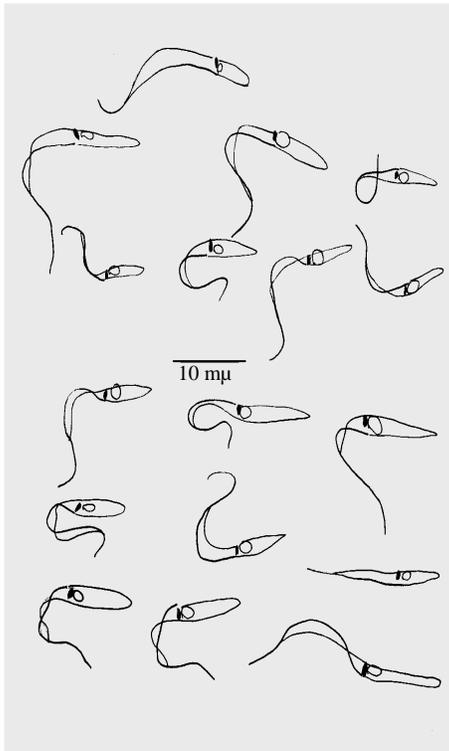


Amostra SMM32 - 17º dia da curva de crescimento

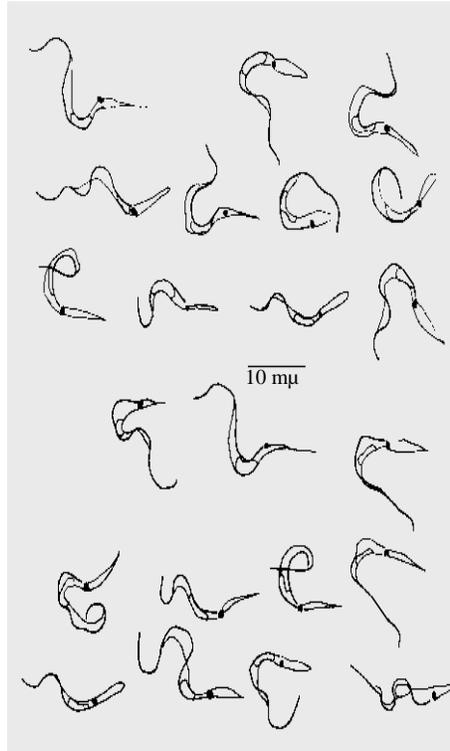


Amostra SMM 32 - 20º dia da curva de crescimento

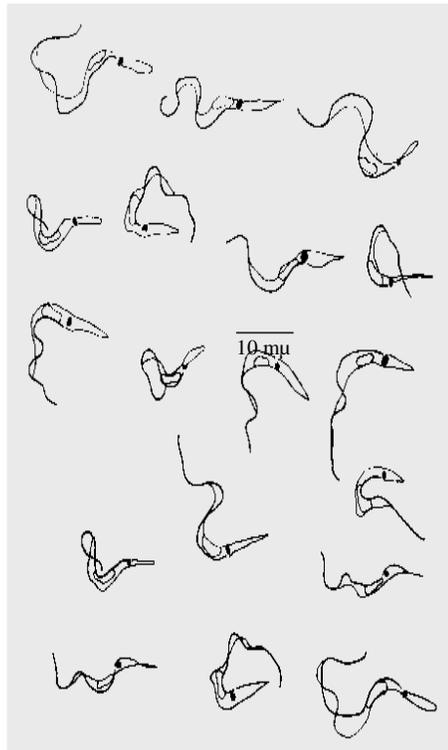
**Fig.9** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10º, 17º e 20º dia das curvas de crescimento (SMM32).



Amostra SMM53 – 10° dia da curva de crescimento

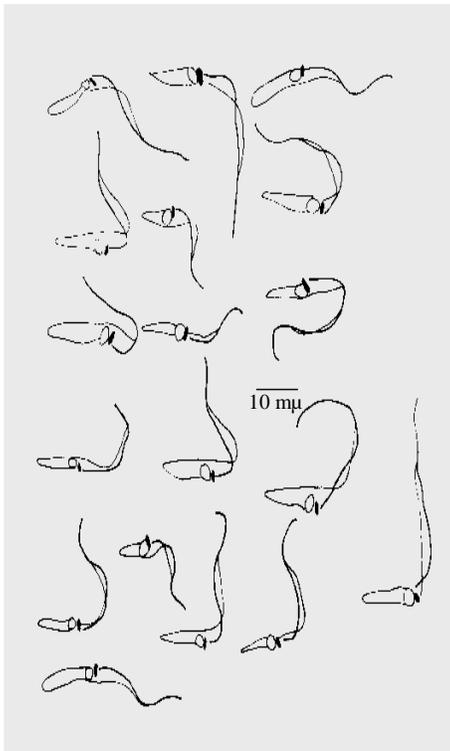


Amostra SMM53 – 17° dia da curva de crescimento

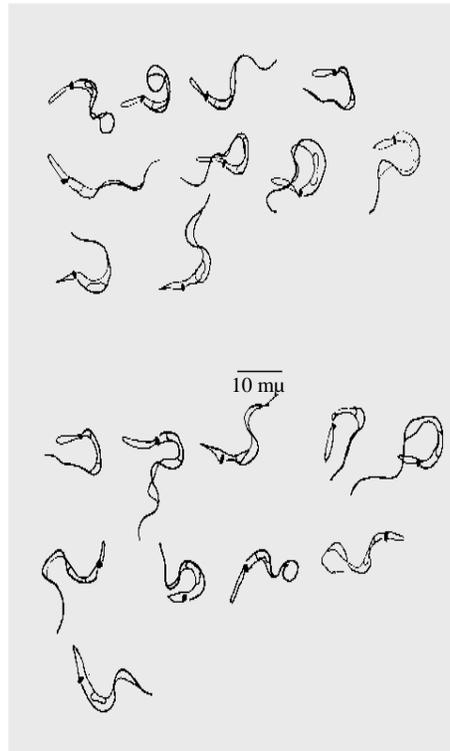


Amostra SMM53 - 20° dia da curva de crescimento

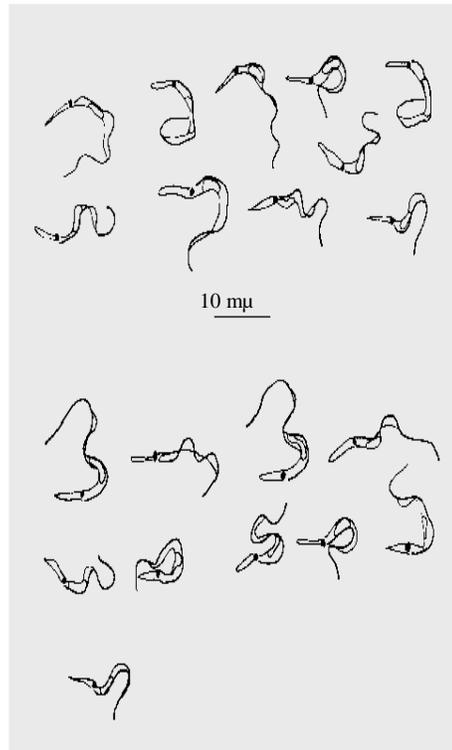
**Fig. 10:** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10°, 17° e 20° dia das curvas de crescimento (SMM53).



Amostra SMM81 - 10° dia da curva de crescimento

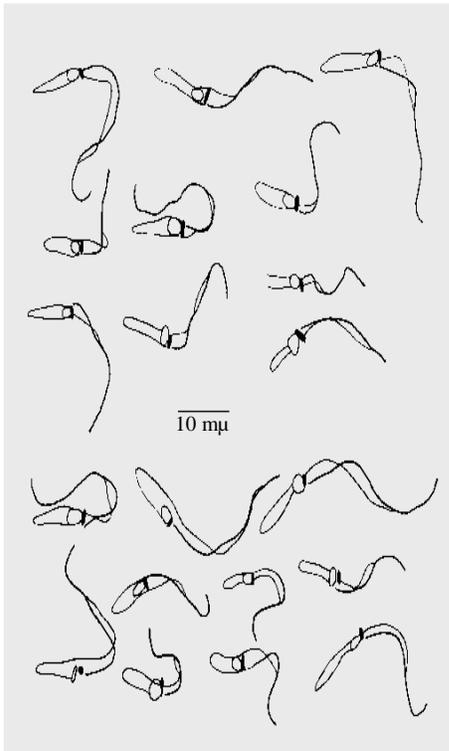


Amostra SMM81 - 17° dia da curva de crescimento

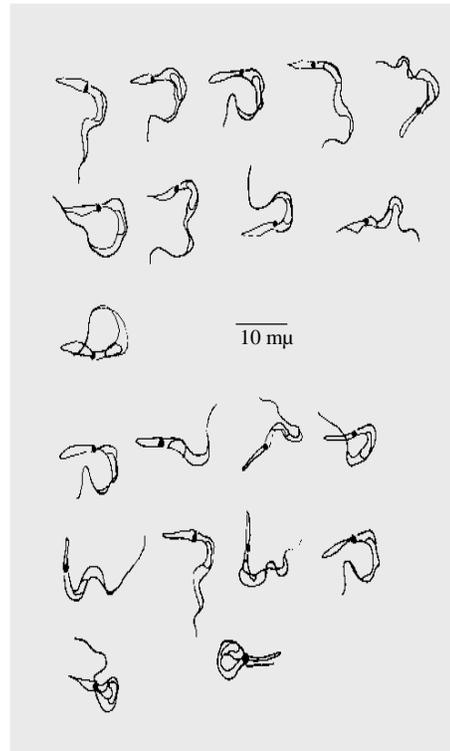


Amostra SMM81 - 20° dia da curva de crescimento

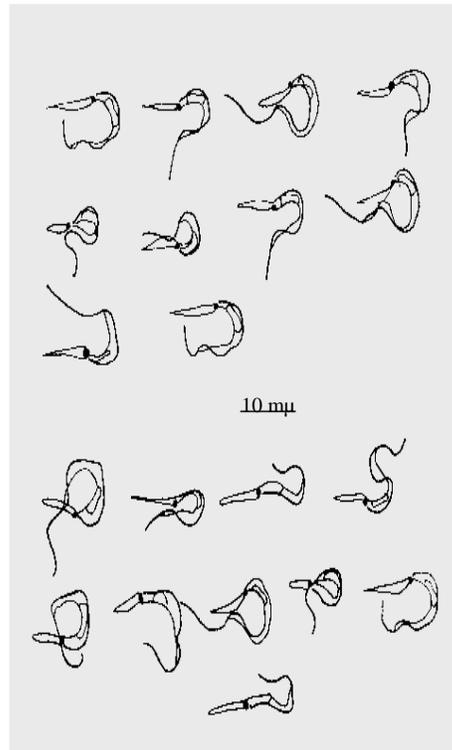
**Fig 11:** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10°, 17° e 20° dia das curvas de crescimento (SMM81).



Amostra SMM98 - 10° dia da curva de crescimento

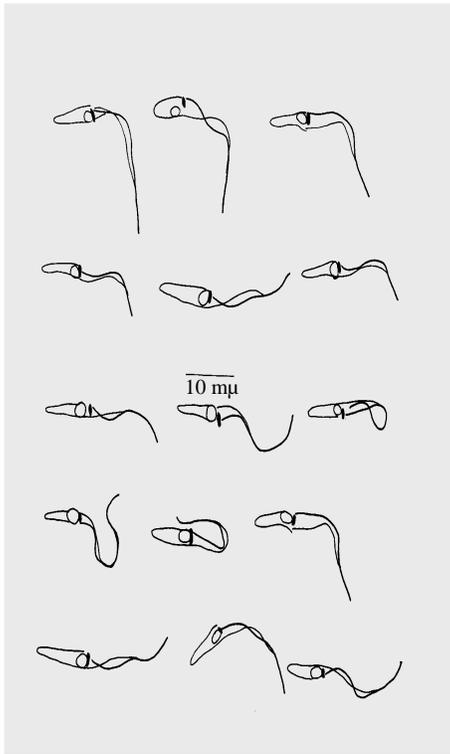


Amostra SMM98 - 17° dia da curva de crescimento

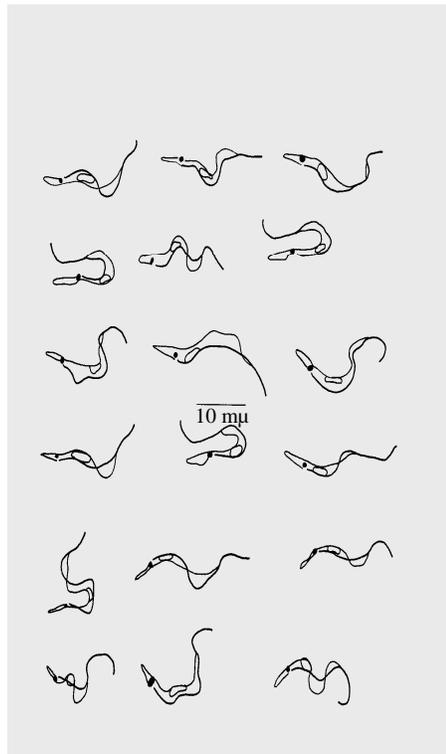


Amostra SMM98 - 20° dia da curva de crescimento

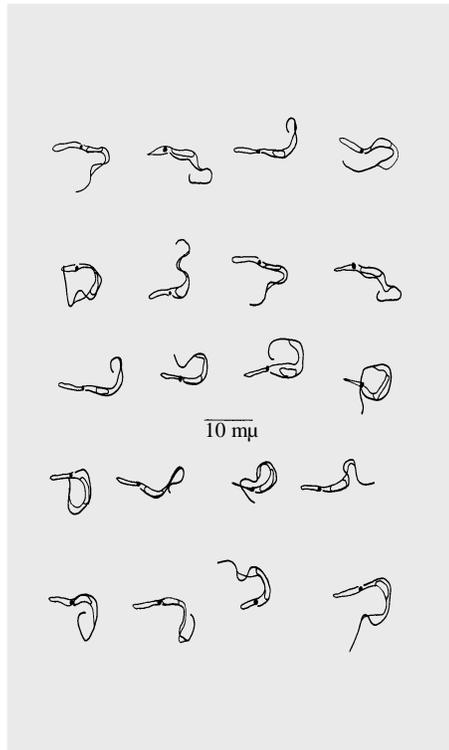
**Fig.12:** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10°, 17° e 20° dia das curvas de crescimento (SMM98).



Amostra SMM100 - 10º dia da curva de crescimento

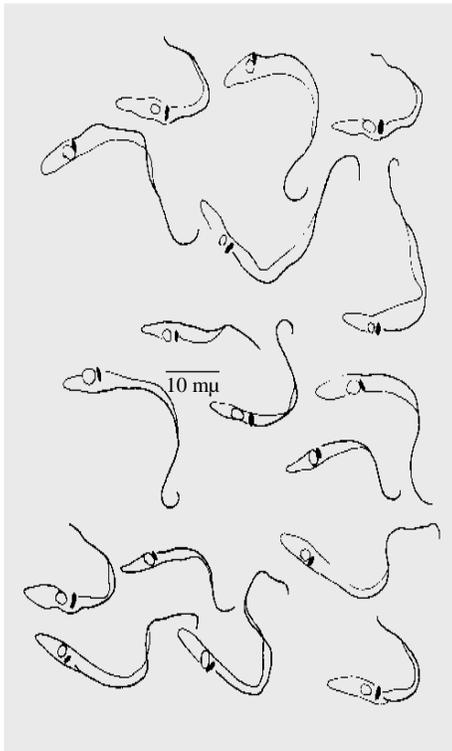


Amostra SMM100 - 17º dia da curva de crescimento

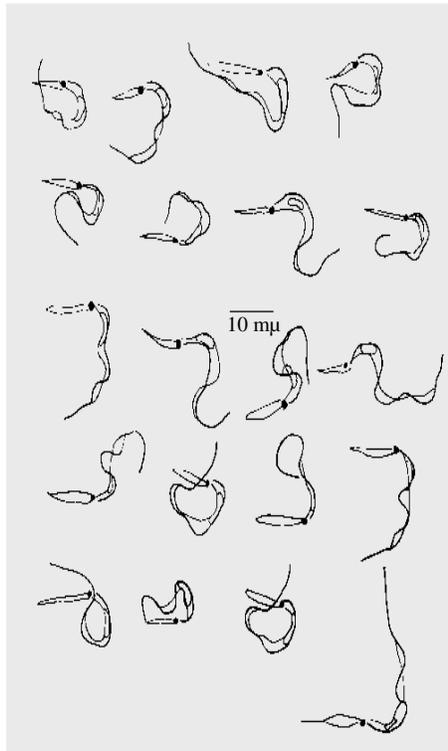


Amostra SMM100 - 20º dia da curva de crescimento

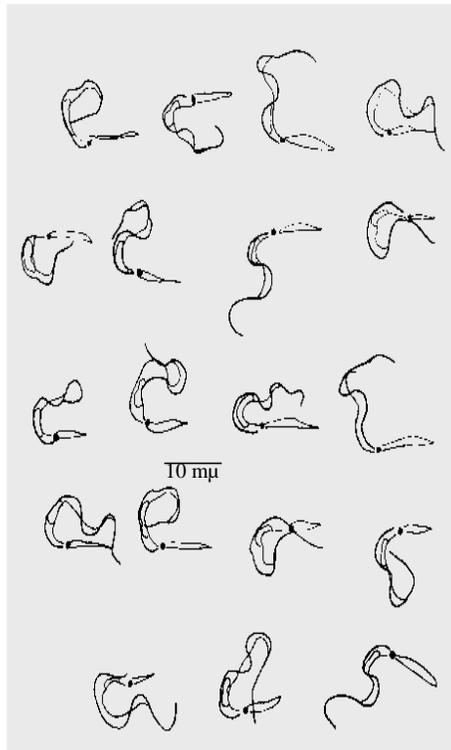
**Fig.13:** Estudo morfológico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10º, 17º e 20º dia das curvas de crescimento (SMM100).



Amostra SMM36 - 10° dia da curva de crescimento

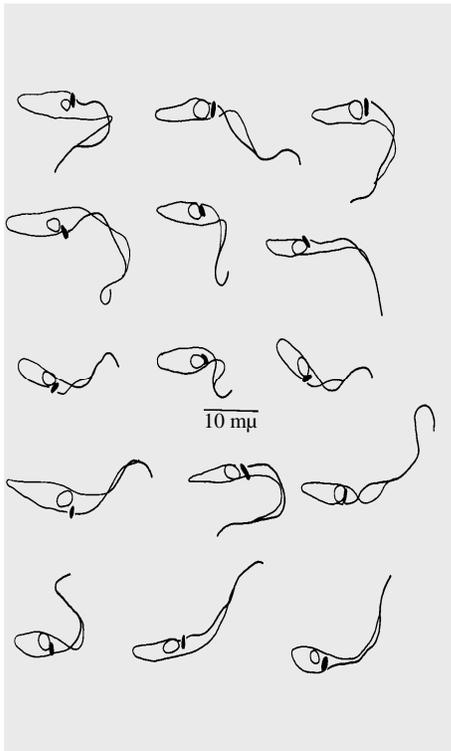


Amostra SMM36 - 17° dia da curva de crescimento

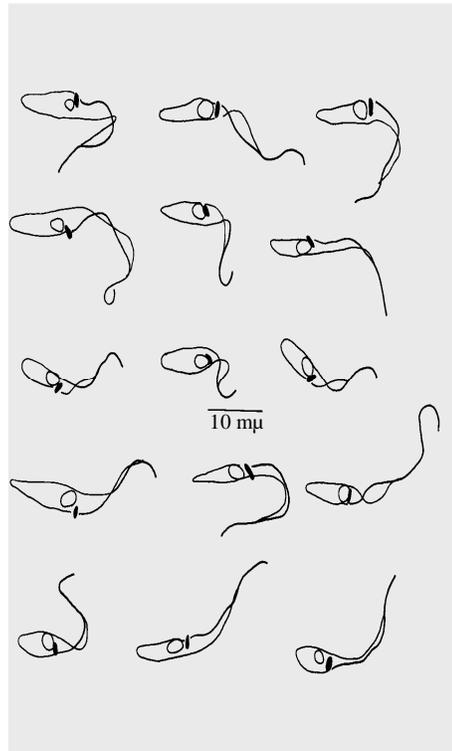


Amostra SMM36 - 20° dia da curva de crescimento

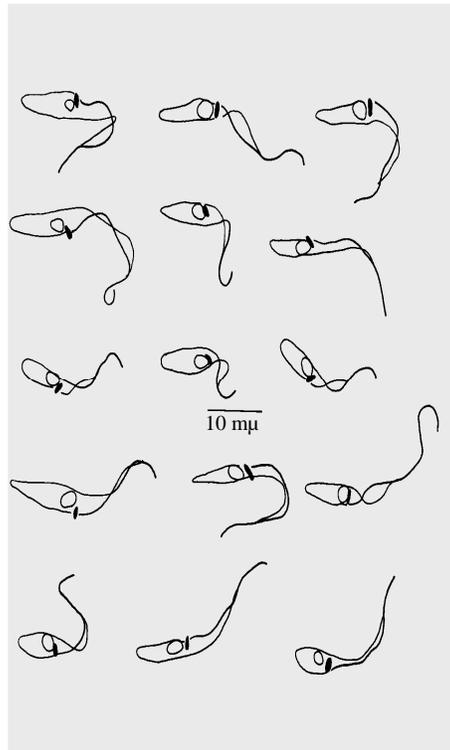
**Fig.14:** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10°, 17° e 20° dia das curvas de crescimento (SMM36).



Amostra SMM1 - 10° dia da curva de crescimento



Amostra SMM1 - 17° dia da curva de crescimento



Amostra SMM 1 - 20° dia da curva de crescimento

**Fig.15:** Estudo morfométrico de formas de *Trypanosoma cruzi*, encontradas no 10°, 17° e 20° dia das curvas de crescimento (SMM1).

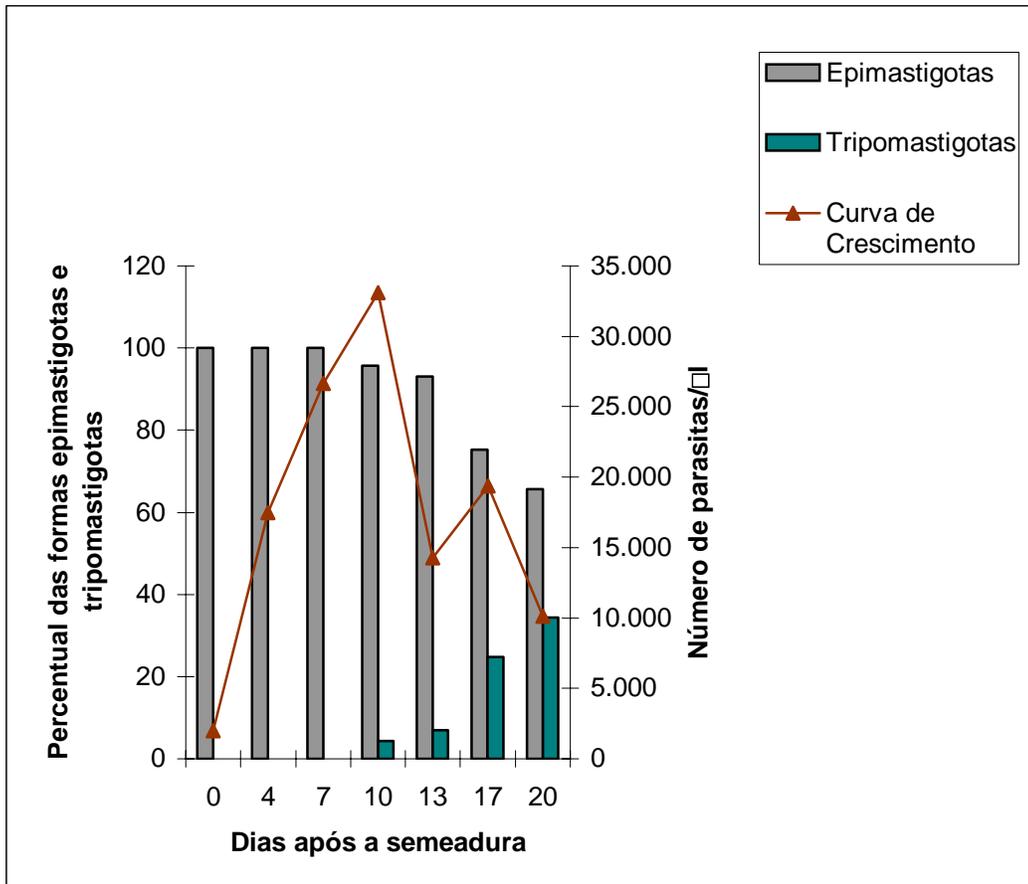
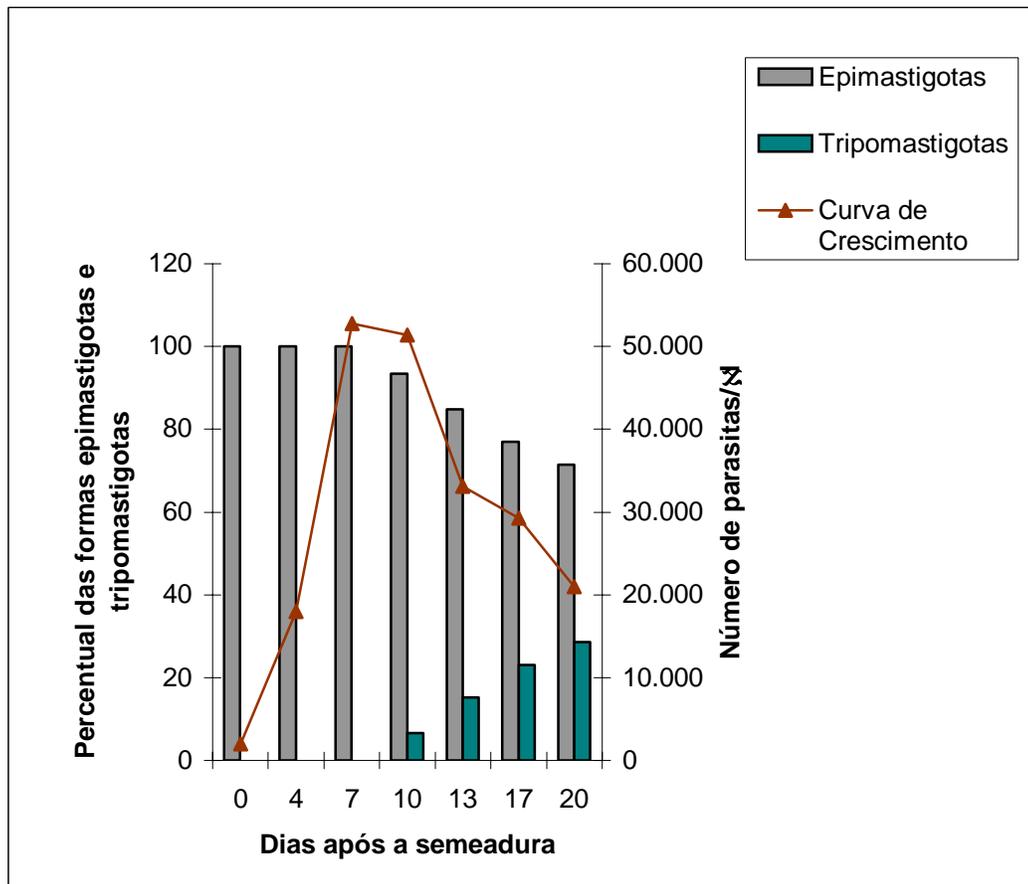
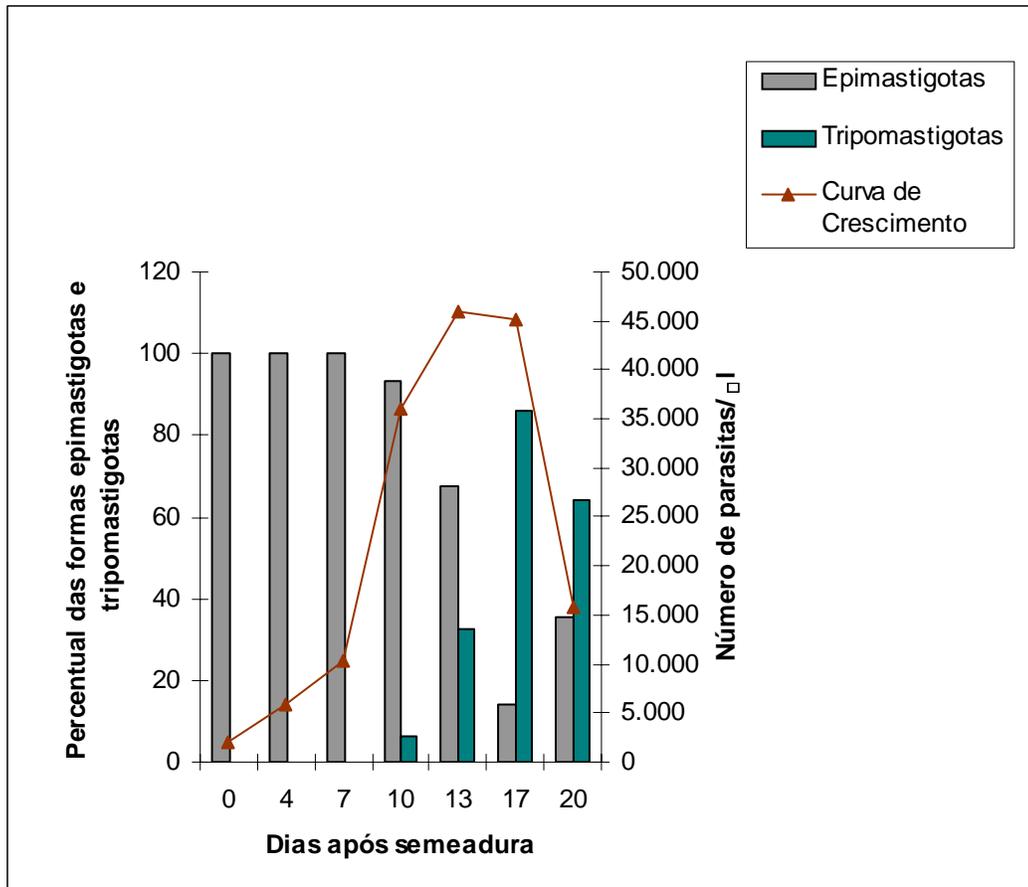


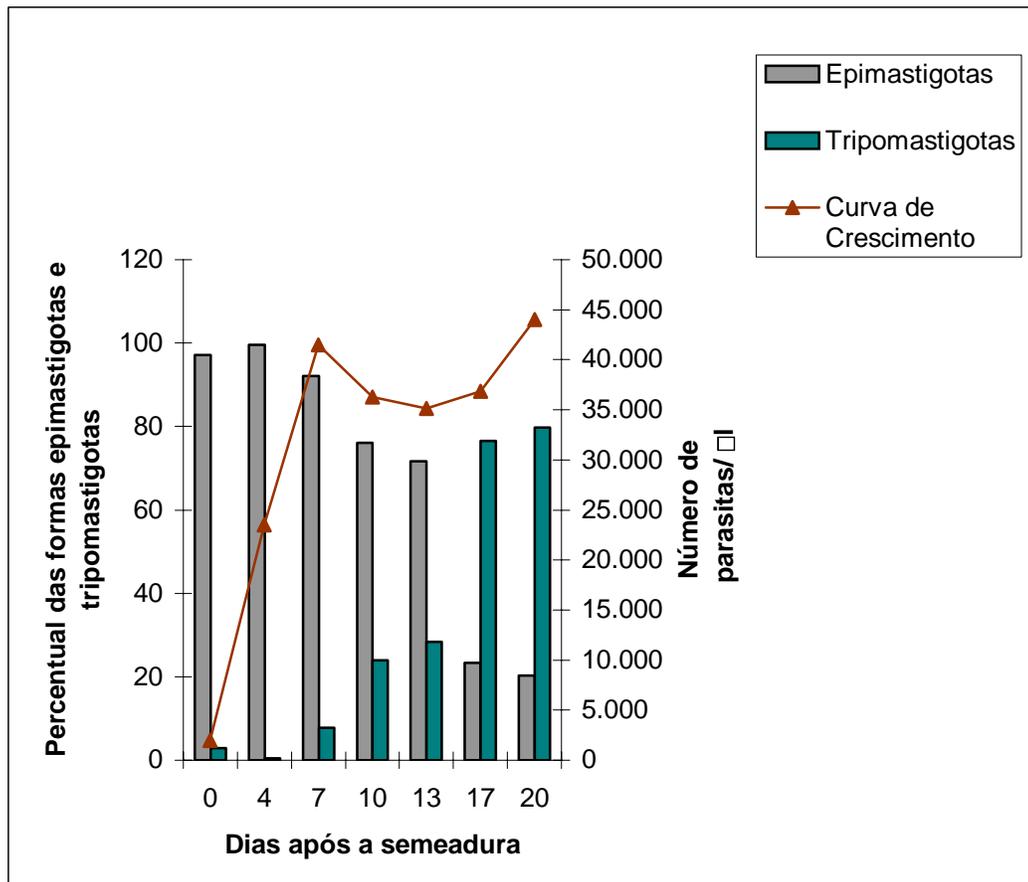
Fig. 16: *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM100) isolada de *Triatoma vitticeps*: diferenciação e crescimento celular em meio LIT.



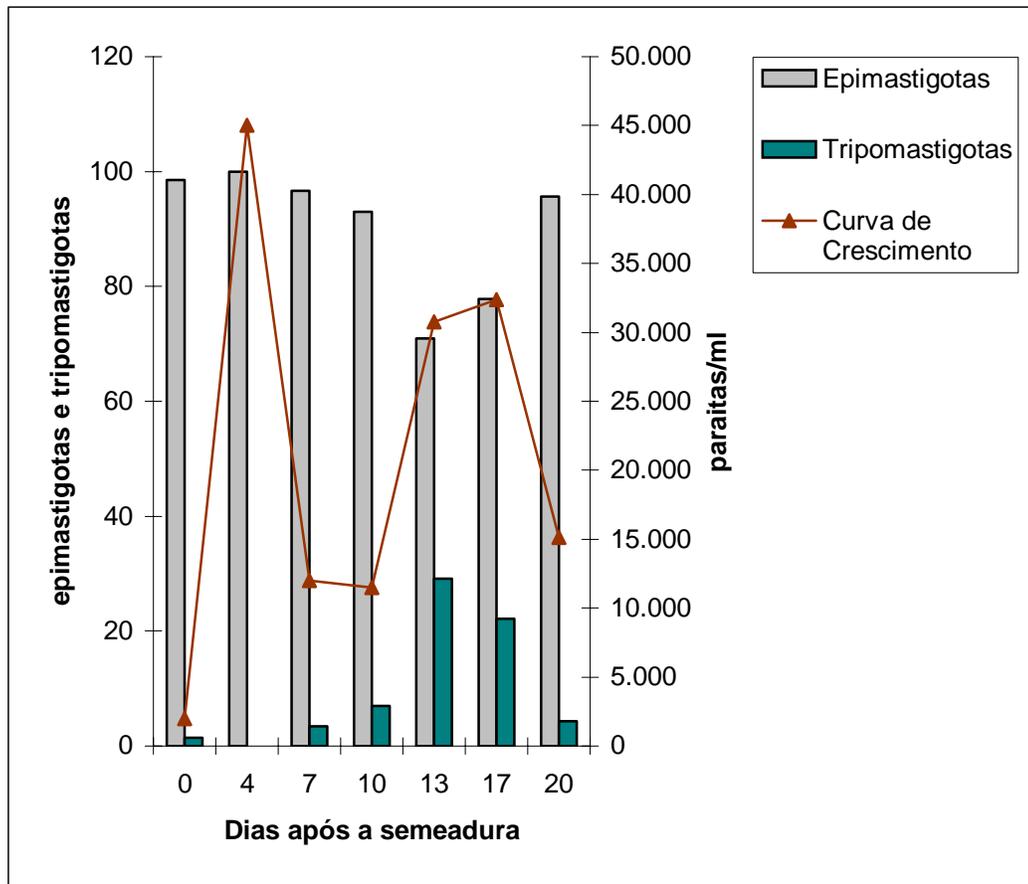
**Fig. 17:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM53) isolada de *Triatoma vitticeps*: diferenciação e crescimento celular em meio LIT.



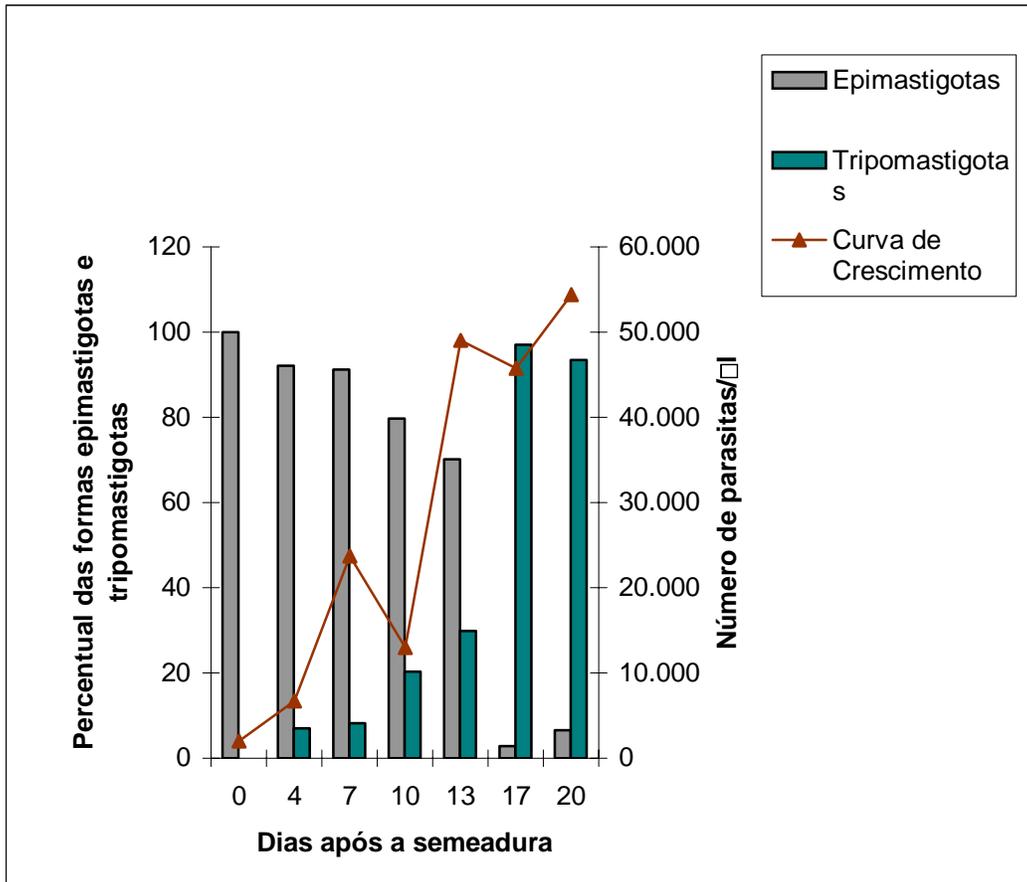
**Fig.18:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM32) isolada de *Triatoma vitticeps*: diferenciação e crescimento celular em meio LIT.



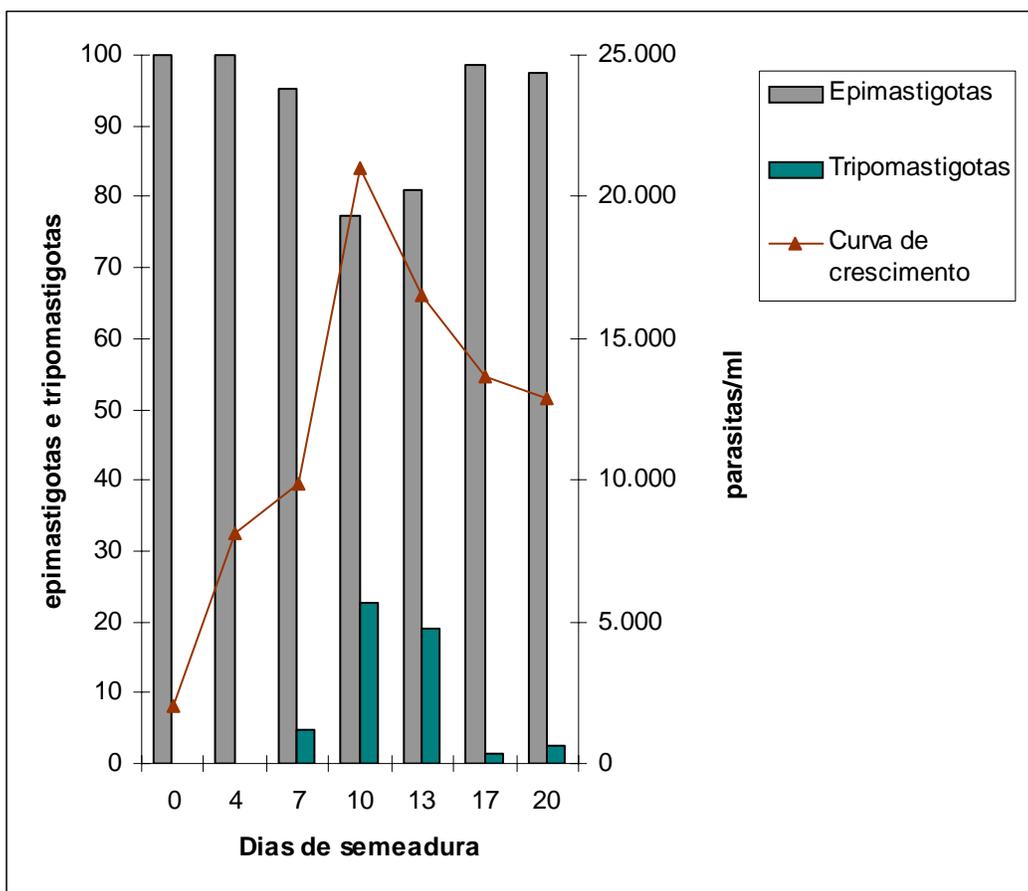
**Fig.19:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM1) isolada de *Triatoma vitticeps*:  
Diferenciação e crescimento celular em meio LIT.



**Fig. 20:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM81) isolada de *Triatoma vitticeps*:  
diferenciação crescimento celular em meio LIT.



**Fig. 21:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM36) isolada de *Triatoma vitticeps*: diferenciação crescimento celular em meio LIT.



**Fig.22:** *Trypanosoma cruzi* (amostra SMM98) isolada de *Triatoma vitticeps*: diferenciação e crescimento celular em meio LIT.

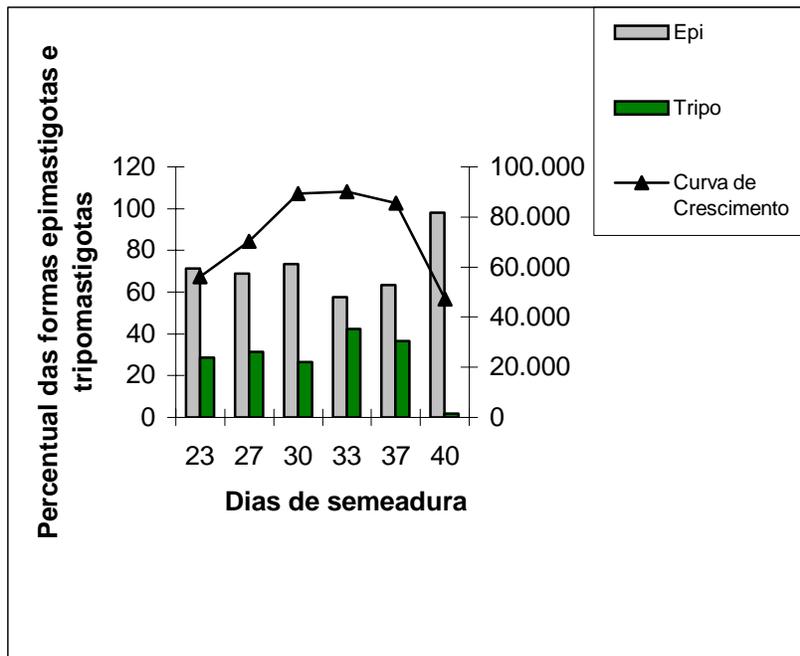


Fig. 23: Extensão da Curva de Crescimento e diferenciação celular (SMM36)

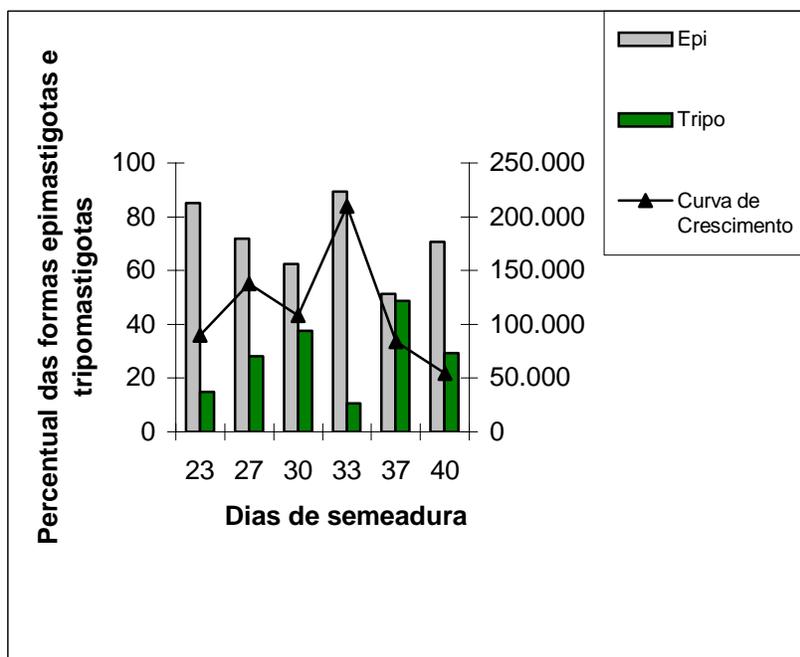
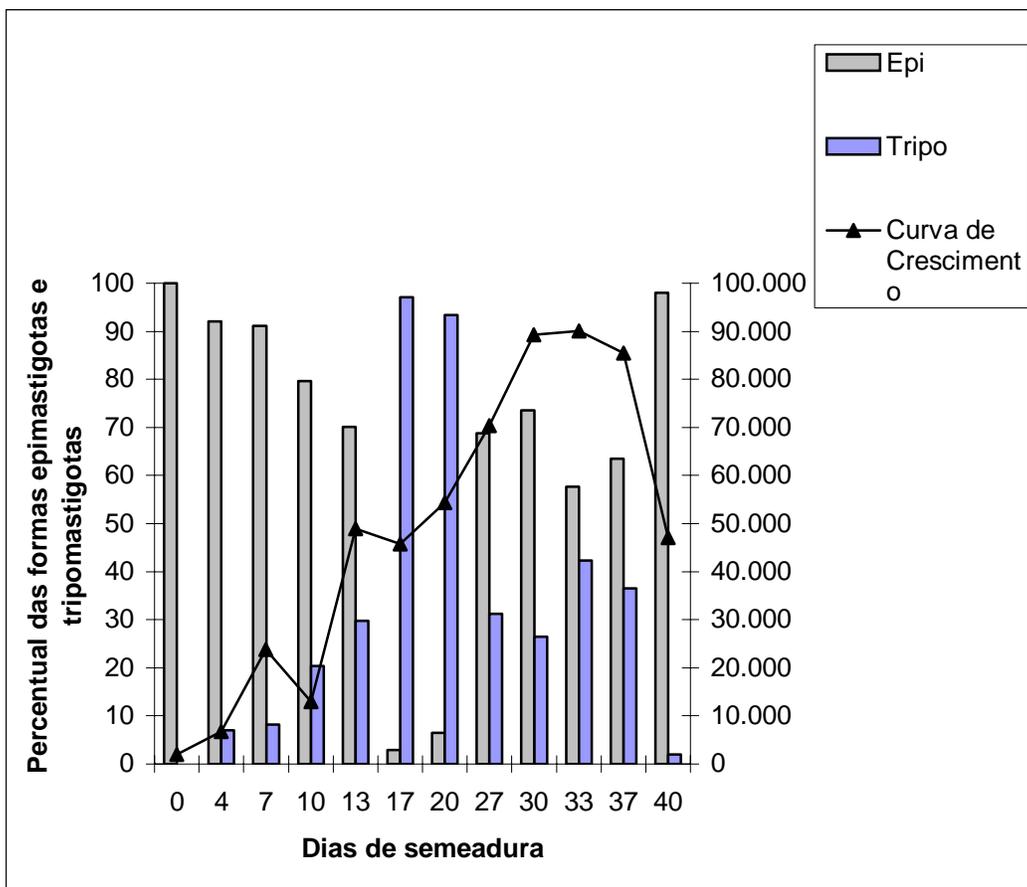


Fig. 24: Extensão da Curva de Crescimento e diferenciação celular (SMM98)



**Fig. 25:** Análise da curva de crescimento e diferenciação celular de 0 a 40 dias para a amostra SMM36.

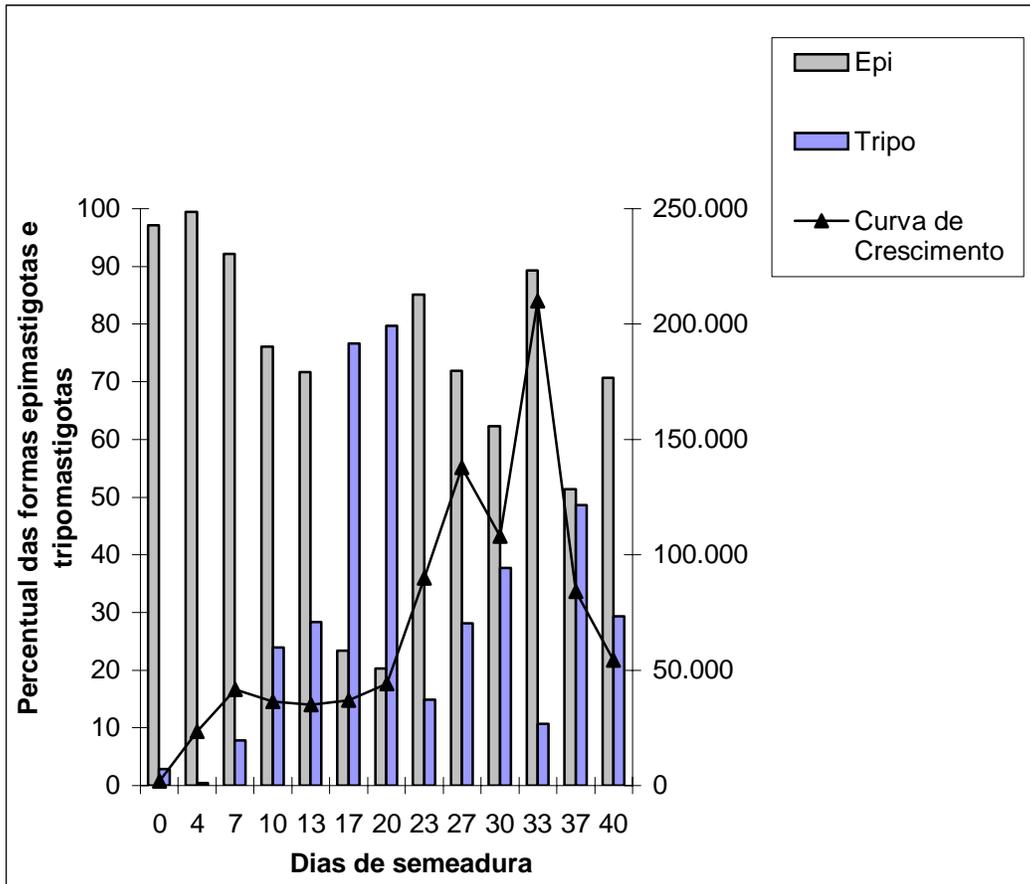


Fig. 26: Análise da curva de crescimento e diferenciação celular de 0 a 40 dias para a amostra SMM98.

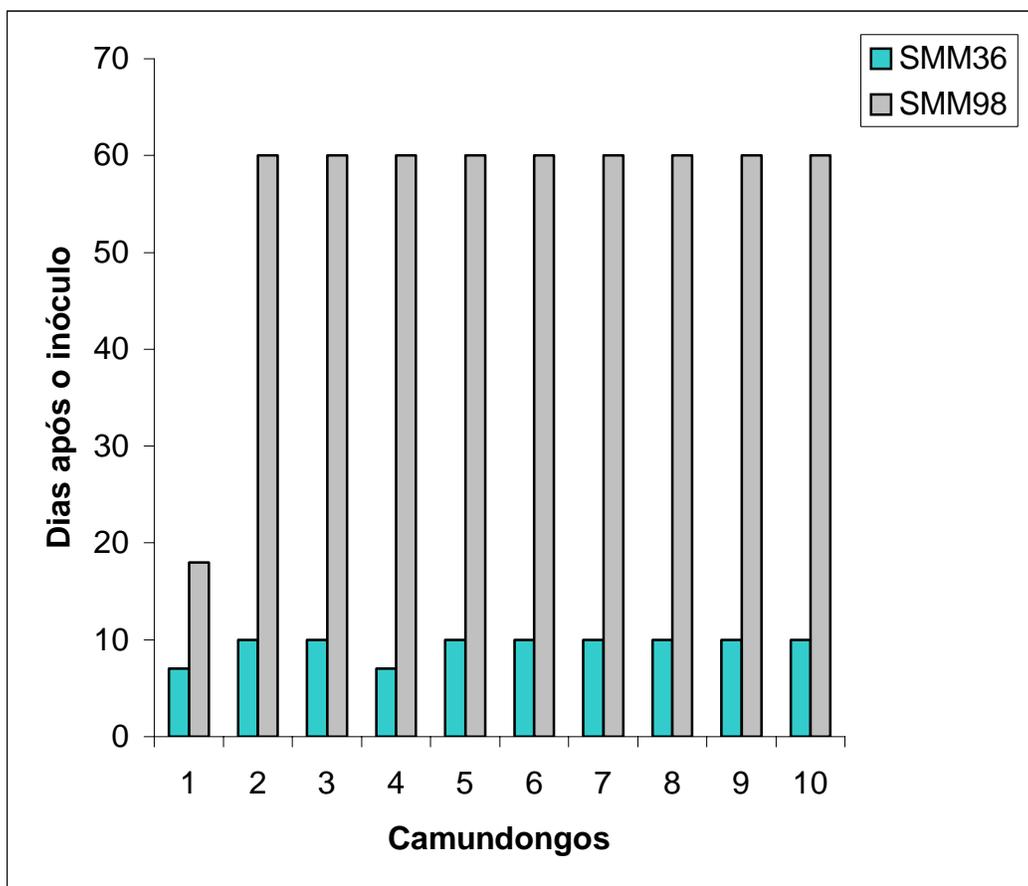
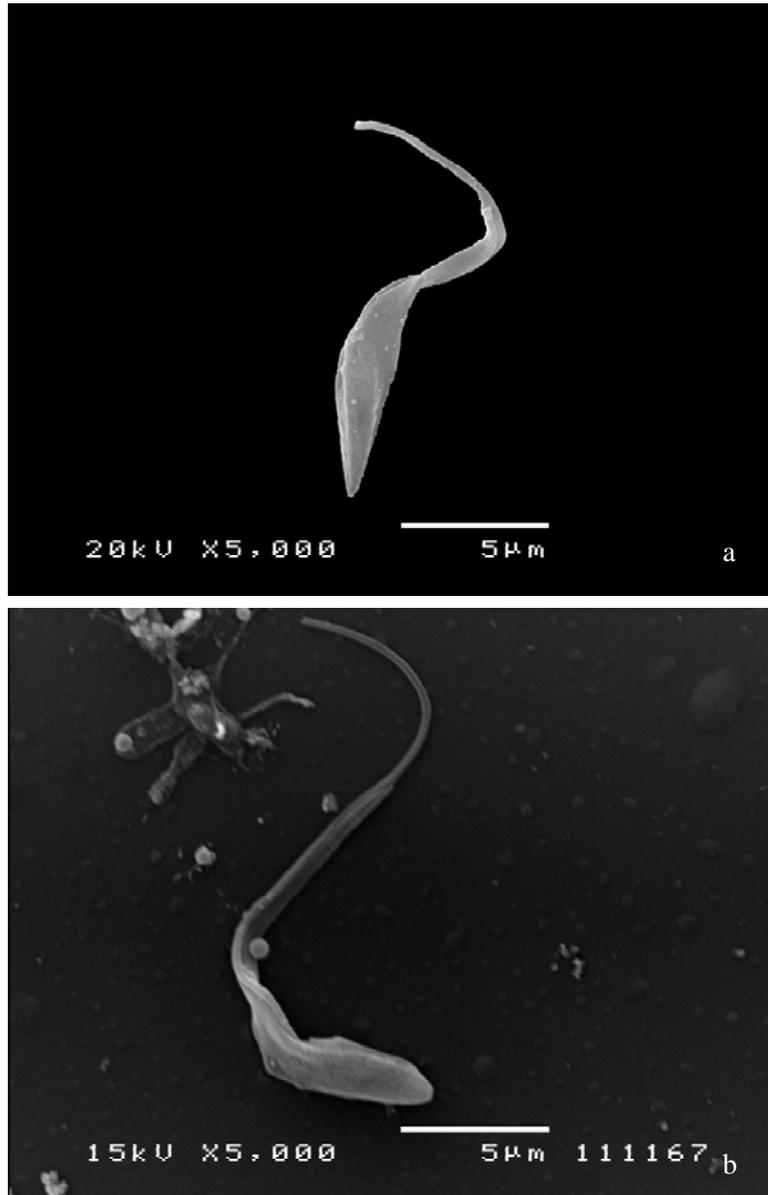
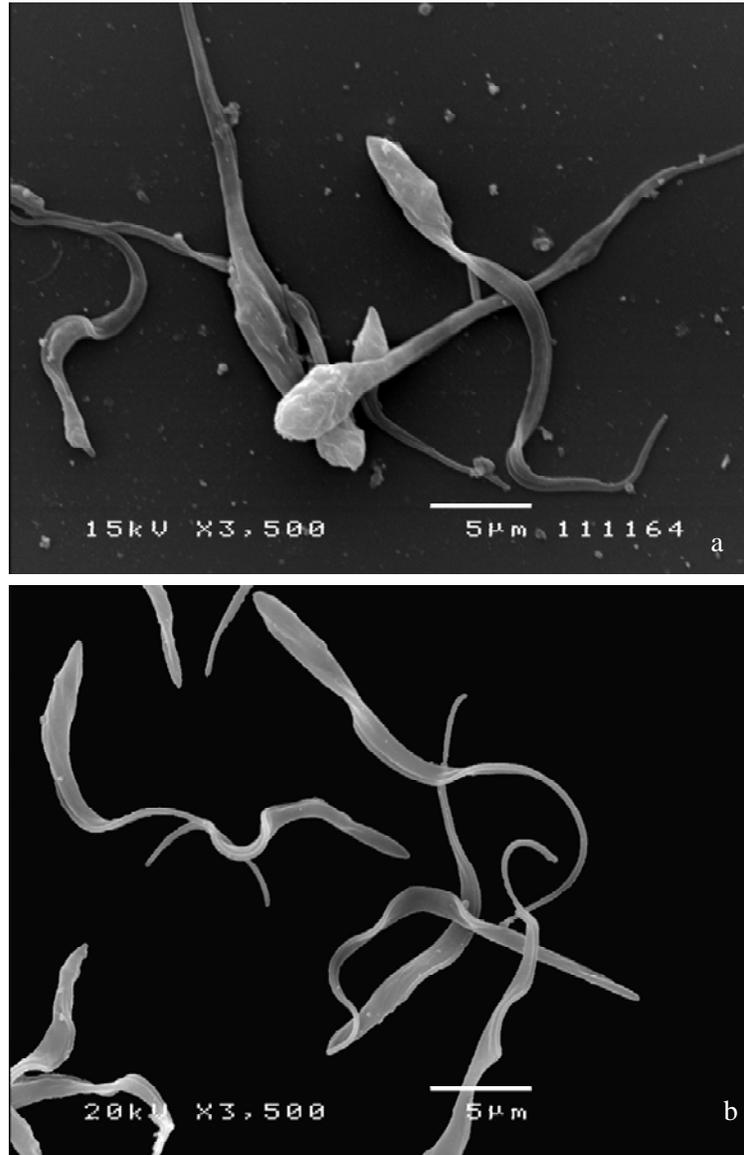


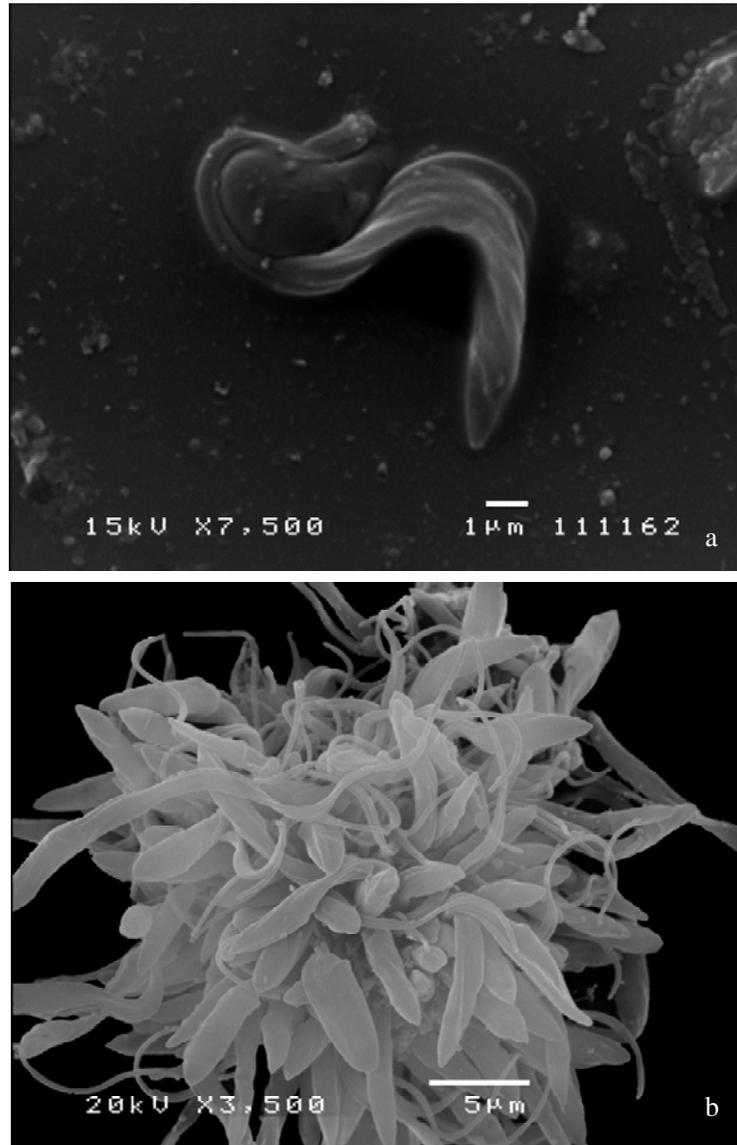
Fig. 27: Mortalidade dos camundongos.



**Fig.28 a e b da amostra SMM36:** Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*.



**Fig.29 a e b da amostra SMM36:** Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*.



**Fig.30 da amostra SMM36: a** Forma tripomastigota; **b:** Aspectos de rosetas de formas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps*.

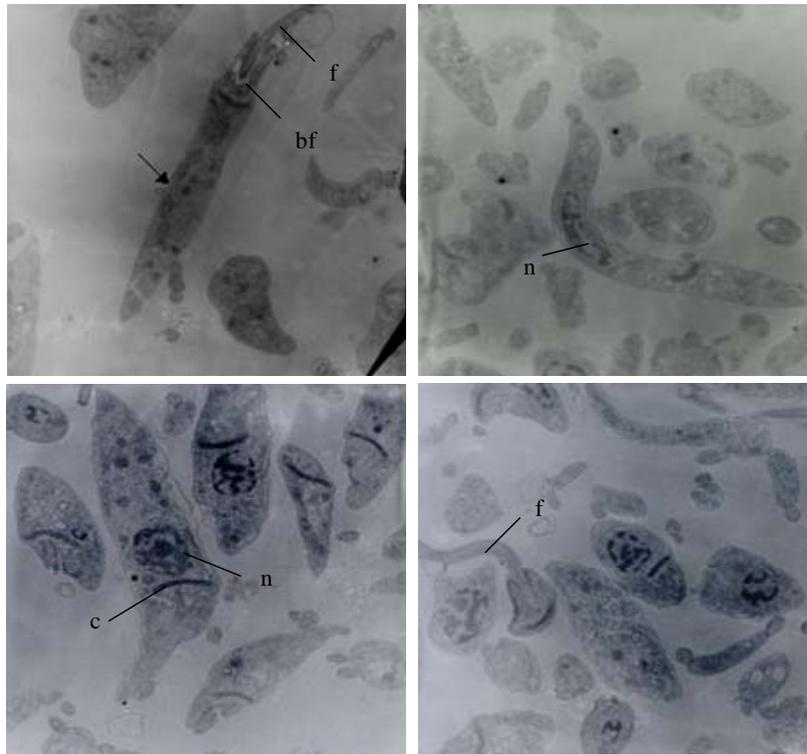
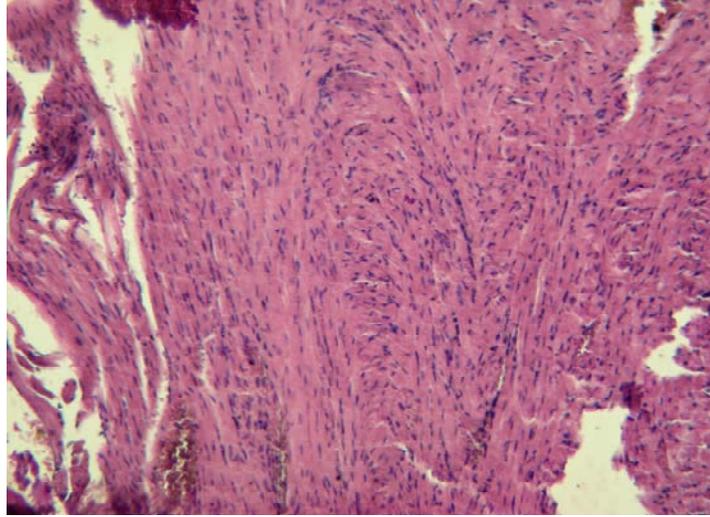
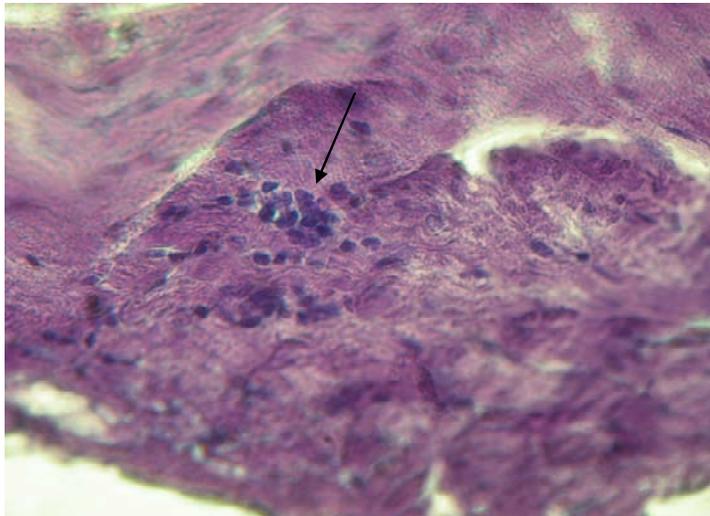


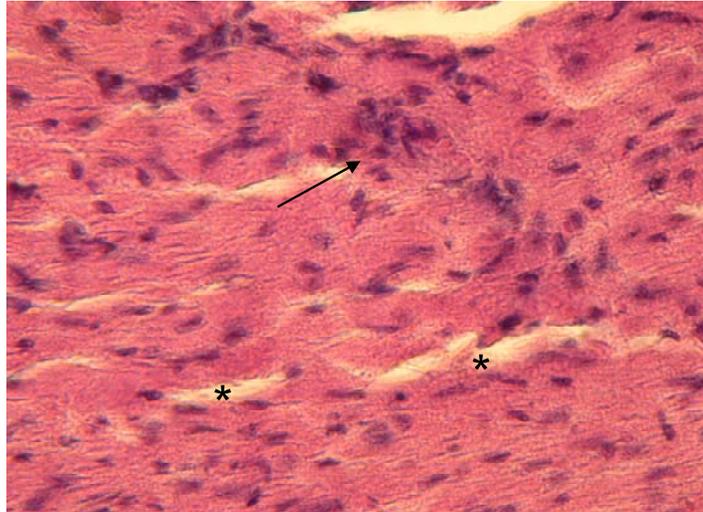
Fig. 31: Micrografia por Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* – amostra SMM36. 7.000x  
f-flagelo; bf- bolsa flagelar;  
C- cinetoplasto; n- núcleo.



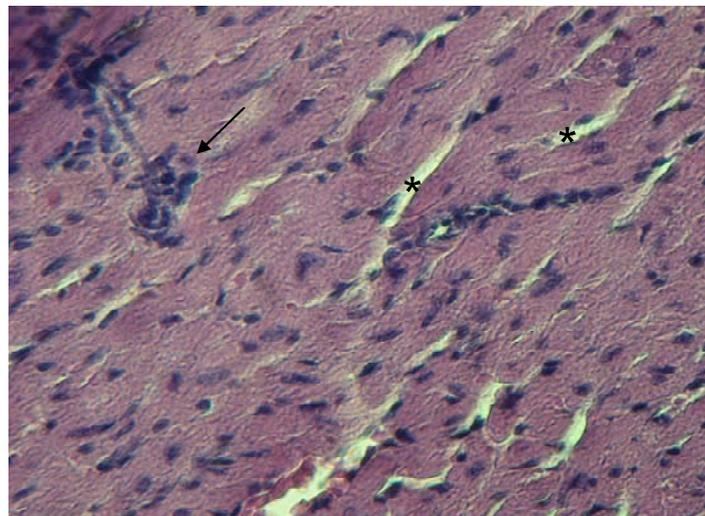
**Fig. 32:** Aspecto geral do miocárdio de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM 98. Coloração H-E. Aumento: 20x.



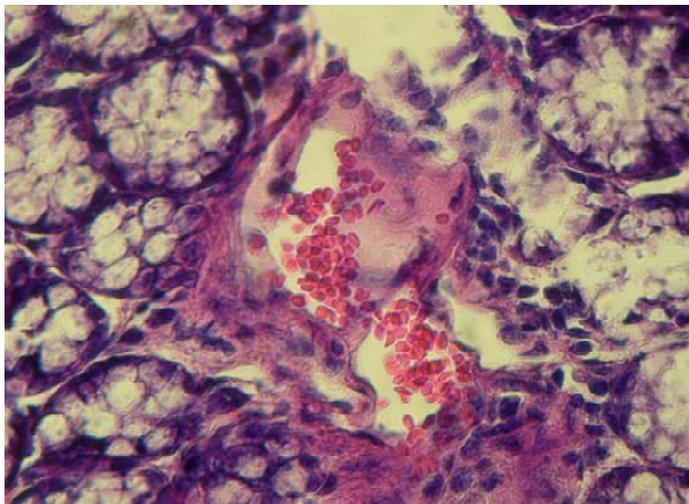
**Fig. 33:** Histopatologia do miocárdio de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM 98, com presença de infiltrado mononuclear (seta). Coloração: H-E. Aumento: 40x.



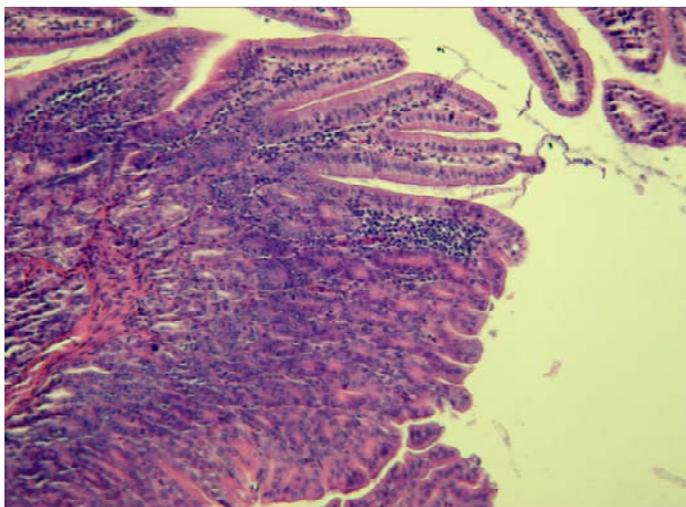
**Fig. 34:** Miocárdio do camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM 98, com presença de infiltrado mononuclear (seta) e espaços intercelulares (\*). Coloração: H-E. Aumento: 40x.



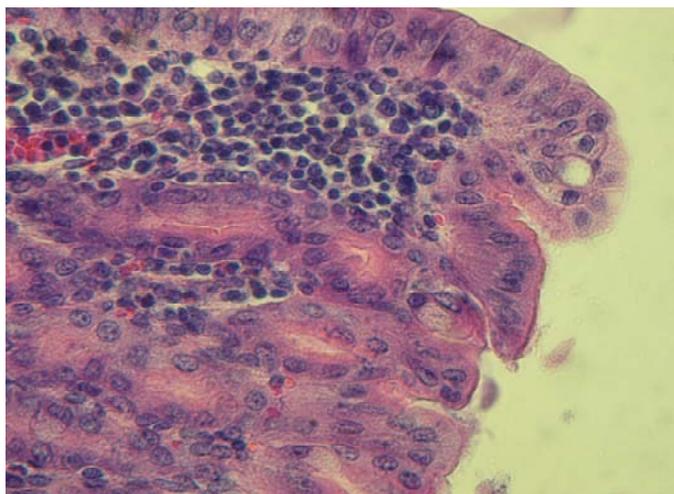
**Fig. 35:** Miocárdio do camundongo necropsiado com 10 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM 36, com presença de infiltrado mononuclear (seta) e espaços intercelulares (\*). Coloração: H-E. Aumento: 40x.



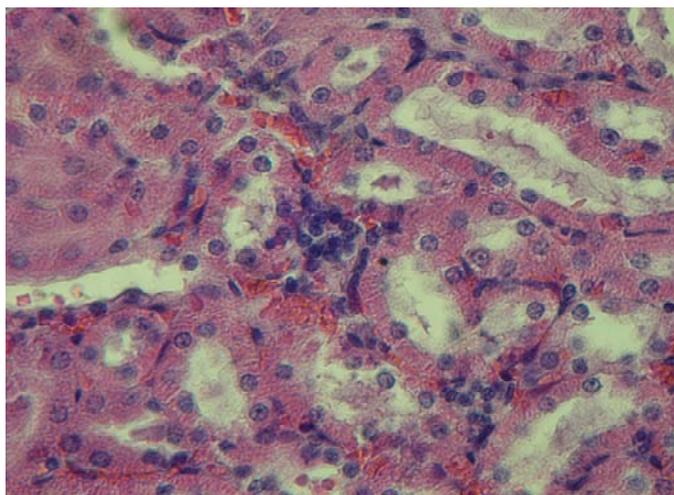
**Fig. 36:** Intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM98, apresentando indícios de degeneração celular e necrose. Coloração: H-E. Aumento: 40x.



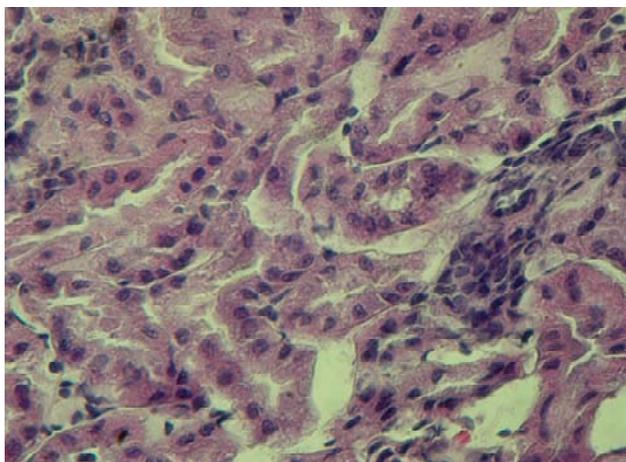
**Fig. 37:** Intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM98, apresentando infiltrado mononuclear. Coloração: H-E. Aumento: 20x.



**Fig. 38:** Detalhe de um grande infiltrado mononuclear presente no intestino de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM98. Coloração: H-E. Aumento: 40x.



**Fig. 39:** Presença de infiltrado mononuclear no fígado de camundongo necropsiado com 60 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM98. Coloração: H-E. Aumento: 40x.



**Fig. 40:** Infiltrado mononuclear presente no córtex renal de camundongo necropsiado com 10 dias após inóculo de *Trypanosoma cruzi* obtido da amostra SMM36. Coloração: H-E. Aumento: 40x.

## 5 DISCUSSÃO

### Curvas de Crescimento

Após a realização das sete curvas de crescimento para as amostras SMM 1, 32, 36, 53, 81, 98 e 100, nossos resultados demonstraram uma grande heterogeneidade nas diferentes amostras estudadas.

Elevada heterogeneidade também foi observada por GOMES *et al.* (2003), nas taxas de metacicloênese quando utilizado o meio M16, enquanto que com a utilização do meio LIT, estas taxas apresentaram-se bem mais reduzidas em cerca de 0,8 a 12,2%. Isto poderia indicar uma característica peculiar em meio M16, tal como crescimento em relação à caracterização das amostras em meio LIT em seus estudos sobre características biológicas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de pacientes chagásicos crônicos do Estado do Paraná, Brasil.

*Trypanosoma cruzi* se desenvolve bem em inúmeros tipos de meios de cultivo conforme WYNNE DE MARTINI *et al.* (1980), com o crescimento máximo evidente entre o 14° e 18° dias. As curvas, bem como características morfológicas, podem apresentar variações de acordo com a amostra utilizada, segundo BRENER & CHIARI (1965) assinalaram que as cepas CL, FL, MR podem apresentar agregados de formas amastigotas em sua fase inicial, e depois dariam origem a formas flageladas, enquanto que as cepas Y e Berenice raramente dão origem a amastigotas, aparecendo formas epimastigotas e rosetas.

Cepas com predomínio de formas largas (*stout*), como as CL, FL e MR, que tendem a apresentar inicialmente formas finas, predominantes em cepas Y e Berenice, tendendo a manter sua forma sem apresentar formas amastigotas (SILVA, 1959).

Diferenças nas curvas de crescimento, em diferentes amostras também foram observadas na América do Norte por BARR (1990), após ter analisado vários parâmetros mostrando haver heterogeneidade entre amostra isolada de cão e amostras isoladas de gambá e tatu, ambos silvestres. Curvas de crescimento em meio LIT mostraram que a amostra isolada de cão iniciou a fase de crescimento exponencial no 3° dia e aumentou intensamente até o 12° dia ( $5,0 \times 10^7$  parasitas/ml), com fase estacionária de seis dias e queda progressiva posterior, enquanto as amostras silvestres entraram na fase de crescimento exponencial entre o 6° e 9° dia, atingindo o máximo no 18° dia e caindo rapidamente após o 21° dia. A curva de crescimento da amostra do tatu é pouco maior que a canina, mas a do gambá atinge  $6,0 \times 10^7$  parasitas/ml.

### Metacicloênese

CASTELLANI *et al.*, 1967, cita em seus estudos que a diferenciação final de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, como também rosetas formadas durante o desenvolvimento são resultados da metacicloênese. A amostra Y desenvolve um processo intenso de metacicloênese após 48 horas de cultura em meio LIT-HIL, substituindo infusão de fígado por infusão de coração de canino e triptose por hidrolisado de ladoalbumina e revista por alguns autores.

A diferenciação celular nas amostras estudadas é decorrente da transformação de formas encontradas em meio de cultura. A análise da diferenciação revela que as formas sofreram modificações heterogêneas de amostra para amostra.

As taxas mais altas de metaciclogênese neste experimento, foram observadas entre o 10° e 20° dias, sendo nas amostras SMM1 e SMM100 (>20%) no 10° e 13° dias, respectivamente, a amostra SMM 36 (>90%) e SMM81 (>80%) no 17° dia e as amostras SMM 98 (>70%), SMM 53 (> 20%) e SMM 32 (>30%) no 20° dia.

A diferenciação celular nas amostras SMM36 e SMM98, observadas até o 40° dia, demonstrou que nestas ocorreram as maiores taxas de metaciclogênese, apresentando mais de 40% no 33° dia e no 37° dia para as respectivas amostras. Considerando-se que das sete amostras analisadas, cinco foram procedentes da mesma área, esses resultados demonstram uma diversidade no comportamento, o que está de acordo com as observações de MARTINEZ-DÍAZ *et al.* (2001).

NAVARRO *et al.* (2003), demonstra em seus estudos que as formas amastigotas encontradas no tecido do vertebrado, depois de se dividirem, transformam-se em tripomastigota. Uma vez que deixam a célula, as formas tripomastigota sanguíneas são capazes de infectar o sangue circulante disseminando para os tecidos através da corrente sanguínea, repetindo o evento intracelular. Toda a transformação decorre da amastigotagênese, processo que ocorre durante a metaciclogênese.

BONALDO *et al.* (1988), observaram que formas epimastigotas de *T. cruzi* aderem aos frascos de cultura antes da diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, sugerindo que a adesão ao substrato é um importante estímulo para o processo de diferenciação celular.

A importância da adesão para multiplicação e diferenciação das formas epimastigotas de *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos vem sendo amplamente estudada ao longo dos anos e muitas teorias foram formuladas a fim de se estabelecer quais são os fatores que regulam esse fenômeno. Em *T. congolense* o bloqueio da adesão resulta na redução da taxa de tripomastigotas metacíclicos.

A determinação dos fatores que regulam o processo de metaciclogênese é de especial interesse, uma vez que envolve a transformação de uma forma não patogênica em patogênica. Segundo EDELMAN (1985) a transformação morfogênica em diferentes células eucarióticas superiores são precedidas da adesão célula-célula.

## **Estudo Morfométrico**

Ao comparar o conjunto de amostras estudadas verificamos através da análise morfométrica que as dimensões dos estágios de formas epimastigotas e tripomastigotas destas amostras estão na faixa de variação de *T. cruzi* (ANDRADE, 1974; BRENER, 1965; SOUSA, 1999; BRISSE *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; SOUSA, comunicação pessoal). Entretanto, analisando as amostras individualmente, a variação é evidente, confirmando a diversidade destes isolados, conforme já verificada pela análise molecular realizada por GONÇALVES (2000).

## **Análise Ultraestrutural**

Todas as amostras demonstraram padrão semelhante a *T. cruzi*, de acordo com os resultados descritos na literatura (SOARES, 1988; ARAÚJO-JORGE *et al.*, 1992; SOUZA, 2002).

São poucos os estudos sobre ultraestrutura de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, sendo que a maioria analisa formas obtidas *in vitro*. MEYER & DE SOUZA (1976) observaram em seus estudos o número e arranjo dos microtúbulos sub-peculiares em formas tripomastigotas obtidas de cultivo de células musculares de embriões de galinha.

DE SOUZA & CHIARI (1977) analisaram formas tripomastigota oriundas de cultivos acelulares em meio LIT e chamaram a atenção para estruturas em forma de cesto no DNA no cinetoplasto, comparando-os com as formas epimastigotas.

A ultraestrutura de formas epimastigotas e tripomastigotas "*in vivo*" em células musculares cardíacas de camundongo ou de meio de cultivo acelular, meio F-69, foi comparada por PAN (1978).

Formas finas e largas de cepas de *Trypanosoma cruzi* foram comparadas e poucas foram as diferenças observadas entre as formas finas (*slender forms*) e as formas largas. As diferenças que melhor puderam ser consideradas foram em nível de cisternas de Golgi e cisternas de retículos endoplasmáticos que se apresentaram morfologicamente bem mais desenvolvidos nas formas largas quando comparadas às formas finas estudadas (MARIA *et al.*, 1972).

## **Resultados da infecção Experimental e Parasitemia**

### **Parasitemia**

O desenvolvimento experimental de *T. cruzi*, em estudos realizados por SOLARI *et al.* (1998) PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG (1953); PIZZI, (1957); DEANE *et al.* (1984), relatam o desenvolvimento de parasitemia patente, considerada máxima durante o ciclo de infecção, considerando que em outros dois eventos realizados ocorrem má adaptação dos flagelados nos camundongos, diferente do restante que se adaptaram, sugerindo que cepas de *T. cruzi* selecionam ou são específicas quanto ao hospedeiro.

SANCHEZ *et al.*, (1990) interessados em observações em especial sobre capacidade de resistência do hospedeiro, como também a adaptação de *T. cruzi* em modelos murinos, sugere que modelos experimentais, confiavelmente seriam bem adaptados à modelos originalmente naturais.

TOLEDO *et al.*, (2002), utilizou 14 parâmetros de avaliação para a análise de suas observações sobre o desvio padrão para o grupo analisado (clones de *Trypanosoma cruzi*), dentre eles, estão: PPP- exame posterior a infecção; PP- período inicial de positividade pós-exame; MP- número de tripomastigotas encontrados no sangue (O,1) ml e DMP- dias de contagem de formas tripomastigotas em toda análise, podendo ser observado significativamente a diferença ou semelhança entre os grupos estudados. Mostrando em seus achados, a necessidade de padronização dos dias de leitura das lâminas, para que se possa melhor compreender e avaliar quantitativa e qualitativamente, as formas encontradas no experimento.

MARTINS *et al.* (2003), observaram que no 4º dia de infecção em camundongos com a cepa Famema, oriunda de Marília, SP, isolada através de xenodiagnóstico, a presença de formas de *Trypanosoma cruzi* no sangue circulante aumentou gradativamente até o 20º dia, apresentando um decréscimo na corrente sanguínea em torno de 70 dias, não sendo neste período, observada morte dos camundongos em estudo.

Neste experimento, dos dez camundongos inoculados com a amostra SMM36, todos apresentaram parasitemia negativa no primeiro exame, e no segundo, realizado oito dias após o inóculo inicial, foram observadas formas sanguíneas nos camundongos, exceto os camundongos 01 e 04 que foram ao óbito poucos dias após o primeiro exame, seguido da morte dos camundongos 02; 03; 05; 06; 07 e 08, restando apenas os camundongos de número 09 e 10. A confirmação, através de novo inóculo, das altas taxas de mortalidade dos animais em estudo para a referida amostra, indica que esta é altamente virulenta. Este resultado pode estar relacionado ao aparecimento de casos agudos de doença de Chagas, com altos índices de mortalidade nas faixas etárias mais jovens da população. Ao contrário desta, os camundongos inoculados com a amostra SMM98, suportaram a infecção por um longo período, confirmando a hipótese da amostra apresentar menos virulência que a anterior. Usando o mesmo raciocínio aplicado na amostra anterior, podemos supor que esta menor virulência pode estar relacionada ao aparecimento de casos com fase aguda da doença manifestando-se de forma menos intensa e muitas vezes, até inaparente.

## **Xenodiagnóstico**

Nas 20 ninfas examinadas, após 23 dias de infecção, os triatomíneos das espécies *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante o experimento, a positividade apenas pode ser observada em *Triatoma infestans*.

Ao estender nossas observações até 60 dias de alimentação, foi realizado o segundo exame e a positividade foi observada para um dos 20 triatomíneos, demonstrando que *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* realmente não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante os experimentos, mantendo-se infectado, apenas *Triatoma infestans*.

A utilização dos insetos hospedeiros invertebrados do *T. cruzi*, implementada por BRUMPT (1914), é uma técnica na qual se põe o vetor em contato com a pele do paciente suspeito, por um período de tempo que varia de 10 a 30 minutos, e posterior exame do conteúdo intestinal do inseto entre a segunda e décima semana (CERISOLA *et al.* 1971).

Muitos autores assinalam este método como o indicado para o diagnóstico parasitológico na fase crônica. No entanto, esta metodologia gera recusa por parte do paciente, e em alguns casos podem aparecer efeitos colaterais como cefaléia e/ou reações de hipersensibilidade à saliva do inseto (COSTA *et al.*, 1981), fato este contornado pelo emprego do xenodiagnóstico artificial. Além destes inconvenientes, deve-se levar em conta o tempo para obtenção dos resultados e da disposição de locais apropriados para a manutenção dos vetores. Sua capacidade diagnóstica depende principalmente da fase da doença. Na fase aguda oscila entre 85% a 90%, já na fase crônica vai desde 17% a 70% (SALGADO, 1969; CERISOLA, *et al.*, 1975; SCHENONE, 1974). A sensibilidade do método depende de vários fatores, como por exemplo, o número de insetos utilizados, a espécie do inseto ou o número de xenodiagnósticos realizados em um mesmo paciente (CERISOLA, 1974; PERLOWAGORA-SZUMEWICZ 1982; BRONFEN *et al.*, 1989).

Além disso, as características intrínsecas das cepas do parasito, que ao parece, definem o grau de parasitemia nos humanos infectados (FERNANDES *et al.*, 1998), também são relevantes.

É conhecido também que existem espécies vetoras com suscetibilidades diferentes para infecção com *T. cruzi* (BORGES-PEREIRA, 1996).

As principais espécies de vetores envolvidas na transmissão da doença de Chagas são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, segundo (REY, 2002).

BRONFEN & ALVARENGA (1997), em seus achados mostram que após a infecção de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*, a presença de flagelados no conteúdo intestinal dos triatomíneos só foi evidenciada em torno de 60 dias a infecção. Durante o exame foram evidenciadas proporções diferentes de flagelados nos insetos utilizados no experimento, no caso, *Triatoma infestans*, foi também observada uma perda crescente de parasitas durante o tempo de estudo.

Neste experimento, um total de 20 ninfas de triatomíneos, foram examinados separadamente entre as cinco espécies estudadas. Após 23 dias de infecção, os triatomíneos das espécies *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante o experimento, a positividade apenas pode ser observada em *Triatoma infestans*.

Baseado nos resultados obtidos, estendemos nossas observações até 60 dias de alimentação, tentando investigar a possibilidade de positividade nas espécies de triatomíneos estudados. Neste período foi realizado o segundo exame e o mesmo somente apresentou positividade para um dos 20 triatomíneos, demonstrando que *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma vitticeps* realmente não apresentaram positividade para *T. cruzi* nos exames realizados durante os experimentos, mantendo-se infectado apenas *Triatoma infestans*.

## **Estudo Histopatológico**

A presença de intensas alterações inflamatórias, com presença de raros ninhos de amastigota, está de acordo com as observações de ANDRADE (1985) em que assinala que os parasitas muitas vezes não são localizados em tecidos infectados, particularmente em órgãos de animais ou indivíduos chagásicos na fase crônica.

Observações realizadas por Carlos Chagas no início do século se mantêm vigentes e relacionam a presença do *T. cruzi* no tecido com o desenvolvimento fisiopatológico da doença. Por outro lado, revelam que em grande proporção dos indivíduos na fase crônica é freqüente encontrar anormalidades no tecido sem a presença do agente etiológico (CHAGAS & VILLELA, 1922).

## 6 CONCLUSÕES

1. As características observadas nas curvas de crescimento das amostras SMM100, 53, 32, 1, 81, 36 e 98, demonstraram uma variabilidade quanto à diversidade destes isolados e relação às áreas estudadas, como também dentre as áreas.
2. A extensão dos dias de análise da curva de crescimento para as amostras SMM36 e 98, confirmam que estes isolados das áreas B e A respectivamente, demonstram diferenças frente às outras analisadas, comprovando a heterogeneidade das amostras estudadas, as quais diferem também em relação a vários pontos das curvas da maioria das cepas já estabelecidas.
3. No acompanhamento da diferenciação celular, através da avaliação das taxas de metaciclogênese, verificou-se que todas as amostras estudadas exibem comportamentos morfobiológicos diferenciados entre si, bem como em relação a cepas já estudadas e consideradas padrão.
4. Através do estudo morfométrico, observou-se que todas as amostras estudadas apresentaram as mesmas características descritas para cepas padrão de *Trypanosoma cruzi*.
5. A análise ultraestrutural das amostras estudadas revelou através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), os mesmos padrões morfológicos obtidos nas formas epimastigotas e tripomastigotas de cepas padrão de *T. cruzi*. Da mesma forma, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), evidenciou a presença de cinetoplasto, bolsa flagelar, microtúbulos subpeliculares, núcleo, flagelo, dentre outras. Demonstrando através das micrografias semelhanças morfológicas com as estruturas encontradas nas cepas de *T. cruzi* (padrão).
6. A parasitemia realizada para as amostras SMM36 e 98, mostraram aspectos diferenciados entre si, como também entre as cepas já conhecidas. A amostra SMM36, embora não tenha demonstrado presença elevada de *T. cruzi* nos esfregaços realizados, quando inoculada em camundongos, levou ao óbito em um curto espaço de tempo cerca de 80% dos animais utilizados no experimento. Entretanto, a amostra SMM98, além de não demonstrar alta parasitemia, somente levou ao óbito 10% dos camundongos, o que permite concluir que a amostra SMM36 possui alta virulência em relação a SMM98, a qual possivelmente apresenta e somente desenvolve uma fase branda e crônica da doença nos animais estudados.
7. No estudo histopatológico, a presença de inflamação com infiltrados mononucleares e as alterações degenerativas nas células de diversos tecidos, caracterizam uma intensa fase aguda, evidenciando a virulência das amostras estudadas.
8. Embora estes isolados tenham apresentado alta virulência quando inoculados em camundongos, na realização do xenodiagnóstico, estes aparentemente apresentaram afinidade apenas com *Triatoma infestans*, onde pode ser observada a presença de flagelados.

9. A heterogeneidade das amostras estudadas demonstrada através dos estudos morfológicos, histopatológicos e dados do xenodiagnóstico, pode estar relacionada às várias manifestações clínicas da doença apresentadas em pacientes chagásicos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em conta a heterogeneidade encontrada nas amostras estudadas, fica evidente a necessidade de aprofundar os estudos relacionados a estas amostras silvestres de *T. cruzi*, uma vez que estas representam a real situação destes parasitos enquanto circulam na natureza.

Portanto, pretendemos complementar nossos estudos através da microscopia óptica e da Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão ampliando o número de amostras utilizadas.

Além disso, objetivamos confeccionar a digitalização de imagens feitas nos esfregaços das lâminas para realização de morfometria geométrica e realizar estudos complementares para a avaliação da parasitemia, histopatologia e xenodiagnóstico, estendendo os dias de exame e ampliando o número de amostras já estudadas neste trabalho, com o objetivo de compará-las com outras, consideradas cepas padrão.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.G, CARVALHO, ML & FIGUEIRA, RM. 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 no recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Rev. Pat. Trop. v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev. Soc. Bras. Med Trop, v. 18, supl 1, p. 39- 46, 1985.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Estudos histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. Hospital, v. 70, p. 1268-1278, 1966.

ARAÚJO, A; FERREIRA, L.F. Paleoparasitology and the Antiquity of human Host-parasite Relationships. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, suppl. I, p. 89-93, 2000.

ARAUJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S & MEIRELLES, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15 year study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 87(S5), p. 43-56, 1992.

ÁVILA, A.R.; DALLAGIOVANNA, B.; OGATTA-YAMADA, S.F.; GÓES-MONTEIRRO, V.; FRAGOSO, S.P.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet. Mol. Res. v. 2, n. 1, p. 159-168, 2003.

AZOGUE, E.; LA FUENTE, C.; DARRAS, C.H. Congenital Chagas' disease in Bolívia: epidemiological aspects and pathological findings. Trans R Soc Trop Méd Hyg, v. 79, p. 176-180, 1985.

BALDINEZ, S.O. Contribución a la anatomia patológica de la enfermedad de Chagas experimental. Biológica, v. 3, p. 3-52, 1945.

BARR, S.C.; DENNIS, V.A.; KLEI, T.R. Growth characteristic in axenic and cell cultures, proteins profiles, and zymodeme typing of three *Trypanosoma cruzi* isolates from Louisiana mammals. J Parasitol, v. 76, p 631-638, 1990.

BARRETTO, M.P. Epidemiologia. In Z Brener, Z Andrade. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89-151, 1979.

BARRETTO, M.P. Trypanosomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação como o agente etiológico da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop São Paulo v. 7, 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.

BITTENCOURT, A.L. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child, v. 130, p. 97-103, 1976.

BÖKER, C.A.; SCHAUB, G.A. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. Z. Parasitenk. v. 70, p. 459-469, 1984.

BONALDO, M.C.; SCHARFSTEIN, J.; MURTA, A.C.; GOLDENBERG, S. Further characterization of *Trypanosoma cruzi* GP5751 cystein proteinase as the major antigen expressed by differentiating epimastigotes. Parasitol. Rev, v. 77, p. 567-571, 1991.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE-SOUZA, W & GOLDENBERG S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell Biol. v.106, p. 1349-1358, 1988.

BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C.; CASTRO, J.A.F.; ARAÚJO, I.B.; COURA, J.R. Xenodiagóstico na doença de Chagas crônica. Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. Rev. Soc. Brás. Med Trop. v.29, p.341-7, 1996.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann Trop Med Parasit v. 59, p. 19-26, 1965.

BRENER, Z. The behavior of slender and 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. *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, Morphology and life cycle. Mem. Inst.Oswaldo Cruz, v. 94, supl 1, 1999.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. J Parasitol, dec.; v.51, n.6, p.922, 1965.

BRENNER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* Infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol, v. 114, n. 2, p. 103-10, 1997.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int. J Parasitol, v. 31, p. 1218-1226, 2001.

BRONFEN, E; ALVARENGA, N.J. Metaciclôgenese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. Rev Soc Bras Med Tropical, v. 30, n. 30, p. 247-250, mai-jun, 1997.

BRONFEN, E. ROCHA, F.S.A.; MACHADO, G.B.N.; PERILLO, M.M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 84, p. 237-240, 1989.

BRUN, R.; JENNI, L. Cultivation of African and South American Trypanosomes of medical or veterinary importance. British Med Bull, n. 41, p. 122-129, 1985.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *T. cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst São Paulo, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPOS, S. Estudo sobre uma raça neutrópica de *Trypanosoma cruzi*. Ann. Fac Med Univ. São Paulo, v.2, p. 197-201, 1927.

CARCAVALLO, R.U.; JUBERG, J.; LENT, H; NOIREAU, F; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomol. Vect. V.7, suppl. 1, p. 1-99, 2000.

CASTELANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. Journ of Protoz, v. 14, p. 447-451, 1967.

CERISOLA, J.A ROHWEDDER, R.W.; DEL PRADO, C.E. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección crónica humana utilizando ninfas de diferentes espécies de triatomíneos. Bol Chil Parasitol, v. 26, p. 57-58, 1971.

CERISOLA, J.A.; ROHWEDDER, R.; SEGURA, E.L.; DEL PRADO, C.E.; ALVAREZ, M.; WYNNE, G.J.; El Xenodiagnóstico. Normalización. Utilidad, Imprenta Instituto Nacional de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires, p. 127, 1975.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Sobre un trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. 1811. Possibilidade do ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Bras. Med, v. 26, p. 305-306, 1912.

CHAGAS, C. Revisão do cyclo evolutivo do "*Trypanosoma cruzi*". Brasil Médico, v. 27, 1913.

CHAGAS, C. Sobre a verificação do "*Trypanosoma cruzi*" em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). Scien Med, v. 2, p. 75-76, 1924.

CHAGAS, C., VILLELA., E. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 14, p 5-61, 1922.

CONTREVAS, V.T.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol. Biochem. Parasitol, v. 14, p. 83-96, 1985.

COOPER, R.; INVERSO, J.A.; ESPINOSA, M.; NOGUEIRA, N.; CROSS, G.A.M. Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol biochem. Parasitol. v. 49, p. 45-60, 1991.

CORRÊA, R.R. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. Rev Brasil Malariol D Trop, v. 20, p. 39-81, 1986.

COSTA, C.H.; COSTA, M.T.; WEBER, J.N.; GILEKS, G.F.; CASTRO, C.; MARSDEN, P.D. Skin reactions to bug bites as a result of xenodiagnosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 75, p. 405-408, 1981.

COSTA, J. The synanthropic process of Chagas' disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 94, supl 1, p. 239-241, 1999.

COSTA, J.; PETERSON, A.T.; BEARD, C.B. Ecological niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am J Trop Med Hyg, v. 67, p. 516-20, 2002.

COURA, J.R. Tripanosomíase, Doença de Chagas. Cien. Cult. São Paulo, v 1, nº 1, p. 55, 2003.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J. & DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journ of Infect Diseases*, 2002,

DE GEER, C. Mémoires pour servir à l'histoire des Insectes. V Stockholm, n. 448, 1773.

DE SOUZA, A. short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 17-36, 1999.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev.Cytol, v. 86, p. 197-283, 1984.

DE SOUZA W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Pharm. Des, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Pharmaceutical Design, v.8, p.269-285, 2002.

DEANE, L.M, DAMASCENO RG. Tripanosomatídeos de mamíferos da região Amazônica. II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. Rev Inst Med Trop São Paulo, v. 3, p. 61-70, 1961.

DEANE, M.P.; BRITO, T.; DEANE, L.M. Pathogenity to mice of same strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals. Rev Inst Med Trop São Paulo, v. 5, p. 225-235, 1963.

DEANE, M.P.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, N.M.; GONÇALVES, A.; MOMEN, H.; MOREL, C.M. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. Journal of Protozool, v. 31, p. 276-280, 1984.

DIAS, E. Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 35, p. 399-411, 1940.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L.; Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. I. Introdução, material e técnica, problema e métodos estáticos. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 38, p. 427-436, 1943.

DIAS, E. Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 54, p. 115-124, 1955.

DIAS, J.C.P. Chagas disease control and the natural history of human Chaga disease: a possible interation? Mem .Inst. Oswaldo Cruz, v. 95, supl II, p. 14-20, 2000.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In JCP Dias & Coura (orgs), Clinica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem para o clínico geral, 20 ed, FIOCRUZ/RJ, p. 33-65, 1997.

DIAS, J.C.P.; FEITOSA, V.R.; FERRAZ FILHO, N.A.; RODRIGUES, V.L.C.; ALENCAR, A.S.; SESSA, P.A. Fonte alimentar e potencial vetorial de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), com relação à doença de Chagas humana no Estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 84, p. 165-173, 1989.

DIOTAIUTI, L.; BRONFEN, E.; PERILO, M.M.; MACHADO, G.B.N.; LOIOLA, C.F. Aspectos do comportamento do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chaga. Rev. Soc Med Trop, n. 20, supl, p. 87, 1987.

DI NÓIA, J.M.; SANCHEZ, DO.; FRASCH, A.C.C. The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family genes resembling the mucin genes of mammalian cells. J Biol Chem, v. 270, p. 24146-24149, 1995.

EDELMAN, G.M. Molecular determinants of animal form. New York: Alan R Liss, v.31, 1985.

FERNANDES-ALNEMRI, T.; LITWACK, G.; ALNEMRI, E.S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabdits elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin -1 beta- converting enzyme. J Biol Chem, v. 9, n. 269, p. 30761-4, dec, 1994.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL P.G.; STENDEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92, p. 343-351, 1997.

FERNANDES, O.; MANGIA, R.F.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; MORAL, C.M.; ZINGALES, B. CAMPBELL, D.A. JANCEN, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed of the mini-exon gene. Parasitology, v.118, p.161-166, 1998.

FERREIRA, E.; SOUZA, O.S.; FONSECA FILHO, M.; ROCHA I. Nota sobre a distribuição do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), (Hemiptera, Reduviidae), no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Brasil Malariol D Trop, v. 38, p. 11-14, 1986.

FERREIRA, L.F.; BRITO, C.; CARDOSO, M.A.; FERNANDES, O.; RICHARD, K. Paleoparasitology of Chagas disease Revealed by infected tissues from Chilean mummies. Acta Tropica, v. 75, p. 79-84, 2000.

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. Bras.Med.Trop., v. 2, p. 1-8, 1968.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domicialização de triatomíneos no Brasil. Rev. Saúde públ, São Paulo, v. 14, p. 265-99, 1980.

FRAIDENRAICH, D.; PENA, C.; ISOLA, EL.; LAMMEL, E.M.; COSO, O.; AÑEL, AD.; PONGOR, S.; BARALLE, F.; TORRES, H.N.; FLAWIA, M.M. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylate cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation epimastigote to trypomastigote forms. Proc.Natl. Sci.USA, v. 90, p. 10140-10144, 1995.

GADNER, G. Viagens no Brasil, principalmente nas províncias do norte e nos distritos do ouro e do diamante durante os anos de 1836-1842. São Paulo. 2 ed. v. 223, p. 467, 1942.

GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O.; NAKAMURA, C.V.; BITTENCOURT, N.L.R.; CHIARI, E.; ARAUJO, S.M. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Group with Peculiar and Biochemical Behavior. Mem Int Oswaldo Cruz, v. 98, n. 5, p. 649-654, july, 2003.

GONÇALVES, T.C.M. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae), com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas desse triatomíneo, no município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro, 125 f. Tese de Doutorado. FIOCRUZ/RJ, 2000.

GONÇALVES, T.C.M.; OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.; ALMEIDA, M.D.; NOGUEIRA W.O.; ÁVILA-PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES, T.C.M.; VICTÓRIO, V.M.N.; JURBERG, J.; CUNHA, V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). I. Ciclo evolutivo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.83, p. 519-523,1988.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. Exp. Parasitol, v. 66, p. 205-212, 1988.

GRACE, TD. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature, v. 25, p. 195-788, aug, 1962.

GRANT, I.H.; GOLD, J.W.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H.B.; NATHAN, .; C.; MAYER, K.; REICH, L.; WOLLNER, N.; STEINHERZ, L.; GHAVIMI, F.; O'REILLY, R.J.; ARMSTRONG, D. Transfusion-associated acute Chagas disease. WHO Tech. Rep. Ser. 905:24-28 se acquired in the United States. Ann. Intern Med. v. 111, p. 849-851, 1989.

GURR, E. Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. Academic Press, Londres. Nueva York. 1971.

KOLLIEN, A.H, SCHMIDT, J.; SCHAUB, G.A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. Acta Trop, v. 70, p. 127-141, 1998.

LAGENS, R.; CABEZA MECKERT, P.; BASOMBRIO, M.A.; CHAMBÓ, G.J. COSSIO, P.; ARANA, R.; GELPI, R. infección crônica del ratón com *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de enfermedad de Chagas. Medicine (BS AS), v. 40, supl 33, 1980.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; FRAIHA, H.; MILES, M.A.; DRAPES, C.C. Chagas' disease in the Amazon basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the state of Pará, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 73, p. 193-204, 1979.

LAPORTE, F.L. essai d'une classification systématique de l'ordre des Hémiptères (Hémiptères Hétéroptères, Latr.). Mag Zool (Guérin), v.2, p.88 apud Lent H, Wygodzinsky, P. 1979. Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectores of Chagas's disease. Bull Am Nat Hist, n. 163, p. 123-520, 1832-1833.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.C.; MIRANDA, A. Chagas disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation, v. 14, p. 1035-1160, 1956.

- LAURIA-PIRES, L.; SANTANA, J.M.; TAVARES, F.S.; TEIXEIRA, A.R.L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from chagas disease patients: I - Behavioral characterization *in vitro*. Rev. Soc. Bras. Med Trop, v. 30, p. 187-192, mai-jun, 1997.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectores of Chagas disease. Bull Am Museum Natural His. v. 163, p. 123-520, 1979.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; VAVRA, J.; WALLAGE, F.G. A Newly revised classification of the protozoa. J Protozoo, v. 27, p. 37-58, 1980.
- LÓPEZ-OLMOS, V.; PÉREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D.; ORTEGA, E.; HERNANDEZ, R.; ESPINOZA, B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica, v. 69, p. 239-254, 1998.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, RA.; ESCARIO, JÁ.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO. A Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, p. 53-59, 2001.
- MARTINS, L.P.A.; CASTANHO, R.E.P.; ROSA, J.Á.; SILVA, C.S.; GODOY, A.P.; ROSA, RM. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. Rev Soc Bras Med Trop, v. 36 n. 1, p. 35-39, jan-fev, 2003.
- MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C, JUSIN, E. Transmisión de “*Schizotripanun cruzi*” al niño por leche de la matre con enfermedad de Chagas. MEPRA, v. 28, p. 41-46, 1936.
- MELLO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol, v. 64, p. 314-332, 1978.
- MEYER, H.; DE SOUZA, W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the parasite's life cicle, august, v. 23, n. 3, p. 385-90, 1976.
- MEYER, M.; OLIVEIRA, M.X. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four year study. Parasitol, p, 39-91, 1948.
- MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; PÓVOA, M. FURTHER enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 74, p. 221-237, 1980.
- MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two district strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 71, p. 217-225, 1977.

MINNING, T.A.; BUA, J.; GARCIA, G.A.; Mc GRAW, R.A.; TARLETON, R.L. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v. 131, n. 1, p. 55-64, sep, 2003.

MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVEIDO, M.; READY, PD.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B.L.; LANE, R.P. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *L. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. Acta. Trop, v. 85, p. 19-29, 2003.

NAVARRO, M.C.; DE LIMA, A.R.; ASKUE, J.; CONTREVAS, V.T. Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotes and metaciclogenesis forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 98, n. 1, p. 83-91, janeiro. 2003.

NEIVA, A. Presença em uma localidade do Estado do Rio de um novo transmissor da moléstia de Chagas encontrado infectado em condições naturais (Nota prévia). Brasil Med, v.28, p. 333-335, 1914.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, NN.; CLAUSELL, DT. Um surto epidemiológico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). Hospital (RJ), v. 73, p. 1767-804, 1968.

NICKERSON, P.; ORR, P.; SCHROEDER, M.L.; SEKLA, L.; JOHNSTON, J.B. Transfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Ann Intern med, v. 111, p. 851-853, 1989.

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Boutond'Orient. CR Acad Sci n.1, p. 1-30, 1908.

NOVY, F.G.; MCNEAL, W,J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J Infect Dis v. 1, p. 1-30, 1904.

Organização Mundial de Saúde. Control de la Enfermedad de Chagas. Geneva, 1991.

PAN, M.L; WYATT, G.R. Juvenile hormone induced vitellogenin synthesis n the monarch butterfly. Science, oct, v.8, n.174, p.503-5, 1971.

PAN, S.C. *Trypanosoma cruzi*: in vitro interactions between cultured amastigotes and human skinmuscke cells, Ex Parasitol, august, v. 45, p. 274-86, 1978.

PEREIRA DA SILVA, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clinica et Biológica, v. 20, n. 3, p. 191-208, dezembro, 1953.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.P.; MULLER, C.A. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas's disease. I: Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. Men Inst Oswaldo Cruz, v. 77, p. 37-53, 1982.

PIMENTA, P.F.P.; DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRON, T.; PINTO DA SILVA, P. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture flip, replica-staining label fracture survey. Eur J Cell Biol, v. 50, p. 263-271, 1989.

PINHO, A.P.; MANGIA, R.H.; NEHME, N.; MOREL, C.M.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, AM. The complexity of the circulation of *Trypanosoma cruzi* in the natural environment: biological and biochemical characterization of marsupial and *Rhodnius prolixus* isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 91, supl, n. 220, 1996.

PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. Rev Soc Brás Med Trop, v. 34, p. 413-9, 2001.

PIZZI, T. Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Universidad do Chile. 1957.  
PORTELA-LINDOSO, A.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev. Saúde Pública, v.37, n. 1, p. 107-115. 2003.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. SP, v. 3, p. 3-45, 1991.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 2 ed.R J, 380p, 2002.

RICHARDS, O.M & DAVIES, RG. Tratado de Entomologia IMM'S. Classification and Biology. Chapman & Hall, v. 2, 1984.

ROTHHAMMER, F. Chagas Disease in Chilean Mummies. Paras Today, v. I n° 1, 1985.

SALGADO, A.A.: Consideraciones sobre metodología y sensibilidad del xenodiagnóstico. Bol Chil Parasitol, v. 24, p. 9-13, 1969.

SANCHEZ, G.; WALLACE OLIVARES, M.; DIAZ, N.; AGUILERA, N.; APT, X.; SOLARI, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes : *In vitro* differentiation of epimastigotes and infective of culture metacyclic trypomastigotes to mice. Ex Parasitol, v. 71, p. 125-133, 1990.

SANTOS, UM.; PINTO, A.F.S.; ALMEIDA, A.Z.; ZAGANELLI, F.L.; CARRANCHO, P.V.; NETTO, NA. Doença de Chagas no estado do Espírito Santo. III: Vetores do *Trypanosoma*. Rev Soc Bras Med Trop, v. 3, p. 51-52, 1969.

SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A.. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. Bol Chil Parasitol, v. 29, p. 24-26, 1974

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.E.A.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma transi-sialidas*. ANN Rev. Microbiol, v. 48, p. 499-523, 1994.

SCHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion, v. 31, p. 547, july, 1991.

SCHOFIELD, C.J. Biosystematics of the Triatominae. Biosystematics of Haematophagous Insects, v. 37, p. 285-312, 1988.

SCHOFIELD, C.J. *Trypanosoma cruzi* – The vector-parasite paradox. Mem. Inst Oswaldo Cruz, v. 95, p. 535-44, 2000.

SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D. Infecção natural de triatomíneos do Espírito Santo por flagelados morfologicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop, v. 19, p. 99-100, 1986.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.C.; BRISOLA MARCONDES, L. A.; GUEDES, G. S.; SIQUEIRA, A.A.; BARONE, J.C. P.; DIAS, V.; AMATO NETO, J.E.; TOLEZANO, B.A.; PERES, E.R.; ARRUDA, J.R.M.H.; LOPES, M.; SHIROMA, & CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.

SILVA, IG.A doença de Chagas no Brasil. Indícios de sua origem e distribuição até 1909. Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, v. 27, n. 4, p. 219-223, 1985.

SILVA, C.S; SANTOS-MALLET, J.R, ZICCARDI, M; GONÇALVES, T.C.M. Caracterização morfológica e estrutural de amostras de *Trypanosoma cruzi*, isoladas de *Triatoma vitticeps* no estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Med Trop, v. 34, supl.1, p. 22, 2001.

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

SILVEIRA, A.C.; ALENCAR, T.A.; MÁXIMO, M.H.C. sobre *Triatoma vitticeps* (Stal,1859), no estado do Espírito Santo, Brasil. X Reunião Anual de pesquisa Básica de doença de Chagas, Caxambu, p. 58, 1983.

SILVEIRA, A.C; FEITOSA, V.R.; BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. Rev Bras Malariol D Trop, v. 36, p. 15-312, 1984.

SOARES, M.J.; DE SOUZA, W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids. A cytochemical and stereological study. J submicrosc cytol pathol, v. 20, p. 349-363, 1988.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pré-lisossomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. J. Cell Sci, v.102, p.157-161, 1992.

SOARES, V.A.; DIAS, J.C.P.; MARSDEN, P.D. Sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* em caldo de cana: resultados preliminares. Rev Soc Bras Med Trop, supl 2, v.38, 1987.

SOLARI, A.; WALLACE, A.; ORTIZ, S.; VENEGAS, J.; SANCHEZ, G. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Stocks from Chilean Insect Vectors. Exp Parasitol. v. 89, p. 312-322, 1998.

SOUSA, M.A. Morphological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94, supl I, p. 205-210, 1999.

SOUZA, H.M.; RAMIREZ, L.E.; BORDIN, J.O. Doença de Chagas transfusional: medidas de controle. In JCP Dias & Coura (orgs). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem para o clínico geral. 20 ed FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 429-443, 1997.

STAL. Apud Brener, Z. Vetores. In *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, eds.Z. Brener e Z. Andrade. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 463, 1959.

STEINDEL, M.; TOMA, H.K.; ISHIDA, M.M.I.; MURTA, S.M.F.; PINTO, C.J.C.; GRISARD, E.C.; SCHLEMPER, J.RBR.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. Acta Tropica, v. 60, p. 167-177, 1995.

SULLIVAN J.J. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: A simplified procedure. Trans. R Soc. Trop Med Hyg, v.3, p.300-303, 1982.

TEIXEIRA, S.M.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol Chem, v. 270, p. 22586-22594, 1995.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Isozyme variability the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. Evolution, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; HOFFMANN, A.; POCH, O.; ECHALAR, L.; LE PONT, F.; LEMESRE, J.L.; DESJEUX, P.; AYLA, F.J. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in bolivian domestic transmission cycles. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 80, p. 442-447, 1986.

TOLEDO, O.M.J.; LANA, M.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; COELHO-MACHADO, G.L.L.; VELOSO, V.M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; TAFURI, W.L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. Exp parasitol, v. 100, p. 161-172, 2002.

TOMÁS, A.M.; KELLY, J.M. Stage regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. Mol Biochem. Parasitol, v. 76, p. 91103, 1996.

TÓMAS, A.M.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. Eur. J. Biochem, v. 244, p. 596-603, 1997.

TRD/ WELLCOME TRUST. Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: [www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm). Acesso em 01 fev.2006.

USINGER, R.L.; WYGODZINSKY, P.; RYCKMAN, R. The biosystematic of Triatominae. *Ann Rev Entomol*, v. 11, p. 309-330, 1966.

VALENTE, S.A.S.; PIMENTEL, O.S.; VALENTE, V.C. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. *Rev.Soc Bras Med Trop*, v. 34 supl 1, p. 19-20, 2001.

WHO TECHNICAL REPORT SERIES. nº 811. Control of Chagas' disease. Geneva, p. 23, 1991.

WHO TECHNICAL REPORT SERIES nº 905. Control of Chagas' disease. 2nd ed, Geneva, 2002.

WYNNE DE MARTINI, G.J.; ORREGO, L.A.; MARIA DE RISSIO, A.; MUJICA, L.P. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* em um médio monofásico. *Medicina*. Buenos Aires, v. 40, p. suppl, p. 109-114, 1980.

WOOD, D.E.; PIPKING Sr. A.C. Multiplication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in an insect cell culture system. *Exp Parasitol*, v. 24, p. 176-83, 1969.

ZELEDON, R.; BOLANOS, R.; ROJAS, M. Scanning electron microscopic studies of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop*, v. 41, p. 39-43, 1984.