LUCIAMÁRE PERINETTI ALVES MARTINS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909 (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) A PARTIR DE TRIATOMÍNEOS SILVESTRES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Doutor em Análises Clínicas, Área de Parasitologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança

ARARAQUARA – SP
2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP

Campus de Araraquara

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ANÁLISES CLÍNICAS

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

MEMBROS:

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha

Prof. Dr. Sérgio Albuquerque

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Para meus pais Benedito e Apparecida,

Para meu marido Júnior,

Para meus filhos Cíntia e Tales,

Pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela amizade, confiança e incentivo na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança, pela amizade e incentivo na co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Esteves Pires Castanho, pela amizade e colaboração na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Altino Luiz Silva Therezo, pela ajuda, sem a qual não seria possível a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Osni Lázaro Pinheiro, Profa. Dra. Ana Paula Ceolotto Guimarães do Amaral, Profa. Dra. Ioshie Ibara Tanaka, docentes da Faculdade de Medicina de Marília, pela colaboração na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Odilon Marques de Almeida Filho, a Profa. Dra. Elizabeth Hernandes Correa, ao Prof. Ms. Dagoberto Rodrigues Correa pelo apoio durante a realização desta pesquisa.

Aos acadêmicos do curso de Medicina David Tibiriça Caravelas, Guilherme Tardim Frias e Janaína Cenedes Prudente de Oliveira e estagiário José Eduardo Camargo Pires, pelo auxílio na realização da parte experimental desta pesquisa.

Ao Dr. Antônio Leite Ruas-Neto, Coordenador Técnico Operacional de Zoonoses e Vetores do Rio Grande do Sul pelo apoio durante a coleta dos triatomíneos,

À Secretaria Estadual da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, pela autorização e auxílio para a coleta dos triatomíneos.

À equipe de coleta de Triatominae em Quaraí, RS: Bióloga Fernanda de Mello e técnicos Cledir Ribeiro, Paulino Sinem Benites, Carlos Moisés Araújo e Waldemar pelo auxílio durante os três dias de coleta.

Aos técnicos de serviço de parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília, Maria Aparecida Netto e Andréia Aparecida Tonhon Bueno Serapião.

Ao Maurício Barbosa dos Santos, técnico da Disciplina de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Marília pela imensa ajuda e dedicação, o que tornou possível este trabalho.

À Terezinha de Jesus Pereira Felipe, pelo auxilio na manutenção dos animais da experiência.

Ao responsável técnico do Biotério da Faculdade de Medicina de Marília, Paulo Henrique Klecher de Oliveira, pela criação e manutenção dos animais de experimentação.

À Maria Zenaide Tita Fernandes e colega Profa. Dra. Isabel Martinez da disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP, pelo apoio e amizade.

À Célia Regina Alves dos Santos Motroni, pela orientação na digitação.

À Cristiane de Menezes Tamura da Silva, pelo auxílio na digitação e finalização deste trabalho.

À bibliotecária Helena Maria da Costa Lima da Faculdade de Medicina de Marília pela colaboração na busca e organização das referências.

À bibliotecária Natalina Lambini Escremin e Maria Irani Coito, da UNESP de Araraquara pela conferência das referências bibliográficas.

Ao Carlos Fernandes dos Santos e Nelson Borgo da Faculdade de Medicina de Marília pela documentaçào fotográfica.

Ao Prof. Dr. Sebastião Marcos Ribeiro de Carvalho, pela realização da análise estatística.

À Profa. Elza Guerra pela amizade e colaboração na revisão do texto.

À Sra. Norma Bombini pela revisão do abstract.

À FUNDUNESP pelo financiamento de parte deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO **9**
ABSTRACT **10**
1 INTRODUÇÃO **11**
2 OBJETIVOS **21**
3 MATERIAL E MÉTODOS **22**
3.1 Características geográficas de Quaraí **22**
3.2 Coleta dos triatomíneos **23**
3.3 Transporte dos triatomíneos **24**
3.4 Exame dos triatomíneos **25**
3.5 Isolamento das cepas **25**
3.5.1 Em animais de experimentação 25
3.5.2 Cultura em meio LIT 26
3.6 Manutenção das cepas isoladas **27**
3.6.1 Em animais de experimentação..... 27
3.6.2 Cultura 27
3.6.3 Cepas não isoladas 28
3.7 Prova de precipitina **28**
3.8 Caracterização fenotípica **29**
3.8.1 Curva parasitêmica 29
3.8.1.1 Primeira curva parasitêmica 30
3.8.1.2 Segunda curva parasitêmica *31*

3.8.2 Tropismo tissular 31
3.8.3 Estudo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos 32
3.9 Caracterização genotípica 33
3.10 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 36
4.1 Exame dos triatomíneos coletados e cepas isoladas 36
4.2 Cepas não isoladas 38
4.3 Prova de precipitina 39
4.4 Caracterização fenotípica das cepas isoladas 40
4.4.1 Curva parasitêmica 40
4.4.1.1 Resultados da primeira curva parasitêmica 40
4.4.1.2 Resultado da segunda curva parasitêmica..... 51
4.4.2 Tropismo tissular 60
4.4.3 Estudo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos 73
4.5 Caracterização genotípica 103
5 DISCUSSÃO 105
5.1 Coleta dos triatomíneos 106
5.2 Prova da precipitina 108
5.3 Cepas não isoladas 110
5.4 Caracterização fenotípica 112
5.4.1 Curva parasitêmica 112
5.4.1.1 Período prepatente 112
5.4.1.2- Parasitemia 114
5.4.1.3- Duração da fase aguda 116
5.4.2 Tropismo tissular 117
5.4.4 Estudo morfológico..... 120
5.5 Caracterização genotípica 124
6 CONCLUSÃO 127
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 129
ANEXO 1 146

RESUMO

Embora a incidência da doença de Chagas tenha diminuído, os estudos sobre o *Trypanosoma cruzi* devem continuar, dada a dificuldade para o efetivo controle dos seus vetores. *Triatoma infestans* o principal vetor da doença de Chagas está praticamente eliminado no Brasil, entretanto outras espécies de Triatominae estão em processo de domiciliação, como o *Triatoma rubrovaria* no Rio Grande do Sul, constituindo-se em um fator de risco para o recrudescimento da infecção chagásica. Com o intuito de caracterizar cepas de *T. cruzi* que circulam na área rural, foram feitas buscas ativas de triatomíneos para isolamento desse protozoário em bairros do município de Quaraí, RS. Para tanto as fezes dos triatomíneos coletados foram obtidas por compressão abdominal para pesquisa de tripomastigotas metacíclicos. As fezes que se encontraram positivas foram inoculadas em animais de experimentação e em meio de cultura (LIT). Foram isoladas cinco cepas de *T. cruzi*, assim denominadas: QB1, QJ1, QJ3, QM1 e QM2, que apresentaram as seguintes características: predominância de formas tripomastigotas intermediárias após mensuração no 15º dia pós-infecção, picos parasitêmicos ao redor do17º dia pós-infecção, miotropismo na fase aguda e miosite na fase crônica da infecção. A análise do DNA que codifica a fração 24Sα do rRNA mostrou fragmentos de 110 pb, agrupando-as em *T. cruzi* I**.** Os serviços de vigilância epidemiológica foram informados sobre os resultados obtidos.

Palavras–chave: *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma rubrovaria*, Cepas, PCR.

ABSTRACT

Although the decrease in the incidence of Chagas' disease, the studies concerning *T. cruzi* shall continue, due to the difficulty in controlling its vector. *Triatoma infestans* the main vector of Chagas'disease is nearly eliminated in Brasil, nevertheless other Triatominae species are on domiciliate process, like *Triatoma rubrovaria* in Rio Grande do Sul State, representing a hazard factor for increasing Chagas infection. In order to characterize *T. cruzi* strains that naturally occur in the rural area, active searches were performed in order to isolated these strains in the district of Quarai, RS. Triatomine feces were collected by abdominal compression and the presence of metacyclic tripomastigotes was evaluated. The feces positive for metacyclic triatomines were inoculated in experimental animals and in the culture medium (LIT). Five *T. cruzi* strains were isolated: QB1, QJ1, QJ3, QM1 and QM2. The strains displayed a predominance of intermediate forms on 15th day post-infection. Parasitimia peak occurred on 17th day post-infection. Myotropism during acute phase and myositis in the chronic phase was oberved. The DNA analysis coding the 24 Sα r RNA fraction has displayed fragments of 110 pb, grouping them in *T. cruzi* I. The Epidemiologic Vigilance Services have been warmed about the achieved results.

Key–words *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma rubrovaria*, Strains, PCR.

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, descrita por Carlos Chagas em 1909, revelou-se como uma das mais importantes endemias rurais do continente americano, fato já referido pelo pesquisador no trabalho pioneiro: "Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade mórbida do homem" (CHAGAS, 1909). Na América Latina, estima-se que aproximadamente 17,4 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo que desse total, 4,8-5,4 milhões estão no Brasil (DIAS e SILVEIRA,1996; WHO,2002).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de diversas maneiras: por meio de vetores (CHAGAS, 1909; SCHUMUÑIS, 1991), transfusão de sangue (MAZZA, 1936; DIAS, 1945; PELLEGRINO, 1949; PEDREIRA DE FREITAS et al., 1952), congênita (SHIKANAI-YASSUDA et al., 1990), transplante de órgãos (SHIKANAI-YASSUDA et al., 1990), via digestiva (MEDINA-LOPES, 1988), secreções (DEANE et al.,1984) ou sexual, acidental em laboratórios (REICHE e JANKEVICIUS, 1997).

Dentre essas formas, a transmissão vetorial é tida como o principal meio de disseminação, causando cerca de 80% dos casos da doença de Chagas, e dela dependendo as

outras formas de transmissão, como a por transfusão sangüínea, responsável por 5 a 20% dos casos e a congênita ou vertical com cerca de 1% (SILVEIRA e REZENDE, 1994; ARAS et al., 2003).

Estima-se a presença da doença de Chagas no Brasil desde o século XVIII com focos limitados ao Nordeste e Sudeste do Brasil, disseminando-se no século XIX, com a introdução do vetor *Triatoma infestans* no país, que se propagou a partir do Rio Grande do Sul para São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná (DIAS, 1988).

Devido à imensa extensão da área considerada como endêmica no Brasil, que compreende mais de 3 milhões de Km^2 (FERNANDES et al., 1997) e a gravidade social da doença, as autoridades sanitárias iniciaram em 1975 o programa de controle da transmissão vetorial (SILVEIRA e REZENDE, 1994).

Esse programa visava a aplicação de inseticida de ação residual nas habitações tendo como alvo *T. infestans*, vetor de maior importância epidemiológica devido ao seu alto grau de antropofilia e domiciliação (SILVEIRA e REZENDE, 1994). Somente a partir de 1983, os programas de controle alcançaram toda a área endêmica (SILVEIRA e VINHÃES, 1998).

Atualmente, no Brasil, *T. infestans* encontra-se distribuído em alguns focos residuais ao oeste da Bahia e noroeste do Rio Grande do Sul (DIAS, 2002; RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002; WILHELMS et. al., 2003). Outras espécies como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus*, que juntamente com *T. infestans* tinham participação direta na transmissão da doença de Chagas, têm sido encontrados com níveis de infestação e de colonização intradomiciliar incompatíveis para que ocorra a transmissão do parasita pela via vetorial (VINHÃES e DIAS, 2000).

Após essas medidas de controle, algumas espécies, até então consideradas estritamente silvestres ou com baixa capacidade invasiva em relação aos ecótopos artificiais, foram capturadas em diversos locais do Brasil, demonstrando a manutenção do ciclo silvestre da tripanossomíase e a possibilidade de colonização desses triatomíneos nos domicílios, deixando evidente a necessidade da vigilância epidemiológica constante (VINHÃES E DIAS, 2000).

Assim, Barretto e Ribeiro (1981) relataram o encontro do *T. arthurneivai* em lugares pedregosos de algumas localidades do Estado de Minas Gerais e São Paulo. Apesar de não estarem naturalmente infectados, esses triatomíneos mostraram experimentalmente, forte potencial de infecção.

Mello (1982), pesquisando triatomíneos silvestres em Goiás, capturou exemplares de *Rhodnius neglectus, Psammolestes tertius, T. costalimai, T. pseudomaculata* e *T. sordida*. Entre esses, dois insetos estavam parasitados por *T. cruzi*, sendo um de *T. costalimai* e outro de *T. psedomaculata*.

Schlemper Jr et al. (1985) capturaram *P. megistus* e *R. domesticus* em ninhos de gambá e roedores na Ilha de Santa Catarina – SC, com índices de infecção pelo *T. cruzi* elevados, 84,5% e 66,6% respectivamente.

Ferraz Filho e Rodrigues (1987) coletaram em ocos de árvores, ninhos de gambás, aves e abaixo de pedras da região de Campinas – SP, exemplares de *P.megistus, R. neglectus, R. arthurneivai* e *Psammolestes tertius*. A infecção pelo *T. cruzi* foi encontrada em 10,26% dos exemplares de *P. megistus* e em 6,65% de *R. neglectus*.

Souza et al. (1988) descreveram um caso humano de doença de Chagas na Ilha do Mosqueiro – Pará, sendo *R. pictipes* o provável vetor. Exemplares dessa espécie foram capturados no interior da residência do paciente e também em palmeiras localizadas nas proximidades da moradia.

Ribeiro et al. (1991) coletaram exemplares de *Psammolestes tertius* em ninhos de aves nos Estados de Minas Gerais e São Paulo infectados pelo *T. cruzi*.

Bento et al. (1992) realizando um estudo na área rural de Teresina – Piauí, encontraram, em ecótopos artificiais, exemplares *de T. brasiliensis, P. geniculatus, R. pictipes* e *R. prolixus*; nos ecótopos naturais, foram encontrados exemplares de *R. neglectus, R. prolixus* e *R. nasatus*. Desses triatomíneos, estavam parasitados pelo *T. cruzi* 30% daqueles capturados nos ecótopos artificiais e 21,9% daqueles capturados nos ecótopos naturais.

Coura et al. (1994) descreveram o ataque de *R. brethesi* em populações humanas no município de Barcelos – AM, capturando vários exemplares adultos e ninfas entre as fibras da palmeira do local. Apesar de os autores não relatarem a infecção dos triatomíneos por *T. cruzi*, a positividade dos testes sorológicos para anticorpos anti *T. cruzi* em vários moradores do local demonstrou uma possível adaptação desses triatomíneos ao peridomicílio e posteriormente ao domicílio.

Gonçalves et al. (2000) capturaram *T. vitticeps* no município de Triunfo – RJ; desses insetos, 65,54% apresentaram infecção pelo *T. cruzi*.

No Rio Grande do Sul, espécies como *T. rubrovaria, T. circummaculata* e *P. tupynambai* podem assumir a condição de vetores no ambiente domiciliar (SILVEIRA e VINHÃES, 1998).

T. rubrovaria, espécie autóctone de hábitos silvestres (ROSA, 1999, RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002), é comum nas regiões do centro ao sul e oeste do Estado, tendo como habitat buracos e fendas em lugares pedregosos; podem desenvolver-se na fase ninfal a partir da hemolinfagia sobre baratas do gênero *Blaptica*, além destas, alimentam-se de répteis e roedores (RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002; BARRETO, 1976) mantendo assim o ciclo silvestre da doença (SILVA, 1985).

Dados recentes têm mostrado um aumento da presença de *T. rubrovaria* em moradias humanas no sul do Brasil, indicando que essa espécie voa freqüentemente para encontrar novos habitats, podendo colonizar o peri e o intradomicílio, lugares anteriormente colonizados pelo *T. infestans* (ALMEIDA et al., 2000). Essa espécie é de controle difícil, pois se encontra largamente dispersa no meio silvestre adjacente às casas (ROSA, 1995; DIAS, 2000).

Outras espécies podem ser encontradas nas mesmas regiões em que *T. rubrovaria* coloniza, tais como *T. circummaculata* e *P. tupynambai*, embora essa última tenha um micro-habitat diferente. Essas espécies já foram encontradas parasitadas por *T. cruzi* (SALVATELLA, 1986, ROSA et al., 2000).

Segundo Aragão e Dias (1956) e Galvão et al. (1998), as espécies de triatomíneos sofrem influências de fatores climáticos e ambientais em sua distribuição, justificando assim, a predominância de certas espécies em determinadas regiões, como por exemplo *T. rubrovaria* no Rio Grande do Sul (Brasil), Misiones, Corrientes, Entre Rios (Argentina) e Uruguai (ROSA, 1995).

Vários fatores influenciam a susceptibilidade vetorial dos triatomíneos como a voracidade e estádio evolutivo do inseto, seu grau de antropofilia, irritabilidade do vetor e da fonte alimentar, capacidade de invasão domiciliar e colonização, tempo de sucção- defecação, volume e características da dejeção, adaptabilidade à cepa circulante, potencial invasivo de espécies silvestres, vulnerabilidade e resistência aos inseticidas, capacidade de multiplicação e diferenciação do *T. cruzi* em seu interior, efeito da temperatura e densidade populacional dos insetos (SOUSA, 1988; DIAS, 2002).

Os triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*, deixam as formas tripomastigotas metacíclicas na pele ou mucosas íntegras do hospedeiro susceptível juntamente com suas fezes após realizar a hematofagia. Assim, ao entrar no hospedeiro, o tripomastigota

metacíclico penetra no interior de células, principalmente macrófagos, fibroblastos, células de Schwann e musculares estriadas e lisas, transformando- se em formas amastigotas, originando ninhos parasitários, que rompem essas células, liberando no interstício as formas parasitárias íntegras ou degeneradas e restos da célula hospedeira, que vão atuar como imunógenos e mediadores químicos (LOPES, 2002).

Ainda para Lopes (2002), nos períodos iniciais da inflamação, a reação focal ocorre à custa de mononucleares, onde, dias após associam-se neutrófilos e eosinófilos, e com a evolução da infecção, o exsudato passa a ser constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos. Essa mudança da celularidade observada, seria explicada experimentalmente, pelo aparecimento de anticorpos séricos, depósito de imunoglobulinas "*in situ*" e hipocomplementemia. Já, na fase crônica, há diminuição acentuada do parasitismo tecidual, podendo a resposta inflamatória constituir uma das lesões básicas na doença de Chagas.

Desde a descrição da doença, vários estudos para elucidar o mecanismo de ação do protozoário *T. cruzi* foram realizados. Assim, Vianna, em 1911, referia o tecido cardíaco como órgão de predileção do parasita, relatando no interior das fibras musculares as formas parasitárias em leishmania (amastigotas) e sua reprodução por divisão binária. Referia também vários locais onde se observava focos inflamatórios com degeneração das fibras cardíacas, porém sem a presença do parasita.

O autor acima citado também observou outros tecidos parasitados como o sistema nervoso, glândulas, ovário e testículo, como também a presença de focos inflamatórios.

Além dos órgãos parasitados encontrados por Vianna (1911), Chagas (1916), surpreendeu-se em encontrar o baço e o fígado com intensas lesões e ausência de parasitas, atribuindo essas lesões a toxinas do tripanossoma. Estudos experimentais realizados por Andrade (1985), mostraram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem determinar lesões

teciduais próprias na fase aguda da infecção como conseqüência do tropismo específico para as várias células do hospedeiro.

Brumpt (1913) foi quem pela primeira vez observou que *T. cruzi* de diferentes procedências poderiam ter comportamentos diversos. Vários estudos para determinar a preferência tissular das cepas foram realizadas, dentre os quais podemos citar, Brand et al. (1949), que estudando a cepa Brasil, observaram que ocorria uma tendência parasitária por células do sistema retículo endotelial, atualmente sistema monocítico fagocitário (SMF) e do miocárdio. Campos (1927) observou neurotropismo em cepas isoladas de *Dasypus* sp e Federici et al. (1964) estudando a cepa Colombiana observaram parasitismo predominante em músculo esquelético e cardíaco.

Ao estudar várias cepas de *T. cruzi* quanto à virulência e patogenicidade, tropismo tissular, morfologia, antigenicidade, Andrade (1974) agrupou as cepas em três tipos:

- tipo I: picos parasitêmicos elevados entre o 9º e 10º dias da infecção, alta virulência, predomínio de formas delgadas e acentuado tropismo pelo SMF no início da infecção; predomínio de formas largas e miotropismo na infecção avançada;
- tipo II: picos irregulares entre 12º e 20º dias de infecção, virulência variável, número de formas delgadas e discreto tropismo pelo SMF no início da infecção. Predomínio de formas largas em todo o curso da infecção e lesões miocárdicas predominantes;
- tipo III: picos parasitêmicos entre 20º e 30º dias, baixa virulência. Predomínio de formas largas e miotropismo em todo o curso da infecção.

Para Alvarenga e Bronfen (1997), as cepas de *T. cruzi* evoluem em determinado vetor limitadas pelos produtos de secreção intestinal e produtos de digestão do sangue ingerido pelo inseto, que podem atuar como inibidores ou não de sua sobrevivência.

Segundo Macedo e Pena (1998), a diversidade das fontes alimentares dos triatomíneos seria a responsável pela variedade populacional encontrada nas cepas de *T. cruzi*, levando à formação de clones. Assim, cada clone representa uma linhagem que se reproduz por divisão binária, permanecendo inalterada por várias gerações até que ocorram as mutações. Essa variabilidade de cepas de *T. cruzi* poderia ser a responsável pelas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas quando comparamos grupos de pacientes moradores em diferentes regiões geográficas (ANDRADE, 1985).

Zingales et al. (1998) relatam que *T. cruzi* não é composto por uma população homogênea de parasitas, sendo formado por várias sub populações que circulam no ciclo doméstico e silvestre.

Por meio de estudo isoenzimático de várias cepas de *T. cruzi*, Miles et al. (1980) descreveram o encontro de três zimodemas diferentes, correlacionando-os com o tipo de ciclo, ou seja, Z1 e Z3 com cepas que circulam no ciclo silvestre, e o Z2 com as que circulam no meio doméstico. Em 1988, Tibayrenc e Ayala, também estudando o perfil enzimático de várias cepas de *T. cruzi*, encontraram 43 zimodemas diferentes entre 121 cepas, referindo ser impossível enumerar os zimodemas do *T. cruzi* e concluíram que a variabilidade genética do parasita é reflexo da longa evolução em múltiplos clones.

Na busca por caracteres comuns entre as cepas do *T. cruzi*, marcadores moleculares como o perfil genômico do DNA do cinetoplasto (MOREL et al., 1980) foram estudados, sem que se conseguisse uma clara definição dos grupos.

Em 1990, Arruda et al. sequenciaram a porção do DNA que codifica a fração 24 S α do rRNA. Essa região permitiu a separação de 16 cepas de *T. cruzi* em dois grupos (SOUTO e ZIGALES, 1993).

Souto et al. (1996), realizando a reação de Polimerase Chain Reaction (PCR) da porção do DNA que codifica a fração 24 S α do rRNA e do espaço não transcrito do gene mini exon, mostraram uma clara divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens, ou seja, definiram como linhagem 1 as cepas que apresentavam 125 pb do rRNA e 300 pb do mini-exon, e como linhagem 2, cepas com 110 pb no rRNA e 350 pb do mini-exon.

Para mostrar uma possível associação de fatores epidemiológicos com as duas linhagens definidas acima, Zingales et al. (1998), realizaram a reação de PCR da fração 24 S α rRNA e mini-exon em 157 cepas de *T. cruzi* obtidas de triatomíneos, humanos e animais reservatórios de 12 estados do Brasil, mostrando uma forte associação da linhagem 1 com o ciclo doméstico, e da linhagem 2 com o ciclo silvestre.

Recentemente, um Simpósio realizado na cidade do Rio de Janeiro, padronizou e agrupou as subpopulações de *T. cruzi* em dois grandes grupos (RECOMMENDATIONS..., 1999):

a- *T. cruzi* I, as cepas com zimodema 1, linhagem 2;

b- *T. cruzi* II, cepas com zimodema 2, linhagem 1.

As cepas que exibem características híbridas ou enquadradas no zimodema 3 de Miles et al. (1980) são referidas como *T. cruzi* sem grupo definido.

Dessa forma, torna-se importante identificar e caracterizar morfológica, biologica, bioquímica e molecularmente as cepas isoladas. Para Brener e Chiari (1963), cepas de *T. cruzi* isoladas de *T. infestans* do Estado do Rio Grande do Sul, apresentavam morfologia peculiar e se distinguiam pela inusitada largura.

Um estudo de busca e coleta realizado no município de Quaraí- RS, capturou dois exemplares de *T. rubrovaria* infectados pelo *T. cruzi* (MARTINEZ e ROSA, 2003), cujas cepas foram isoladas, denominando-se QG1 e QG2 e caracterizadas por Martinez (2004).

O isolamento das cepas (QG1, QG2) despertou o interesse de uma busca mais ostensiva, procurando delimitar epidemiologicamente grande parte desse município, na tentativa de caracterizar morfológica e biologicamente por reações moleculares as cepas isoladas, assim como, notificar as autoridades sanitárias sobre o número e as características das cepas de *T. cruzi* isoladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar e caracterizar morfológica e biologicamente cepas de *Trypanosoma cruzi* a partir de triatomíneos silvestres, *Triatoma rubrovaria*, coletados no município de Quaraí, Estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Específicos

2.2.1 Caracterização fenotípica:

A caracterização fenotípica avaliará os seguintes parâmetros: curva parasitêmica, período prepatente, parasitemia, duração da fase aguda, tropismo tecidual e morfologia das formas tripomastigotas.

2.2.2 Caracterização genotípica:

Análise do domínio divergente do gene 24 S α rRNA para identificar as cepas isoladas segundo os dois grupos de *T. cruzi* atualmente aceitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

De modo a facilitar a compreensão, este capítulo foi subdividido como se segue.

3.1 Características geográficas de Quaraí

O município de Quaraí (Figura 1) está localizado na fronteira oeste do Estado do Rio Grande do Sul, situado a 30º23'17"de latitude sul e 56º29'56"de longitude oeste. Possui altitude média de 112m e área de 3.238 Km^2. Tem como limites geográficos ao norte o município de Uruguaiana, ao sul o município de Santana do Livramento e República Oriental do Uruguai, ao leste o município de Rosário do Sul e a oeste o município de Alegrete (FINGER et al., 2001). A população é estimada em 23.804 habitantes, com densidade demográfica de 7,56 habitantes/ Km^2 (Quaraí: 2000/2004).

Possui clima subtropical, com grande amplitude térmica, sendo que no mês mais frio, as temperaturas oscilam entre 3ºC e 18ºC e, e no mês mais quente, superam 22ºC, com máximas acima de 30ºC no verão, tendo a temperatura média anual de 19,7ºC

(VILLANUEVA, 2002) sendo o tipo de vegetação predominante a estepe (IBGE, 2005). No solo predominam afloramentos areníticos (RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002).

3.2 Coleta dos triatomíneos

Os triatomíneos foram coletados no período de 23/04/03 a 25/04/03 em seis bairros do município de Quaraí, RS, abaixo discriminados com suas respectivas distâncias aproximadas do perímetro urbano:

- Branquilhos: 6,2 Km
- Cerro do Jarau e Jarau*: 15,8 Km
- Cerro do Marco: 43,6 Km
- Macarrão: 12,9 Km
- Quaraí-Mirim: 23,5 Km

* Não identificado no mapa, porém localidade próxima à Cerro do Jarau.

Esses bairros caracterizavam-se por apresentar ambientes pastoris, terrenos pedregosos (areníticos), sem residências próximas, onde havia criações de ovinos, bovinos e presença de animais silvestres (Figura 1).

Para a realização da coleta, contou-se com apoio da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul e a colaboração dos funcionários. As espécies conhecidas e coletadas nos bairros acima referidos, por ordem de freqüência foram: *T. rubrovaria, T. circummaculata, T. tupynambai*, que foram identificados segundo as publicações de Lent e Wygodzinsky (1979).

MAPA

3.3 Transporte dos triatomíneos

Os exemplares coletados foram colocados em frascos de polietileno e acondicinados no interior de caixas de isopor. Foram transportadas em mãos para Araraquara, São Paulo.

3.4 Exame dos triatomíneos

Os triatomíneos coletados foram examinados obtendo-se as fezes por compressão abdominal, as quais foram diluídas em solução salina a 0,85% e observadas em microscópio óptico comum em aumento de 400 vezes. Uma porção das fezes dos triatomíneos positivos para Trypanosomatidae foi colhida, após o que foi feito esfregaço que secou à temperetura ambiente, posteriormente corou-se pelo método de Giemsa e a seguir examinou-se por microscopia óptica em aumento de 400 e 1000 vezes.

3.5 Isolamento das cepas

3.5.1 Em animais de experimentação

Uma porção das fezes de cada um dos triatomíneos que apresentaram formas de Trypanosomatidae foi inoculada em três camundongos "Swiss" com aproximadamente 20 dias de idade, peso médio de 16 gramas de ambos os sexos. Esses animais foram mantidos no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

A partir do 20º dia da inoculação, a ponta da cauda desses animais foi cortada para obtenção de uma gota de sangue, com intuito de verificar se tinha ocorrido o isolamento da cepa.

Esses camundongos foram examinados semanalmente até que se completassem 60 dias pós- infecção.

Após o isolamento das cepas, foram estudados parâmetros fenotípicos como: curva parasitêmica, período prepatente, parasitemia, duração da fase aguda, tropismo tecidual e morfologia das formas tripomastigotas, segundo parâmetros de Andrade (1974). Também foram realizados estudos genotípicos utilizando reação de PCR após amplificação da fração 24 S α do rRNA para enquadrar as cepas isoladas dentro dos dois grupos de *T. cruzi* atualmente aceitos (SOUTO e ZINGALES, 1993; RECOMMENDATIONS, 1999).

3.5.2 Cultura em meio LIT

Uma porção das fezes dos triatomíneos que se mostraram positivas foram inoculadas em meio de cultura LIT (liver infusion tryptose) desenvolvido por Camargo (1964), sendo nesse trabalho modificado como descrito abaixo. Os tubos de cultura foram mantidos a 28º C em estufa incubadora BOD, marca Marconi, MA 415/S.

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose)

NaCl (CarloErba®).....	4,0 g
KCl (Merck®).....	0.4 g
Na_2HPO_4 (Merck®).....	8,0 g
Glucose (Synth®).....	2,0 g
Tryptose (Oxoid®).....	5,0 g
Liver Infusion Broth (Difco®).....	5,0 g
Haemin (Sigma®).....	25,0 g
Soro fetal bovino (Gibco BRL®).....	100,0 mL
Água destilada/deionizada.....	qsp1000,0 mL

A hemina foi dissolvida em 0,5 mL de trietanolamina e os demais componentes do meio em água. Após misturados foram incubados em banho-maria a 68ºC/1h para inativação do soro e evitar formação de rosetas de flagelados na cultura. Quando frio, o pH foi medido com papel indicador Merch® e, quando necessário, acertou-se o pH para 7,2 com HCl. Filtrou-se em membrana 0,22 μm (500 mL Filter System – Corning® 430769 0,22 μm CA).

3.6 Manutenção das cepas isoladas

3.6.1 Em animais de experimentação

As cepas isoladas estão sendo mantidas por repiques quinzenais em camundongos "Swiss" de 20 dias de idade.

Para cada cepa, lotes de 4 e 5 animais de ambos os sexos foram utilizados, inoculando-se 0,2 mL de sangue heparinizado pela via intraperitoneal, usando-se seringa de insulina BL 1 cc, com agulha ULTRA-FINE®. O sangue é obtido por punção cardíaca de outro camundongo previamente infectado, estando o mesmo na fase aguda da infecção.

3.6.2 Cultura

As cepas isoladas estão sendo mantidas por repiques mensais, pipetando-se 1 mL da cultura anterior para dois novos frascos contendo meio LIT. Essas culturas são mantidas a 28º C como referido no item 3.5.2.

3.6.3 Cepas não isoladas

As cepas que não conseguiram se manter nos camundongos e meios de cultura foram desconsideradas. O sangue desses camundongos foi colhido para realização de pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* pelas técnicas de Hemaglutinação Indireta (Hema Cruzi 480, lote H20863L) e ELISA (CHAGATEK, lote 020313), para confirmação da não infecção.

3.7 Prova de precipitina

A identificação das fontes alimentares dos triatomíneos foi realizada no Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Mogi-Guaçú- SP, por meio da técnica de reação de precipitina em tubo capilar (teste do anel) descrita por Siqueira (1960).

O conteúdo intestinal dos triatomíneos que tiveram suas fezes positivas foi colhido, comprimindo-se o abdômen com lâmina desde o primeiro até o último segmento, sendo o material obtido recolhido em papel de filtro e mantido em geladeira. As amostras foram recortadas e transferidas para tubos de ensaios pequeno (13X100 mm) e cobertas com solução fisiológica 0,85%, e mantidas por 18 horas em geladeira a 4ºC.

Cada amostra foi testada frente à seguinte bateria de anti-soros: humano, ave, marsupial, roedor, cão, gato, porco e cabra, produzidos em coelhos. Com exceção dos anti-soros de cão e gato, todos os demais reagiram ao respectivo soro homólogo diluído a 1:10.000 e não reagiram ao soros heterólogos diluídos a 1:10. Após absorção, os anti-soros de cão e gato reagiram ao respectivo soro homólogo diluído a 1:8.000 e reagiram ao soro heterólogo diluído a 1:100.

Os exames foram realizados sob supervisão do Dr. Cláudio Casanova, responsável pelo laboratório da SUCEN de Mogi-Guaçú- SP.

3.8 Caracterização fenotípica

Para caracterizar as cepas isoladas de Trypanosomatidae como pertencentes ao gênero *Trypanosoma* espécie *T. cruzi* foram utilizados estudos baseados na curva parasitêmica, realizada em dois momentos, sendo um logo após o isolamento das cepas e o outro um ano após o isolamento; tropismo tissular por meio de exame anatomopatológico de vários órgãos na fase aguda e crônica da infecção e estudo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos no 15º dia da pós- infecção, conforme Andrade (1974).

3.8.1 Curva parasitêmica

Foram realizadas duas curvas parasitêmicas em momentos diferentes. A 1ª curva foi realizada logo após o isolamento das cepas de Trypanosomatidae, e a quantidade de tripomastigotas inoculados em cada camundongo foi o número que cada uma apresentava em 0,1 mL de sangue do camundongo doador, pois desconhecia-se o comportamento das mesmas. Já, a 2ª curva parasitêmica foi realizada um ano após o isolamento das cepas, utilizando para cada uma das diferentes cepas, inóculos contendo o mesmo número de formas tripomastigotas em 0,1mL de sangue.

Para as duas curvas, o sangue da cauda desses camundongos foi examinado para contagem dos tripomastigotas a partir do 3º dia pós-infecção, colhendo-o com pipeta automática de 5µL, seguindo-se a técnica de Brener (1962), com correção dos intercampos

(MARTINS, 1999). As contagens foram realizadas em microscópio óptico Carl Zeiss® JENA-JENAVAL, com objetiva de 40X e ocular de 10X, na proporção 1.

Essa contagem foi realizada três vezes por semana durante a fase aguda por um período de 68 dias (RASSI, 1979; PRATA, 2001).

Para determinar a virulência da cepa, utilizou-se como parâmetros o período prepatente, nível de parasitemia e taxa de letalidade.

3.8.1.1 Primeira curva parasitêmica

Para cada cepa isolada, sete camundongos "Swiss" de aproximadamente 20 dias de idade, com peso médio de 16 gramas de ambos os sexos foram utilizados.

A infecção foi realizada via intraperitoneal (como descrito no item 3.6.1), inoculando-se 0,1 mL de sangue colhido por punção cardíaca, de outro camundongo previamente infectado, na fase aguda da infecção, com o número de formas tripomastigotas que cada cepa apresentava no momento da inoculação. Dessa forma, os inóculos iniciais foram:

- cepa QB1- 4.667 tripomastigotas/ 0,1 mL de sangue;
- cepa QJ1- 14.320 tripomastigotas/ 0,1 mL de sangue;
- cepa QJ3- 1.560 tripomastigotas/ 0,1 mL de sangue;
- cepa QM1- 10.900 tripomastigotas/ 0,1 mL de sangue;
- cepa QM2- 466.720 tripomastigotas/ 0,1 mL de sangue.

3.8.1.2 Segunda curva parasitêmica

Para a realização da 2ª curva parasitêmica, foram utilizados para cada cepa, cinco camundongos "Swiss" de aproximadamente 20 dias de idade, com peso médio de 16 gramas de ambos os sexos.

A infecção foi realizada via intraperitoneal (como descrito no item 3.6.1), inoculando-se 0,1 mL de sangue diluído ou não, dependendo do número de tripomastigotas que cada cepa apresentava no momento, para que no inóculo fosse obtido o mesmo número de formas tripomastigotas para todas as cepas. Assim, para a realização da 2ª curva parasitêmica, o inóculo foi padronizado em cerca de 1.800 formas tripomastigotas para cada 0,1 mL de sangue.

3.8.2 Tropismo tissular

Para cada cepa foram utilizados 21 camundongos de ambos os sexos, com 20 dias de idade e peso médio de 16 gramas.

Esses camundongos foram infectados via intraperitoneal com 0,1 mL de sangue heparinizado (como descrito no item 3.6.1), colhido por punção cardíaca de outros dois camundongos previamente infectados na fase aguda da infecção. Para o cálculo do inóculo, foi realizado a média aritmética entre os dois camundongos conforme o número de tripomastigotas que cada um apresentava no momento da inoculação de acordo com as características de cada cepa. Assim, os inóculos foram os seguintes:

- cepa QB1- 34.220 tripomastigotas/0,1 mL de sangue;
- cepa QJ1- 2.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue;
- cepa QJ3- 3.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue;
- cepa QM1- 3.820 tripomastigotas/0,1 mL de sangue;
- cepa QM2- 92.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue.

Os camundongos foram eutanasiados através de inalação por CO_2 e em seguida, coletados coração, baço e fragmentos de esôfago, cólon, fígado e músculo esquelético (coxa). Durante a fase aguda os órgãos foram coletados no 7º, 10º, 14º, 21º e 30º dias pós-infecção, e na fase crônica, no 150º e 180º dias pós-infecção, sendo lotes de três camundongos para cada dia (ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

Após coletados, os órgãos foram fixados em solução de formol a 10%, incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes seriados de 4μm de espessura e corados pela Hematoxilina-eosina.

As cepas isoladas foram classificadas de acordo com Andrade, 1985.

3.8.3 Estudo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos

Foram realizadas lâminas de gota espessa e esfregaço em camada delgada com o sangue de camundongos previamente infectados, estando os mesmos no 15º dia da infecção.

As lâminas de gota espessa foram coradas pelo método de Giemsa e as de esfregaço em camada delgada pelo Giemsa segundo Rosenfeld e observadas em microscópio óptico Leica Leitz DMRXE, que está acoplado à uma câmara filmadora Leica DC 100, onde foi realizada a captura das formas tripomastigotas observadas. Essas formas foram mensuradas no analisador de imagem, por meio do “software” Leica Qwin, utilizando uma rotina especialmente desenvolvida para essa análise.

As formas tripomastigotas sangüíneas foram avaliadas morfometricamente quanto aos seguintes parâmetros (DIAS e FREITAS FILHO, 1943; BARRETO, 1965):

comprimento do flagelo, comprimento do corpo, comprimento total, largura do corpo, área do cinetoplasto, distância posterior/núcleo, distância anterior/núcleo, índice nuclear.

3.9 Caracterização genotípica

Foi realizada por meio da análise do domínio divergente do gene 24 S α rRNA que permite a classificação das cepas de *T. cruzi* nos dois grupos atualmente aceitos pelo Satellite Meeting (RECOMMENDATIONS, 1999), ou seja *T. cruzi* I e *T. cruzi* II.

Análise do domínio divergente do gene 24 S α rRNA foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos D71 (5'-AAGGTGGGTCGACAGTGTGG-3') E D72 (5'TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3') e realizada por eletroforese em gel de acrilamida a 8% corado com prata, segundo a técnica de Souto e Zingales (1993), utilizando 25 pb como marcador de peso molecular da Amerstdam/Pharmacia.

Como controles do *T. cruzi*, foram utilizadas as cepas Y (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953) e Bolívia (FUNAYAMA e PRADO JÚNIOR, 1974), além do controle negativo.

3.10 Análise estatística

Os resultados das mensurações para as dimensões comprimento total, do corpo, do flagelo, da largura do corpo, área do cinetoplasto (ACIN), distância posterior núcleo (PN), distância anterior núcleo (NA) e índice nuclear (IN) foram resumidos por meio de

tabelas, gráficos de caixas (*box-plot)*, medidas de centralidade, variabilidade e posição, respectivamente: mediana, semi-amplitude interquartílica, valores mínimo e máximo, 1º (Q_1) e 3º (Q_3) quartis, para os grupos em estudo, segundo o tipo de cepa, as quais descrevem o conjunto de dados em estudo (ARMITAGE e BERRY, 1997), utilizando-se do programa SPSS 12.0.

Essas medidas são indicadas quando o conjunto de dados apresenta distribuição não-normal e, neste estudo para testar a normalidade das distribuições utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, cujo resultado foi significante para as variáveis largura do corpo da cepa, ACIN da cepa e IN da cepa, o que justifica a escolha delas (ARMITAGE e BERRY, 1997).

Neste estudo, fez-se uma análise exploratória dos dados, mostrando a disposição do conjunto de valores em estudo por meio de uma figura denominada de *box-plot* (gráfico em forma de "caixa"), na qual são apresentados: valores exteriores abaixo do limite inferior (chamados de valores discrepantes ou *outliers* - que são os valores menores que o limite inferior – cujo valor é igual a [Q_1 – 3,0.(Sem.Interq.)] (extremo da linha que segue do retângulo para baixo – "bigode"), primeiro quartil (base da caixa) - Q_1, mediana (segmento dentro da caixa-Md), terceiro quartil – Q_3 – (lado superior da caixa), limite superior – cujo valor é igual a [Q_1 + 3,0.(Sem.Interq.)] (extremo da linha que segue do retângulo para cima – "bigode"), valores exteriores acima do limite superior (chamados de valores discrepantes ou *outliers* - que são os valores maiores que [Q_1 + 3,0.(Sem.Interq.)]. Deve-se observar que os valores exteriores são aqueles que se distanciam do conjunto de dados por serem muito altos ou muito baixo em relação aos demais (ARMITAGE e BERRY, 1997).

Para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as medidas efetuadas para cada cepa, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (análise de

variância para dados com distribuição não-normal), adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade para a rejeição da hipótese de nulidade (ARMITAGE e BERRY, 1997).

4 RESULTADOS

4.1 Exame dos triatomíneos coletados e cepas isoladas

Foram coletados um total de 453 exemplares de triatomíneos no município de Quaraí sendo:

- *T. rubrovaria*- 419 ninfas e 2 adultos;
- *T. circummaculata*- 26 ninfas;
- *P. tupynambai*- 6 ninfas.

Os 421 exemplares de *T. rubrovaria* foram coletados nos seguintes bairros:

- Branquilhos: 41 exemplares;
- Cerro do Jarau: 50 exemplares;
- Cerro do Marco: 16 exemplares;

- Jarau: 158 exemplares;
- Macarrão: 136 exemplares;
- Quaraí-Mirim: 20 exemplares.

Desse total, 419 eram ninfas e 2 adultos, sendo:

- ninfas de 1º estádio: 20 exemplares;
- ninfas de 2º estádio: 63 exemplares;
- ninfas de 3º estádio: 95 exemplares;
- ninfas de 4º estádio: 103 exemplares;
- ninfas de 5º estádio: 138 exemplares.

Os 26 exemplares de *T. circummaculata* foram coletados nos bairros:

- Cerro do Jarau: 6 exemplares;
- Macarrão: 20 exemplares.

Sendo:

- ninfas de 3º estádio: 3 exemplares
- ninfas de 5º estádio: 23 exemplares

Os exemplares de *P. tupynambai* foram coletados no bairro Jarau, e não foram examinados.

Dos 421 exemplares de *T. rubrovaria* coletados, foram examinados 309, sendo que 112 insetos morreram durante o transporte.

Desses 309 triatomíneos examinados, 13 (4,2%) tiveram as fezes positivas para Trypanosomatidae. Os exemplares de *T. circummaculata* foram todos negativos para Trypanosomatidae.

Dentre os 13 exemplares de *T. rubrovaria* que se encontravam infectados com Trypanosomatidae, somente em cinco (1,6%) situações conseguiu-se isolar cepas de *T. cruzi*, as quais foram assim denominadas:

1- Quaraí - Branquilhos 1 – QB1;

2- Quaraí - Jarau 1 – QJ1;

3- Quaraí - Jarau 3 – QJ3;

4- Quaraí – Macarrão 1 – QM1;

5- Quaraí – Macarrão 2 – QM2.

No exame dos esfregaços das fezes desses 13 triatomíneos, que foram corados pelo método de Giemsa para uma análise mais detalhada das formas tripomastigotas encontradas, não foi evidenciada a presença de formas de Trypanosomatidae.

4.2 Cepas não isoladas

O soro do sangue dos oito outros camundongos que não mostraram formas de Trypanosomatidae foram examinados por meio de Hemaglutinação Indireta e ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* , os quais foram negativos.

4.3 Prova de precipitina

A prova de precipitina foi realizada em 13 (4,2%) triatomíneos que tiveram suas fezes positivas para Trypanosomatidae, assim distribuídas por bairro: Macarrão: seis ninfas de 5º estádio; Jarau: três ninfas de 5º estádio; Cerro do Marco: duas ninfas de 5º estádio; Cerro do Jarau: uma ninfa de 4º estádio; Branquilhos: uma ninfa de 5º estádio.

Os anti-soros utilizados reconheceram as diluições de seus homólogos a pelo menos 1: 8000, e não reconheceram diluições de seus heterólogos a 1 : 10, com exceção dos anti-soros de cão e gato que apresentaram reação cruzada com diluições a 1 : 1000. Assim os resultados obtidos estão expressos no Quadro 1.

Quadro 1. Fontes alimentares de exemplares de *T. rubrovaria* portadores de Trypanosomatidae, segundo bairros do município de Quaraí,RS.

Bairro	Exemplares	Anti-soro				
		Roedor	Cabra	Humano	Porco	Não reagente
Jarau	I	+				
	II	+				
	III					+
Macarrão	I					+
	II					+
	III		+			
	IV		+			
	V		+			
	VI		+			
Branquilhos	I			+	+	
Cerro do Marco	I	+				
	II	+				
Cerro do Jarau	I					+

A ocorrência de amostras não reagentes pode ter sido motivada pelo material insuficiente ou pelo fato de o sangue ingerido ser proveniente de um animal diferente dos anti-soros testados.

4.4 Caracterização fenotípica das cepas isoladas

4.4.1 Curva parasitêmica

4.4.1.1 Resultados da primeira curva parasitêmica

Os resultados obtidos com a realização da primeira curva parasitêmica estão expressos nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, Figuras 2 e 3.

Tabela 1. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QJ1 de *T. cruzi*, após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
3º	-	-	15	-	-	-	15
5º	-	31	15	31	15	47	78
7º	-	47	47	124	156	93	1098
10º	-	342	622	1680	3293	778	4208
12º	31	436	1555	2474	8690	545	2162
14º	125	436	5306	5943	1167	274	1991
17º	78	31	2598	10032	560	122	1525
19º	15	31	373	10579	887	15	1447
21º	15	-	529	9926	2226	91	3202
24º	47	-	244	9366	4147	62	3345
26º	15	-	156	15228	2520	91	4931
28º	-	15	124	14251	3127	62	4667
31º	31	78	202	12757	5228	218	1307
33º	15	31	264	11201	8629	669	4117
35º	31	305	762	18174	5943	*	3476
38º	183	156	1447	5855	5865	*	671
40º	15	732	592	2162	6830	*	31
42º	15	124	1433	2007	3220	*	823
45º	-	701	404	793	1790	*	311
47º	-	1098	467	342	976	*	513
49º	15	249	467	296	264	*	*
52º	91	311	335	549	152	*	*
54º	15	140	249	31	93	*	*
56º	47	93	335	31	78	*	*
59º	62	233	488	78	122	*	*
61º	404	93	62	93	152	*	*
63º	513	482	122	213	78	*	*
66º	233	529	93	233	249	*	*
68º	233	622	93	156	140	*	*

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa
(*) morte do camundongo

Observou-se pela Tabela 1, que a parasitemia variou bastante nos sete camundongos estudados com a cepa QJ1. O período prepatente da cepa QJ1 variou entre o 3º e 10º dias, sendo os primeiros picos parasitêmicos obtidos entre o 10º e 19º dias em todos os

camundongos. Após esse dia, ocorreu um declínio no número de tripomastigotas, com nova ascenção das formas parasitárias entre o 33º e 47º dias, onde foi observado o nível máximo de 18.174 tripomastigotas/ 5µL de sangue. Durante a realização da curva parasitêmica da cepa QJ1, dois camundongos morreram.

Apesar de não haver negativação dos tripomastigotas sangüíneos, houve uma diminuição no número dessas formas após o 49º dias, em seis dos camundongos estudados indicando o final da fase aguda e início da fase crônica, com exceção do camundongo C1 que mostrou nova ascenção no 61º-dia.

Tabela 2. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QJ3 de *T. cruzi*, após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
3º	-	-	-	-	-	-	-
5º	-	-	-	-	-	-	-
7º	-	-	-	-	-	-	-
10º	-	30	-	-	30	61	-
12º	15	91	-	-	61	-	15
14º	61	213	31	15	122	62	15
17º	15	61	15	31	78	15	30
19º	-	15	-	15	78	61	15
21º	31	31	31	31	183	47	15
24º	47	-	61	61	15	15	31
26º	15	31	15	-	47	61	15
28º	31	15	31	15	61	92	15
31º	92	92	15	-	61	61	31
33º	92	61	31	31	244	61	61
35º	78	31	31	47	93	244	31
38º	153	183	31	31	61	61	61
40º	15	31	31	15	31	31	15
42º	78	31	47	15	125	93	92
45º	244	31	61	92	47	31	-
47º	31	-	-	31	15	31	-
49º	15	15	47	15	92	15	15
52º	91	31	91	183	31	15	31
54º	61	47	31	31	15	15	15
56º	92	15	15	15	15	92	15
59º	31	31	31	-	15	15	15
61º	15	47	-	47	15	31	15
63º	61	31	61	61	31	47	15
66º	31	31	31	31	15	92	31
68º	15	31	31	31	31	61	15

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa

Observou-se pela Tabela 2, que o período prepatente da cepa QJ3 variou do 3º ao 12º dias com parasitemia baixa, mantida durante todo o período estudado. O primeiro pico parasitêmico foi observado entre o 14º e 24º dias, com máximo de 213 tripomastigotas/ 5µL de sangue observado com o camundongo C2 no 14º dia. Após esse período, ocorreu um

declínio no número das formas sangüíneas, com nova ascenção entre o 33º e 52º dias, com máximo de 244 tripomastigotas/ 5µL de sangue.

A partir do 54º dia, houve uma diminuição do número de tripomastigotas sangüíneos, com alguns camundongos apresentando leituras negativas, indicando final da fase aguda e início da fase crônica.

Tabela 3. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QM1 de *T. cruzi*, após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
3º	15	-	15	91	-	-	31
5º	31	15	47	47	31	-	-
7º	47	62	218	61	47	-	-
10º	47	15	1571	140	701	-	152
12º	187	109	1914	701	545	15	274
14º	451	366	4238	404	884	31	2074
17º	498	545	4185	488	684	183	2225
19º	653	809	3314	187	1037	311	3476
21º	467	965	4299	218	451	732	2894
24º	156	809	1571	183	373	244	3407
26º	373	1276	1891	187	311	762	2956
28º	373	778	1982	280	451	244	3454
31º	560	871	2520	427	747	274	2940
33º	653	1042	2622	451	684	671	5258
35º	1058	1027	2069	823	825	233	4963
38º	1571	747	*	3476	996	579	3376
40º	1758	1891	*	1245	427	342	4543
42º	1805	2744	*	1556	1281	498	5227
45º	1789	1494	*	1098	233	884	3158
47º	1229	1830	*	607	335	327	2396
49º	1867	2348	*	856	518	389	4138
52º	1245	1369	*	244	187	202	2738
54º	1647	1291	*	610	358	140	1830
56º	902	1494	*	996	31	233	1416
59º	366	640	*	1089	91	62	638
61º	671	1120	*	1403	61	187	640
63º	244	809	*	187	91	93	488
66º	358	1058	*	436	15	366	700
68º	47	1229	*	389	31	47	871

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa
(*) morte do camundongo

A análise da Tabela 3 mostrou que o período prepatente da cepa QM1 variou do 3º ao 10º dias, sendo o primeiro pico parasitêmico observado entre o 17º e 26º dias, com um máximo de 4.299 tripomastigotas/ 5µL de sangue. Após esse período houve um declínio

no número das formas sangüíneas, com novo pico entre o 42º e 45º dias, com máximo de 5.227 tripomastigotas/ 5µL de sangue, seguido de nova diminuição até o final das leituras, indicando o final da fase aguda e início da fase crônica. Durante a realização da curva parasitêmica, ocorreu a morte de um camundongo (C3).

Tabela 4. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QM2 de *T. cruzi*, após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
3º	171	-	-	-	187	366	78
5º	3112	1011	-	-	1447	671	280
7º	14188	6647	-	-	10330	1708	451
10º	121162	47447	15	15	18669	4635	3796
12º	152463	77912	327	498	19820	965	3734
14º	160056	81023	3171	5352	44432	13172	14270
17º	165905	175364	7806	26651	120975	21905	28564
19º	158811	162296	12380	24020	183877	*	*
21º	*	122686	15246	36467	140889	*	*
24º	*	*	18504	58621	*	*	*
26º	*	*	43685	28004	*	*	*
28º	*	*	15371	*	*	*	*
31º	*	*	22278	*	*	*	*
33º	*	*	21469	*	*	*	*
35º	*	*	26883	*	*	*	*
38º	*	*	20536	*	*	*	*
40º	*	*	20723	*	*	*	
42º	*	*	19354	*	*	*	*
45º	*	*	22443	*	*	*	*
47º	*	*	12975	*	*	*	*
49º	*	*	*	*	*	*	*

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa
(*) morte do camundongo

Observou-se com a Tabela 4, que o período prepatente da cepa QM2 variou do 3º ao 7º dias, sendo o pico parasitêmico observado entre o 17º e 19º dias, com parasitemia máxima de 175.364 tripomastigotas/ 5µL de sangue.

Essa cepa tem mostrado um comportamento bastante agressivo para o camundongo “Swiss”, observando-se a morte desses animais no pico da parasitemia, ao redor do 17º dia pós-infecção.

Tabela 5. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QB1 de *T. cruzi*, após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
3º	-	15	-	-	-	31	-
5º	15	15	-	31	15	31	-
7º	-	47	31	31	61	62	31
10º	47	1250	78	93	1189	47	-
12º	213	607	62	488	529	47	-
14º	91	1446	152	249	996	91	47
17º	183	576	31	78	171	31	31
19º	31	124	-	31	15	-	91
21º	61	91	-	47	31	61	15
24º	62	91	-	78	31	31	15
26º	-	122	31	61	62	31	78
28º	31	93	31	31	31	91	47
31º	62	156	47	183	280	183	62
33º	78	171	91	488	373	202	62
35º	78	175	62	187	436	264	183
38º	124	264	187	976	669	457	78
40º	187	467	233	732	745	436	93
42º	233	716	264	427	700	404	78
45º	171	140	152	342	762	233	62
47º	202	244	171	187	732	62	140
49º	47	140	171	549	342	124	93
52º	62	93	78	327	366	124	124
54º	274	457	31	311	274	47	62
56º	202	62	109	171	47	171	249
59º	488	47	152	373	47	93	156
61º	171	31	62	420	31	109	93
63º	218	62	78	233	156	109	140
66º	311	31	62	109	140	78	233
68º	109	31	31	47	15	122	93

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa

Observou-se com a Tabela 5, que o período prepatente da cepa QB1 variou do 3º ao 7º dias, sendo o primeiro pico parasitêmico observado entre o 10º e 14º dias, com parasitemia máxima de 1.446 tripomastigotas/ 5µL de sangue. Após esse período, observou-se um declínio no número de formas sanguíneas.

Entre o 35º e 45º dias, novo pico parasitêmico foi observado com a cepa QB1, com máximo de 976 tripomastigotas/ 5µL de sangue.

Após esse período, houve uma diminuição das formas sanguíneas em seis dos camondongos estudados indicando o final da fase aguda e início da fase crônica, exceto no camundongo C1, em que observou-se o início da fase crônica a partir do 68º dia.

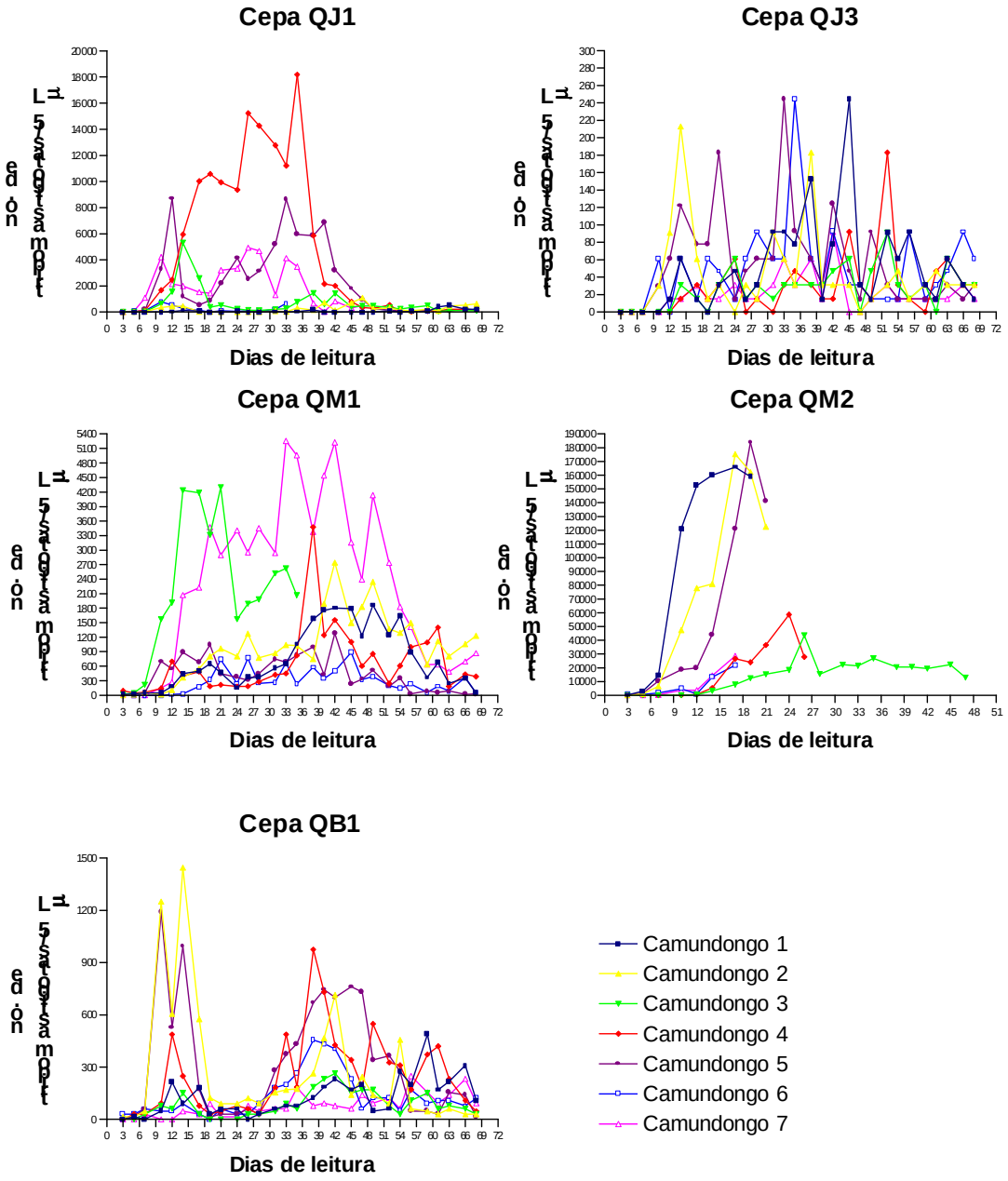


Figura 2. Representação gráfica da curva parasitêmica de camundongos infectados com as cepas de *T. cruzi* isoladas em Quarai, RS.

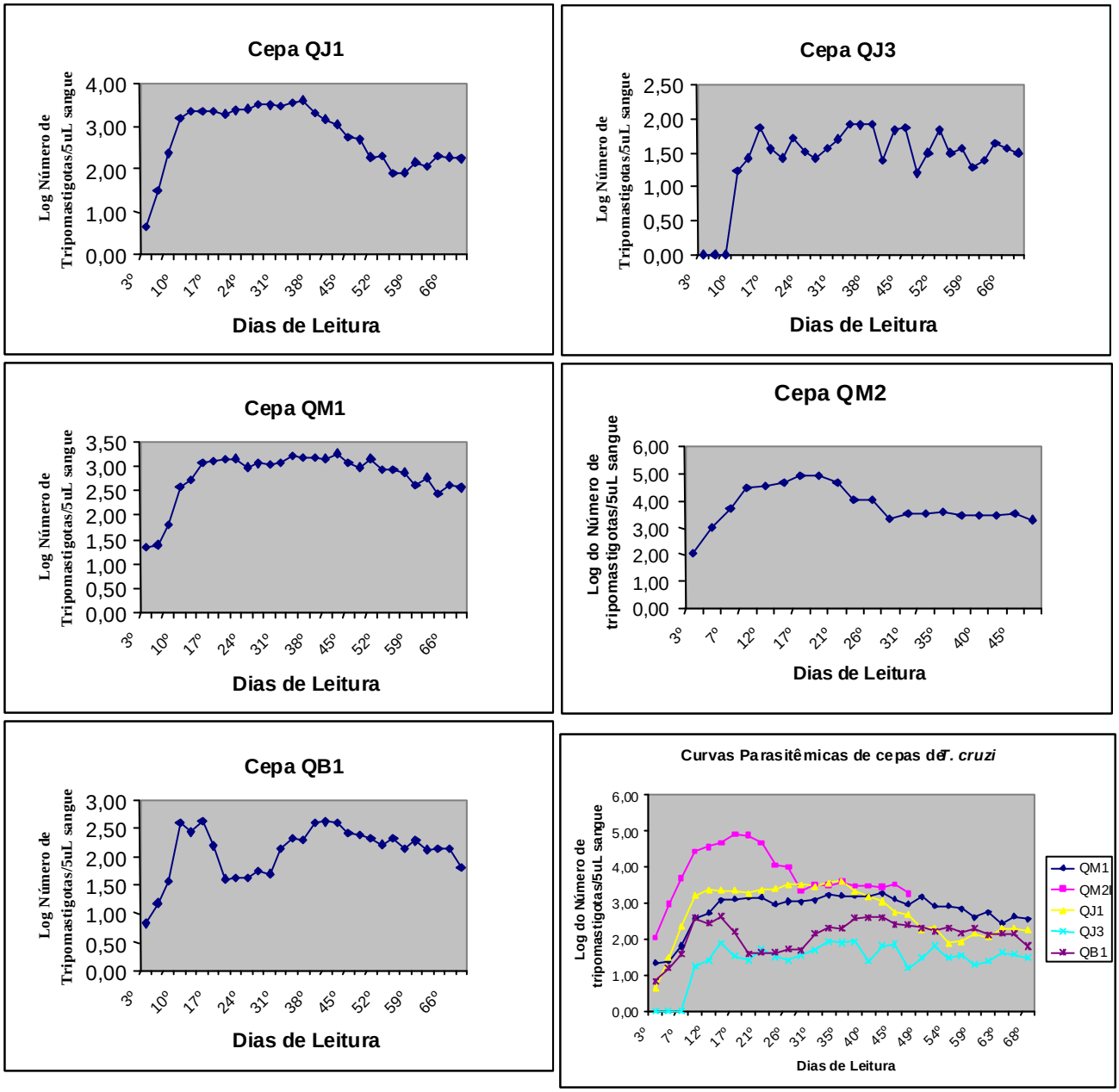


Figura 3. Gráficos das curvas parasitêmicas obtidas pelas médias logarítmicas do nº de tripomastigotas/5µL de sangue, segundo as cinco cepas de *T. cruzi* isoladas em Quaraí, RS.

4.4.1.2 Resultado da segunda curva parasitêmica

Os resultados obtidos com a realização da segunda curva parasitêmica estão expressos nas tabelas 6, 7, 8, 9 e 10, figuras 4 e 5.

Tabela 6. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QJ1 de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5
3º	-	-	-	-	-
5º	-	-	-	-	15
7º	31	61	47	47	31
10º	156	93	373	482	427
12º	420	327	793	2458	2561
14º	610	488	1311	716	840
17º	545	591	762	366	156
19º	976	591	716	78	109
21º	1220	560	1342	140	140
24º	1372	327	793	488	171
26º	2054	436	854	747	366
28º	902	793	747	389	467
31º	1403	498	685	793	1159
33º	2805	488	296	436	436
35º	1776	427	902	1276	1027
38º	1027	933	249	1464	1098
40º	1586	2256	793	529	1338
42º	1805	1649	1281	1342	2622
45º	1898	1493	1097	840	1462
47º	1711	933	342	464	1649
49º	1089	1244	404	871	1369
52º	1951	1281	366	622	1678
54º	2147	1431	311	560	1338
56º	1618	1581	373	529	1587
59º	1213	1338	124	716	2022
61º	560	716	78	311	1773
63º	996	218	124	653	2458
66º	1403	218	156	560	2084
68º	622	187	218	622	1369

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa

Observou-se com a Tabela 6, que o período prepatente da cepa QJ1 variou do 5º ao 7º dias, tendo o primeiro pico ocorrido entre o 12º e 21º dias. Após esse dia, ocorreu um declínio do número de tripomastigotas, com nova ascensão das formas parasitárias entre o 33º e 42º dias, onde foi encontrado o número máximo de 2.805 tripomastigotas/5µL de sangue. Não houve morte dos camundongos durante o período de realização da 2ª curva com a cepa QJ1.

Tabela 7. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QJ3 de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5
3º	-	-	-	-	-
5º	31	31	122	15	31
7º	15	15	91	47	78
10º	274	62	93	305	183
12º	305	122	202	47	31
14º	335	193	152	62	15
17º	78	140	254	15	15
19º	576	233	840	31	31
21º	1311	124	1634	61	15
24º	825	218	1338	61	91
26º	457	436	1354	61	61
28º	202	591	2287	91	31
31º	93	233	3485	31	47
33º	183	427	1774	274	47
35º	61	213	2500	47	31
38º	93	124	793	91	109
40º	213	274	945	274	78
42º	244	15	747	244	78
45º	47	47	427	244	47
47º	15	93	311	31	213
49º	213	244	607	47	122
52º	15	15	296	91	122
54º	31	244	915	47	327
56º	202	78	549	31	498
59º	233	47	457	91	732
61º	373	62	579	-	669
63º	62	78	579	47	404
66º	218	202	218	31	373
68º	366	396	427	31	436

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa

Observou-se com a Tabela 7 que o período prepatente da cepa QJ3 ocorreu no 5º dia, com parasitemia baixa durante todo o período estudado. O pico da parasitêmia foi observado entre o 21º e 31º dias, com máximo de 3.485 tripomastigotas/5µL de sangue. Não houve morte dos camundongos durante o período de realização da 2ª curva.

Tabela 8. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QM1 de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5
3º	-	-	-	-	-
5º	-	-	-	-	-
7º	-	-	31	-	-
10º	31	31	31	15	-
12º	244	280	264	233	183
14º	311	1677	871	684	809
17º	1556	9361	4667	2022	3454
19º	1680	7094	4574	1244	4330
21º	1493	9397	9514	2683	2614
24º	1281	6223	4232	467	3329
26º	778	6342	1396	1957	3205
28º	1151	8432	3018	965	5123
31º	840	4387	3598	716	2769
33º	513	3598	1587	747	5977
35º	467	4107	2147	653	4513
38º	854	2209	3173	1037	2131
40º	809	2614	4574	996	1089
42º	902	2458	2863	1089	1556
45º	965	2240	2614	1556	1431
47º	1058	1089	1649	1431	933
49º	1276	560	1649	778	1276
52º	671	488	3598	366	2134
54º	529	653	*	62	1462
56º	622	732	*	218	2520
59º	187	249	*	342	778
61º	467	218	*	366	1464
63º	249	124	*	124	809
66º	404	124	*	124	1742
68º	183	156	*	187	1528

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa
(*) morte do camundongo

Observou-se com a Tabela 8, que o período prepatente da cepa QM1 variou do 7º ao 10º dias, tendo o primeiro pico parasitêmico ocorrido entre o 19º e 21º dias com um máximo de 9.514 tripomastigotas/5µL de sangue. Após esse período, houve uma diminuição do número de tripomastigotas, sendo observado nova ascensão apenas em um camundongo

(C5) no 35 dia da pós-infecção. Durante a realização da 2ª curva com a cepa QM1, houve a morte de um camundongo (C3) aos 54º dias da realização da curva.

Tabela 9. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QM2 de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5
3º	-	-	-	-	-
5º	31	-	-	-	15
7º	31	31	78	-	31
10º	187	218	809	61	1494
12º	793	1342	3812	31	16149
14º	4025	4147	9086	1260	20945
17º	4061	7776	56290	358	34911
19º	9941	11076	80463	653	160429
21º	34396	17673	144622	778	156571
24º	47668	42814	*	*	*
26º	65217	62571	*	*	*
28º	*	96845	*	*	*
31º	*	64888	*	*	*
33º	*	108188	*	*	*
35º	*	97333	*	*	*
38º	*	61234	*	*	*
40º	*	32235	*	*	*
42º	*	47730	*	*	*
45º	*	7608	*	*	*
47º	*	5641	*	*	*
49º	*	5787	*	*	*
52º	*	5550	*	*	*
54º	*	5275	*	*	*
56º	*	5134	*	*	*
59º	*	2614	*	*	*
61º	*	1649	*	*	*
63º	*	549	*	*	*
66º	*	716	*	*	*
68º	*	3415	*	*	*

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativo
(*)morte do camundongo

Observou-se com a Tabela 9 que o período prepatente da cepa QM2 variou do 5º ao 10º dias, tendo o pico parasitêmico ocorrido entre o 19º e 33º dias, com um máximo de 160.429 tripomastigotas/5µL. Durante esse período quatro camundongos C1, C3, C4 e C5 morreram. Apenas um camundongo (C2) sobreviveu ao pico parasitêmico, observado aos 33º dias, com 108.188 tripomastigotas/5µL, evoluindo com diminuição do número de tripomastigotas para a fase crônica.

Tabela 10. Curva parasitêmica a partir do sangue de camundongos infectados pela cepa QB1 de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

Dia	C1	C2	C3	C4	C5
3º	-	-	-	-	-
5º	31	31	31	-	61
7º	31	93	15	-	-
10º	47	213	15	-	47
12º	62	121	213	31	93
14º	31	47	61	15	47
17º	93	47	15	61	62
19º	62	78	31	47	213
21º	62	31	47	61	62
24º	109	124	183	15	152
26º	156	183	183	-	183
28º	140	152	62	122	213
31º	78	183	140	91	124
33º	274	47	152	15	122
35º	78	244	366	305	373
38º	109	404	78	61	187
40º	15	451	78	78	549
42º	62	93	62	156	233
45º	183	109	109	124	156
47º	31	47	244	156	183
49º	366	274	183	335	183
52º	140	15	78	140	218
54º	140	61	213	233	187
56º	396	244	122	62	109
59º	366	152	152	109	218
61º	488	93	183	213	396
63º	427	244	62	124	384
66º	156	244	15	47	140
68º	233	327	15	62	93

Contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue
(-) contagem de tripomastigotas negativa

Observou-se com a Tabela 10, que o período prepatente da cepa QB1 variou do 5º ao 10º dias, sendo que o pico parasitêmico ocorreu entre o 33º e 40º dias com 549 tripomastigotas/5µL de sangue. A cepa QB1 caracterizou-se por apresentar baixa parasitêmia durante todo o período de realização da 2ª curva, não havendo morte dos camundongos nesse período.

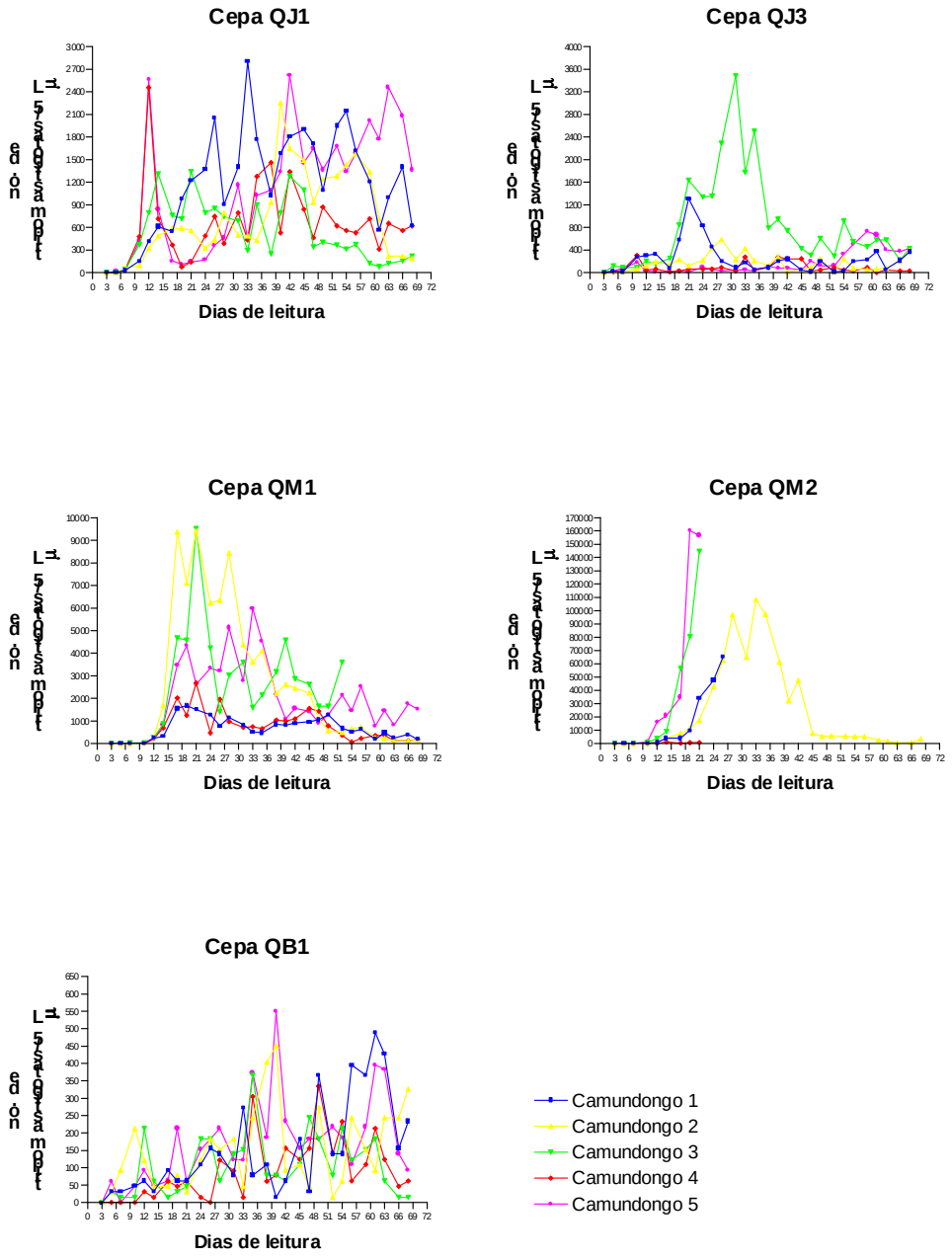


Figura 4. Representação gráfica da curva parasitêmica de camundongos infectados com as cepas de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

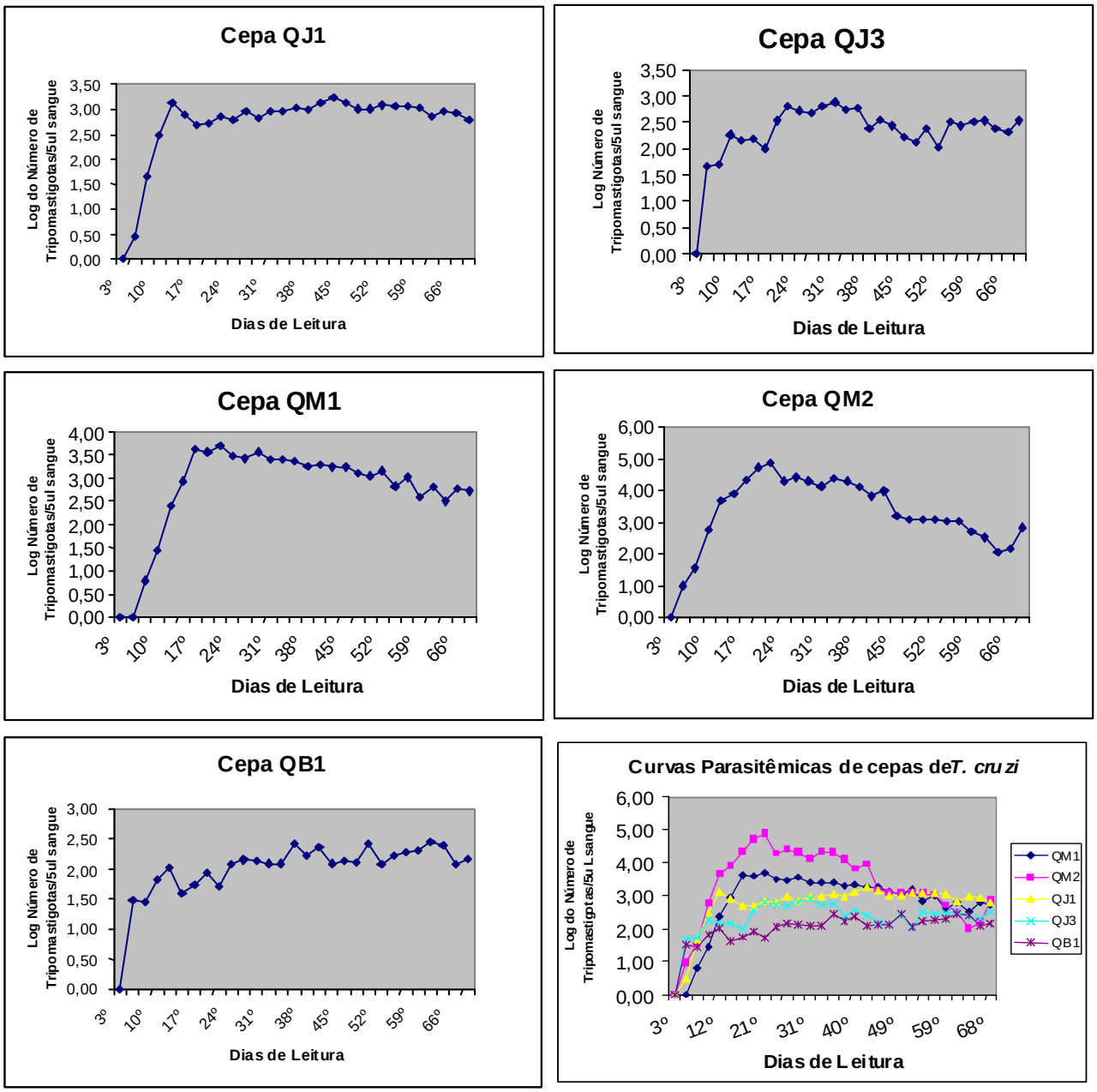


Figura 5. Gráficos das curvas parasitêmicas obtidas pelas médias logarítmicas do nº de tripomastigotas/5µL de sangue, segundo as cinco cepas de *T. cruzi*, um ano após o isolamento.

4.4.2 Tropismo tissular

Os resultados do estudo histopatológico realizado nos cortes seriados de coração, fígado, músculo esquelético das cepas de *T. cruzi* isoladas durante a fase aguda da infecção (7º, 10º, 14º, 21º e 30º dias) estão expressos nas Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15, e Figura 6. Os cortes de cólon, esôfago e baço de todas as cepas não mostraram alterações histopatológicas nessa fase.

A análise histopatológica realizada nos mesmos órgãos citados acima durante a fase crônica da infecção (150º e 180º dias) estão expressos nas Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20, e Figura 7. Os cortes de esôfago e baço de todas as cepas não mostraram alterações histopatológicas nessa fase da doença.

Tabela 11. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QJ1 de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

Dia		Músculo esquelético		Coração		Fígado		
		PI	NA	PI	NA	PI		NA
						P	L	
	A	-	-	-	-	-	-	-
7	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	-	-
10	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	+	-	-
	A	-	-	-	-	-	+	-
14	B	-	-	-	-	+	+	-
	C	-	-	+	-	-	+	-
	A	-	-	-	-	-	+	-
21	B	-	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
	A	++	-	+	-	-	+	-
30	B	++	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	+	-	-	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Observou-se com a Tabela 11, que durante a fase aguda, a cepa QJ1 causou infiltrado inflamatório mononuclear moderado em músculo esqulético, com predomínio de linfócitos, apenas no 30º dia após a infecção, não sendo observadas formas amastigotas.

Em músculo cardíaco, foi observado discreto processo inflamatório linfocitário a partir do 14º dia pós-infecção, também não sendo observadas formas amastigotas.

A Tabela 11 mostra também que os camundongos quando parasitados pela cepa QJ1 apresentam o fígado com inflamação crônica mononuclear portal e lobular a partir do 10º dia pós-infecção, sem formas amastigotas.

Tabela 12. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QJ3 de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

Dia		Músculo esquelético		Coração		Fígado		
		PI	NA	PI	NA	PI		NA
						P	L	
7	A	-	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
10	A	-	-	+	-	+	+	-
	B	-	-	-	-	+	+	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
14	A	-	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-
21	A	++	-	-	-	++	++	-
	B	-	-	+	-	-	-	-
	C	+++	-	+	-	+	+	-
30	A	++	-	++	+	-	+	-
	B	-	-	-	-	+	-	-
	C	-	-	-	-	-	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Observou-se com a Tabela 12, que a cepa QJ3 mostrou moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos em músculo esquelético no 21º e 30º dias pós- infecção, não sendo observadas formas amastigotas.

No músculo cardíaco, discreto processo inflamatório foi observado no 10º e 21º dias pós- infecção, sem formas amastigotas. No 30º dia, foi observado moderado processo inflamatório em um camundongo com formas amastigotas em pequeno número.

O fígado mostrou processo inflamatório portal ou lobular, durante toda a fase aguda, sem formas amastigotas.

Tabela 13. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QM1 de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

Dia		Músculo esquelético		Coração		Fígado		
		PI	NA	PI	NA	PI		NA
						P	L	
7	A	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-
10	A	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	+	-	-
14	A	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
21	A	++	-	-	-	-	+	-
	B	+	-	+	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	+	-	-
30	A	+	-	+++	+	+	-	-
	B	+	-	+	+	+	+	-
	C	++	+	+++	-	++	++	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Observou-se com a Tabela 13, que a cepa QM1 apresentou discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos em músculo esquelético no 21º e 30º dias pós- infecção, com pequeno número de formas amastigotas no 30º dia.

Os camundongos estudados nesta fase, com a cepa QM1, mostraram músculo cardíaco com processo inflamatório discreto a intenso no 21º e 30º dias, com pequeno número de formas amastigotas no 30º dia.

No fígado, foi observado processo inflamatório portal ou lobular, sem formas amastigotas.

Tabela 14. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QM2 de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

Dia		Músculo esquelético		Coração		Fígado		
		PI	NA	PI	NA	PI		NA
						P	L	
7	A	-	-	-	-	+	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	+	-	-	-	-
10	A	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	+	-	-	-	-
	C	+	-	+	-	-	+	-
14	A	++	+++	+	-	-	+	-
	B	++	+++	+	-	-	+	-
	C	+	+	+	-	+	+	+
21	A	++	+	+	-	+	+	-
	B	++	-	+	+	+	+	-
	C	+	-	+	+	+	+	-
30	A	++	+	+	+	+	+	-
	B	++	+	+	+	+	+	-
	C	++	+	++	+	+	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Observou-se com a Tabela 14, que a cepa QM2 apresntou discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos em músculo esquelético em todo o curso da fase aguda, com o encontro freqüente de formas amastigotas em “ninhos” do 14º ao 30º dias.

No músculo cardíaco, também foi observado com esta cepa, processo inflamatório mononuclear discreto a moderado durante toda a fase aguda, com pequeno número de formas amastigotas no 21º e 30º dias pós- infecção.

O fígado mostrou processo inflamatório portal ou lobular em toda a fase aguda, com raras formas amastigotas no 14º dia em células de Kupffer.

Tabela 15. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do precesso inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QB1 de *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção.

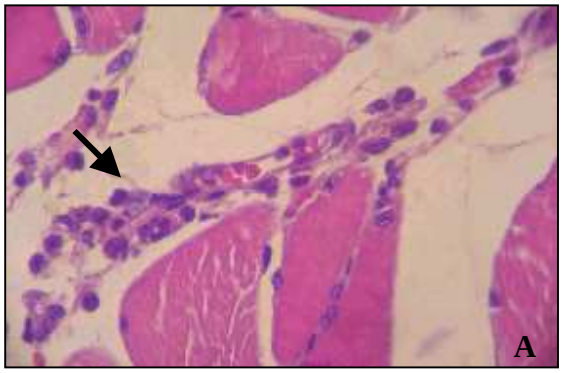
Dia		Músculo esquelético		Coração		Fígado		
		PI	NA	PI	NA	PI		NA
						P	L	
7	A	-	-	-	-	+	+	-
	B	+	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
10	A	-	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-
14	A	-	-	-	-	-	+	-
	B	++	-	+	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	+	-	-
21	A	+	-	-	-	-	+	-
	B	+	-	-	-	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	+	-
30	A	+	-	-	-	-	+	-
	B	+	-	-	-	-	-	-
	C	+	-	-	-	+	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

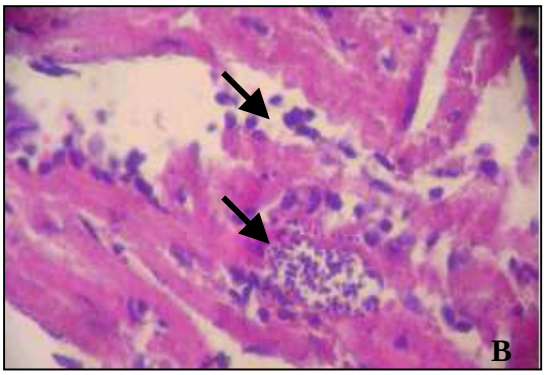
Observou-se com a Tabela 15, que a cepa QB1 mostrou em músculo esquelético discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos no 7º dia, e 14º a 30º dias pós- infecção, não sendo observadas formas amastigotas.

No músculo cardíaco, discreto processo inflamatório mononuclear foi observado em um camundongo no 14º dia pós-infecção.

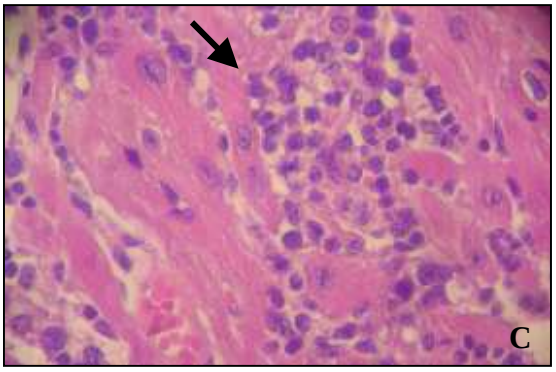
Os camundongos infectados por esta cepa, mostraram o fígado com processo inflamatório portal ou lobular do 7º ao 30º dias, porém, não foram observadas formas amastigotas.



A. Processo inflamatório mononuclear em músculo esquelético, cepa QM1, aumento de 400X

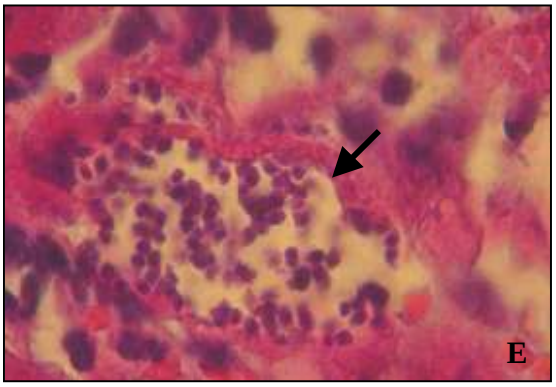


B. Miocardite chagásica com ninhos de amastigota e fragmentação de algumas fibras musculares, cepa QM2 , aumento de 400X

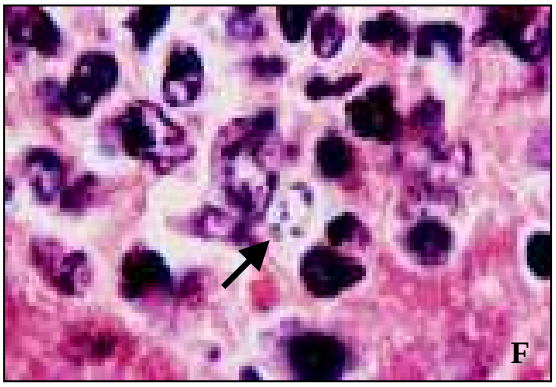


C. Inflamação mononuclear com necrose miocárdica focal, cepa QM2 , aumento de 400X

D. Ninhos de amastigotas em fibra muscular esquelética, cepa QM2 , aumento de 400X



E. Célula muscular cardíaca em processo de rompimento pelo *T. cruzi*, cepa QM2 , aumento de 400X



F. Corte de fígado com amastigotas em célula de Kupffer, cepa QM2 , aumento de 400X

Figura 6. Cortes histológicos obtidos de camundongos "Swiss" infectados pelas cepas QM1 e QM2 de *T. cruzi* na fase aguda por meio de microscopia óptica.

Tabela 16. Estudo histopatológico semi- quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QJ1 de *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção.

Dias		mm esquel.		Coração		Fígado			Cólon	
		PI	NA	PI	NA	PI		NA	PI	NA
						P	L			
	A	+++	-	-	-	-	+	-	-	-
150	B	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-
180	B	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	C	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

A Tabela 16 mostra nos cortes de músculo esquelético dos camundongos infectados pela cepa QJ1, a presença de discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear perivascular no 150º e 180º dias após a infecção. Em músculo cardíaco, foi encontrado discreta miocardite focal em dois camundongos no 150º dia pós-infecção.

Os cortes de fígado dos camundongos infectados por esta cepa apresentaram discreto processo inflamatório mononuclear lobular no 150º dia e no 180º dia pós-infecção.

Durante a fase crônica, não foram observadas formas amastigotas nos órgãos estudados de todos os camundongos infectados pela cepa QJ1.

Tabela 17. Estudo histopatológico semi- quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QJ3 de *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção.

Dias		Mm esquel.		Coração		Fígado			Cólon	
		PI	NA	PI	NA	PI		NA	PI	NA
						P	L			
	A	-	-	+	-	-	+	-	+	-
150	B	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	C	+	-	+	-	-	+	-	-	-
	A	++	-	+	-	-	+	-	+	-
180	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	++	-	+	+	-	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

A análise da Tabela 17 mostra que a cepa QJ3 apresentou em músculo esquelético discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear no 150º e no 180º dia pós-infecção. No músculo cardíaco, o processo inflamatório foi classificado como discreto no 150º dia pós-infecção, e no camundongo C essa inflamação era focal. No 180º dia pós-infecção, o infiltrado inflamatório variou de discreto a moderado, e em camundongo C, no 180º dia foi observado edema e necrose miocárdica, além de moderada inflamação.

No fígado, a cepa QJ3 apresentou discreto processo inflamatório mononuclear lobular e portal. Os cortes de cólon mostraram discreto processo inflamatório mural.

As formas amastigotas não foram encontradas nessa fase da infecção.

Tabela 18. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QM1 de *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção.

Dias		Mm esquel.		Coração		Fígado			Cólon	
		PI	NA	PI	NA	PI		NA	PI	NA
						P	L			
150	A	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	B	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	C	+	-	+	-	+	+	-	-	-
180	A	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	B	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-	+	-	-	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Foi observado com a Tabela 18, que a cepa QM1 apresentou em músculo esquelético discreto infiltrado inflamatório mononuclear perivascular no 150º dia pós-infecção; no músculo cardíaco foi encontrado discreta miocardite com fibrose focal, tanto no 150º como no 180º dia pós-infecção.

No fígado foi observado com esta cepa, discreto processo inflamatório mononuclear lobular e portal no 150º e 180º dia pós-infecção.

Apenas no camundongo A, no 150º dia de infecção, os cortes de cólon mostraram processo inflamatório mural.

Durante essa fase da infecção com a cepa QM1 não foram encontradas formas amastigotas.

Tabela 19. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QM2 de *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção.

Dias		Mm esquel.		Coração		Fígado			Cólon	
		PI	NA	PI	NA	PI		NA	PI	NA
						P	L			
150	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	B	+	-	+	-	-	+	-	+	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	+	-

* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

Foi observado com a Tabela 19, que a cepa QM2 apresentou discreto infiltrado inflamatório mononuclear com fibrose focal em músculo esquelético e cardíaco apenas em um camundongo. Nesse mesmo camundongo, em cortes de fígado foi encontrado discreto processo inflamatório lobular.

Os cortes de cólon de todos os camundongos infectados nesta fase pela cepa QM2 apresentaram discreto processo inflamatório mural.

Durante a fase crônica da infecção não foram observadas formas amastigotas nos órgãos estudados. Os três camundongos infectados para o estudo no 180º dia morreram antes do período determinado, provavelmente, como característica da cepa QM2.

Tabela 20. Estudo histopatológico semi-quantitativo* do processo inflamatório (PI) e ninhos de amastigotas (NA) realizado em triplicata (camundongos A, B e C) com a cepa QB1 de *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção.

Dias		Mm esquel.		Coração		Fígado			Cólon	
		PI	NA	PI	NA	PI		NA	PI	NA
						P	L			
	A	+	-	-	-	-	+	-	+	-
150	B	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	C	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	A	+	-	-	-	-	+	-	+	-
180	B	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-

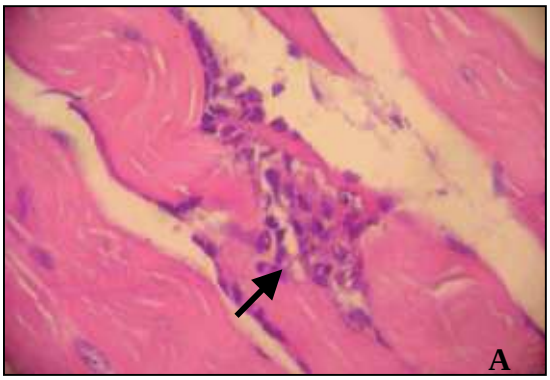
* (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada e (+++) intensa
P- inflamação portal
L- inflamação lobular

A análise da Tabela 20 mostrou que a cepa QB1 apresentou discreto infiltrado inflamatório mononuclear em músculo esquelético, sendo que nos dois camundongos no 180º dia esse processo era perivascular . Em músculo cardíaco não foi observado processo inflamatório durante a fase crônica da infecção em todos os camundongos estudados.

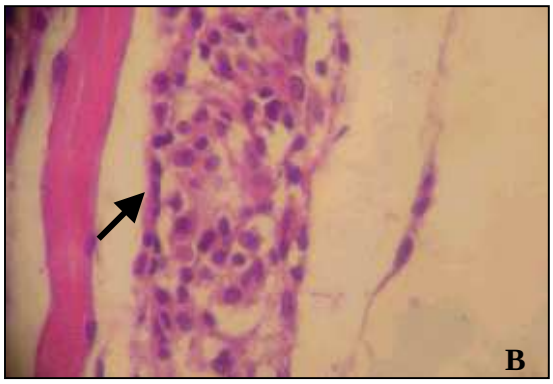
No fígado, foi observado discreto processo inflamatório lobular e portal no 150º dia e 180º dia pós-infecção.

Os cortes de cólon dos camundongos infectados pela cepa QB1 mostraram discreto processo inflamatório mural e nos plexos (plexite) no 150º como no 180º dia pós-infecção.

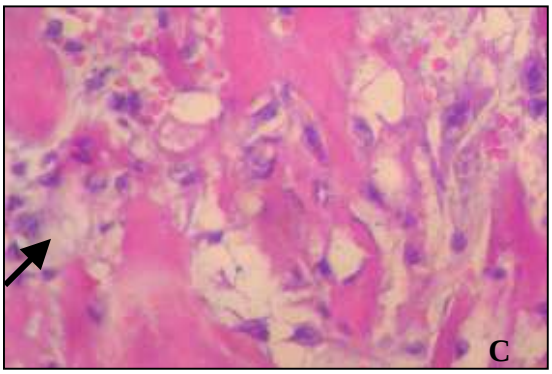
Durante a fase crônica não foi observada a presença de formas amastigotas nos órgãos estudados.



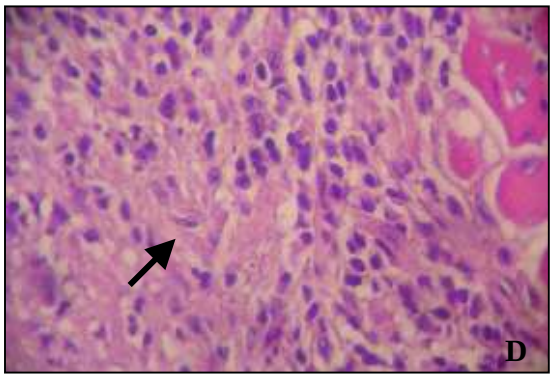
A. Miosite crônica com fragmentação celular, cepa QJ3, aumento de 400 X



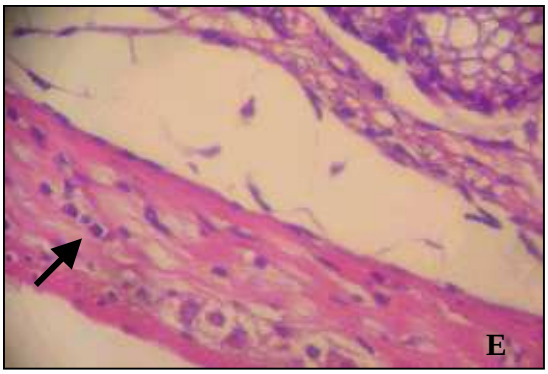
B. Músculo estriado com inflamação mononuclear, cepa QM2, aumento de 400 X



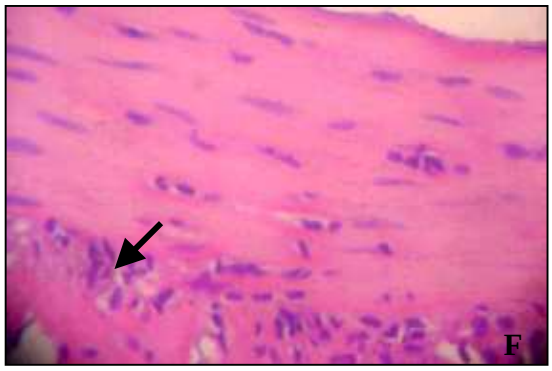
C. Edema intersticial e inflamação crônica de músculo esquelético, cepa QJ3, aumento de 400 X



D. Foco de intenso processo inflamatório crônico em músculo esquelético, cepa QJ1, aumento de 400 X



E. Plexo mioentérico com inflamação crônica, cepa QM2, aumento de 400 X



F. Parede muscular do intestino grosso com processo inflamatório atingindo os plexos mioentéricos, cepa QB1, aumento de 400 X

Figura 7. Cortes histológicos obtidos de camundongos "Swiss" infectados pelas cepas QB1, QJ1, QJ3, QM2 de *T. cruzi* na fase crônica por meio de microscopia óptica.

4.4.3 Estudo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos

Observou-se polimorfismo entre as formas tripomastigotas das cinco cepas isoladas, com formas largas exibindo núcleo arredondado em posição anterior, presença de citoplasma vacuolizado, cinetoplasto terminal, membrana ondulante e flagelo relativamente curto. Essas formas caracterizavam-se por apresentar o aspecto da letra "C".

As formas intermediárias e raras delgadas, apresentaram núcleo em posição mais central, com índice nuclear menor, citoplasma pouco vacuolizado, cinetoplasto terminal, membrana ondulante menos evidente, flagelo relativamente curto, caracterizando-se por demonstrar o aspecto da letra "C" ou "S".

Os resultados mínimo, médio e máximo obtidos por análise morfométrica de 30 formas tripomastigotas mensuradas aleatóriamente de cada uma das cepas de *T. cruzi* isoladas estão expressos nas Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25. As médias aritméticas dessas 30 formas tripomastigotas de cada cepa de *T. cruzi*, comparadas com os resultados médios da cepa Y, estão expressos na tabela 26.

Tabela 21. Avaliações morfométricas de 30 formas tripomastigotas sangüíneas mensuradas aleatóriamente do sangue de camundongos "Swiss" infectados com a cepa QJ1 de *T. cruzi*.

Parâmetros morfométricos	Valores		
	Mínimo	Máximo	Médio
Comprimento do flagelo (μm)	5,19	10,05	7,37
Comprimento do corpo (μm)	10,90	15,60	13,55
Comprimento total (μm)	16,36	24,39	20,91
Largura do corpo (μm)	1,27	2,76	1,83
Área do cinetoplasto $(\mu m)^2$	0,66	1,51	0,92
Distância P/N (μm)	6,75	10,25	8,59
Distância A/N (μm)	3,84	6,13	4,96
Índice nuclear	1,43	2,55	1,75

Tabela 22. Avaliações morfométricas de 30 formas tripomastigotas sangüíneas mensuradas aleatóriamente do sangue de camundongos "Swiss" infectados com a cepa QJ3 de *T. cruzi*.

Parâmetros morfométricos	Valores		
	Mínimo	Máximo	Médio
Comprimento do flagelo (μm)	6,36	9,42	7,79
Comprimento do corpo (μm)	11,55	16,47	13,94
Comprimento total (μm)	19,08	24,43	21,73
Largura do corpo (μm)	1,44	2,65	1,84
Área do cinetoplasto $(\mu m)^2$	0,83	1,30	0,99
Distância P/N (μm)	6,59	11,82	9,04
Distância A/N (μm)	3,29	6,09	4,90
Índice nuclear	1,33	2,87	1,88

Tabela 23. Avaliações morfométricas de 30 formas tripomastigotas sangüíneas mensuradas aleatóriamente do sangue de camundongos "Swiss" infectados com a cepa QM1 de *T. cruzi*.

Parâmetros morfométricos	Valores		
	Mínimo	Máximo	Médio
Comprimento do flagelo (μm)	5,04	9,32	7,39
Comprimento do corpo (μm)	10,59	17,38	13,97
Comprimento total (μm)	15,81	26,62	21,36
Largura do corpo (μm)	1,17	2,13	1,68
Área do cinetoplasto $(\mu m)^2$	0,63	1,22	0,92
Distância P/N (μm)	6,50	12,07	8,97
Distância A/N (μm)	3,13	6,87	5,00
Índice nuclear	1,23	2,95	1,84

Tabela 24. Avaliações morfométricas de 30 formas tripomastigotas sangüíneas mensuradas aleatóriamente do sangue de camundongos "Swiss" infectados com a cepa QM2 de *T. cruzi*.

Parâmetros morfométricos	Valores		
	Mínimo	Máximo	Médio
Comprimento do flagelo (μm)	5,25	8,90	7,00
Comprimento do corpo (μm)	9,25	14,73	11,89
Comprimento total (μm)	15,36	21,75	18,89
Largura do corpo (μm)	1,18	2,14	1,68
Área do cinetoplasto $(\mu m)^2$	0,41	2,35	1,15
Distância P/N (μm)	6,10	9,30	7,55
Distância A/N (μm)	2,95	5,89	4,34
Índice nuclear	1,24	2,49	1,81

Tabela 25. Avaliações morfométricas de 30 formas tripomastigotas sangüíneas mensuradas aleatóriamente do sangue de camundongos "Swiss" infectados com a cepa QB1 de *T. cruzi*.

Parâmetros morfométricos	Valores		
	Mínimo	Máximo	Médio
Comprimento do flagelo (μm)	5,21	10,05	7,48
Comprimento do corpo (μm)	9,54	14,71	12,63
Comprimento total (μm)	16,29	22,99	20,10
Largura do corpo (μm)	1,42	2,05	1,75
Área do cinetoplasto $(\mu m)^2$	0,46	1,17	0,85
Distância P/N (μm)	6,33	9,46	7,94
Distância A/N (μm)	2,98	6,23	4,69
Índice nuclear	1,20	2,40	1,75

Tabela 26. Valores médios referentes às avaliações morfométricas das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas. Comparação com os valores médios(*) da avaliação da cepa Y do parasito.

Parâmetros morfométricos	QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	Y
Comprimento do flagelo (μm)	7,37	7,79	7,39	7,00	7,48	5,64
Comprimento do corpo (μm)	13,55	13,94	13,97	11,89	12,63	14,85
Comprimento total (μm)	20,91	21,73	21,36	18,89	20,10	20,49
Largura do corpo (μm)	1,83	1,84	1,68	1,68	1,75	1,95
Área do cinetoplasto (μm^2)	0,92	0,99	0,92	1,15	0,85	1,01
Distância P/N (μm)	8,59	9,04	8,97	7,55	7,94	7,36
Distância A/N (μm)	4,96	4,90	5,00	4,34	4,69	7,48
Índice nuclear	1,75	1,88	1,84	1,81	1,75	1,01

(*) Valores médios da cepa Y, segundo Martinez (2004).

As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 exibem as fotomicrografias das cepas QJ3, QJ1, QM1, QM2 e QB1.

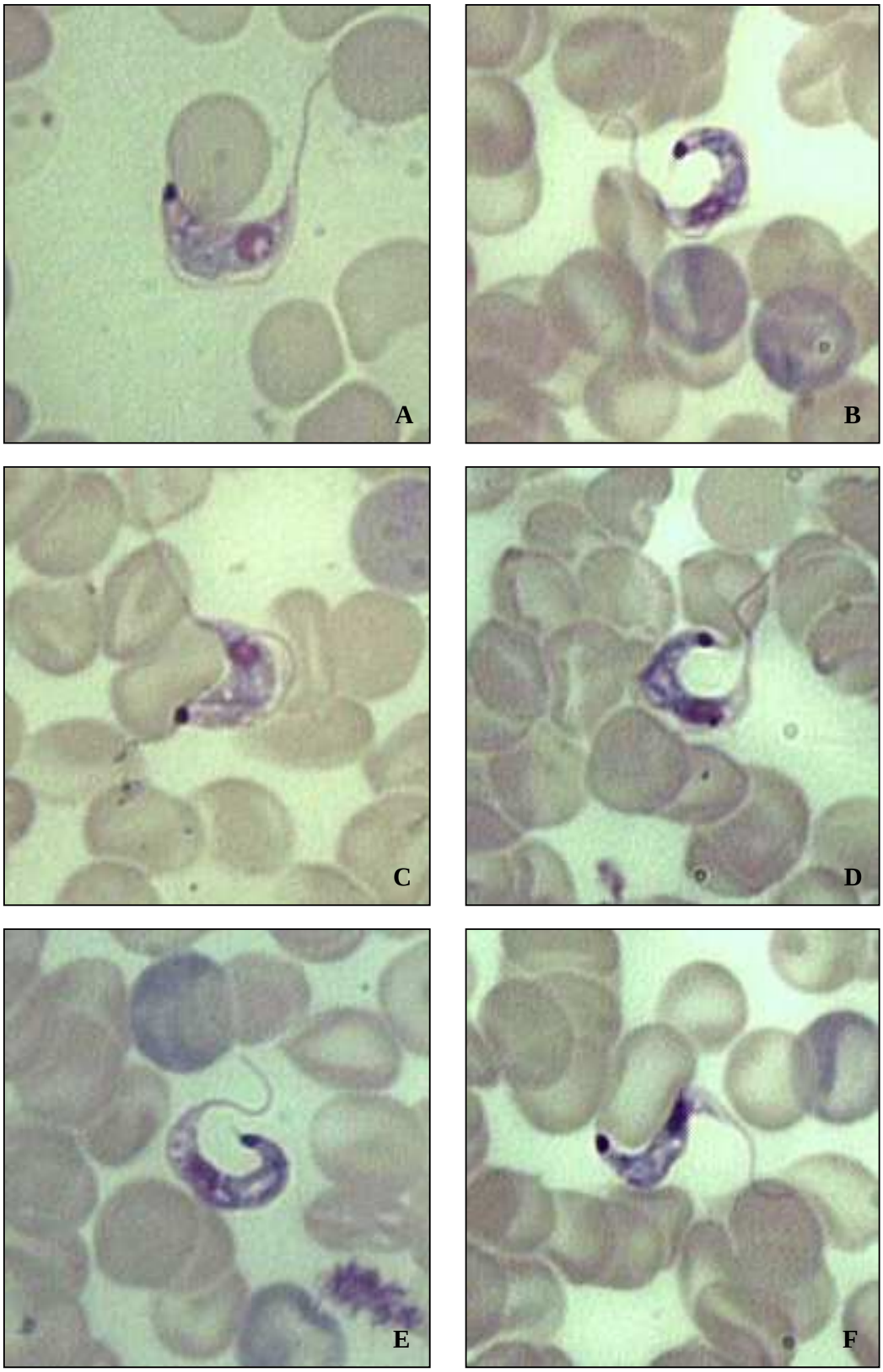


Figura 8. Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa QJ1 de *T. cruzi*, obtidas aleatoriamente em esfregaço sanguíneo no 15º dia pós-infecção, onde **A** e **C** são formas largas e **B, D, E** e **F** são formas intermediárias, aumento de 1000X.

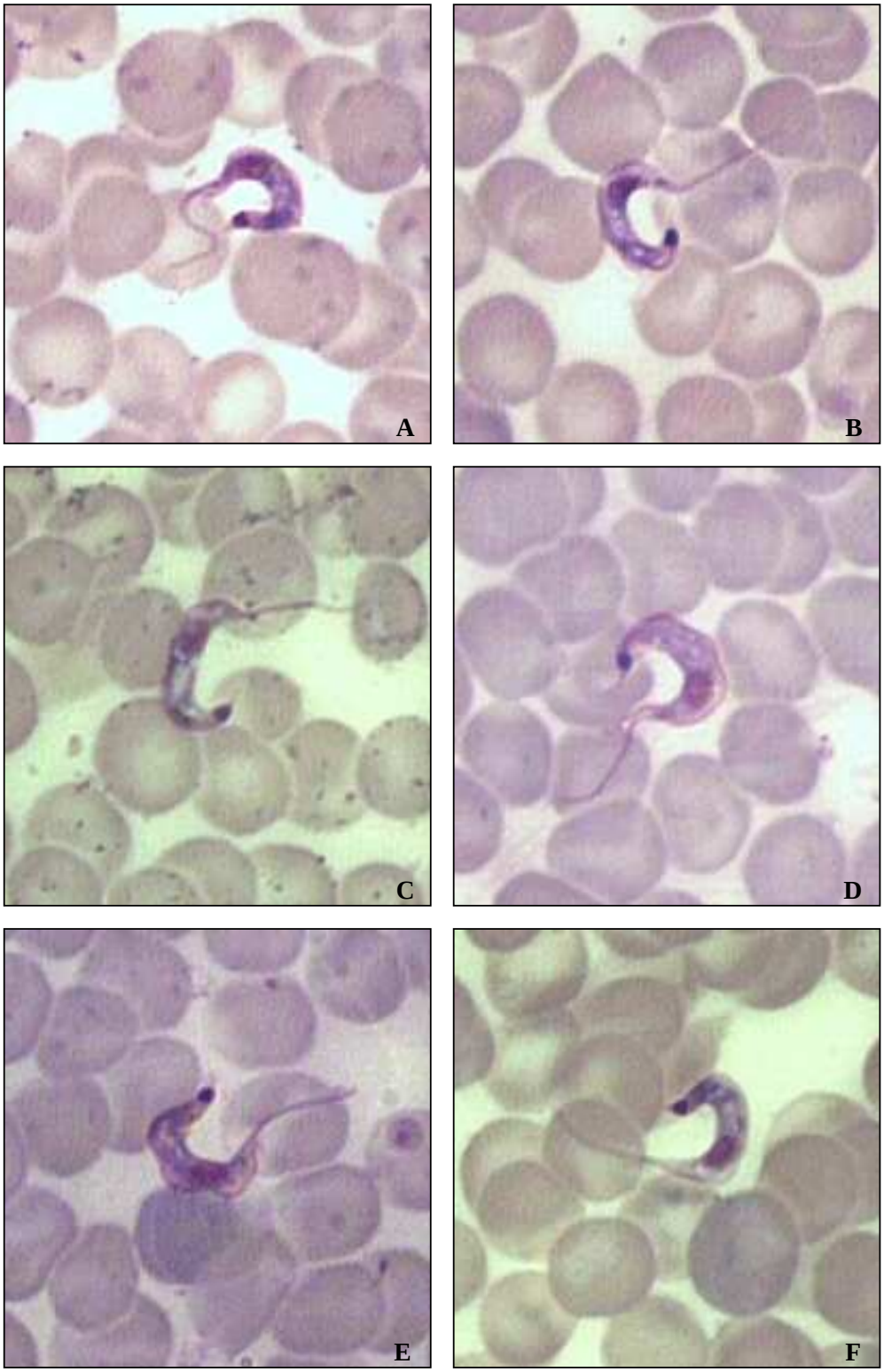


Figura 9. Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa QJ3 de *T. cruzi*, obtidas aleatoriamente em esfregaço sanguíneo no 15º dia pós-infecção, onde **A, B, C, D, E** e **F** são formas intermediárias, aumento de 1000X.

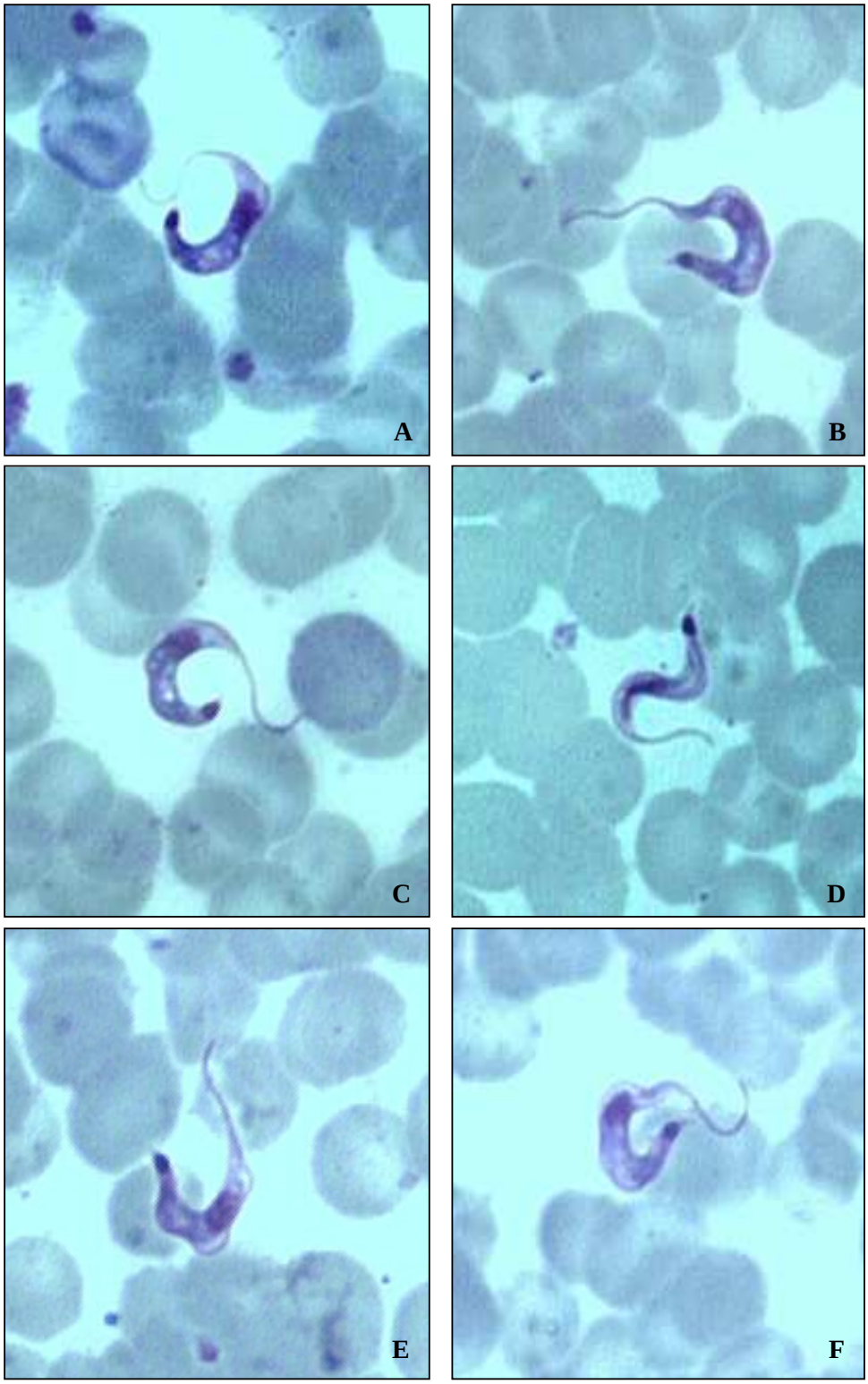


Figura 10. Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa QM1 de *T. cruzi*, obtidas aleatoriamente em esfregaço sanguíneo no 15º dia pós-infecção, onde **A, B, C, E** e **F** são formas intermediárias e **D** é forma delgada, aumento de 1000X.

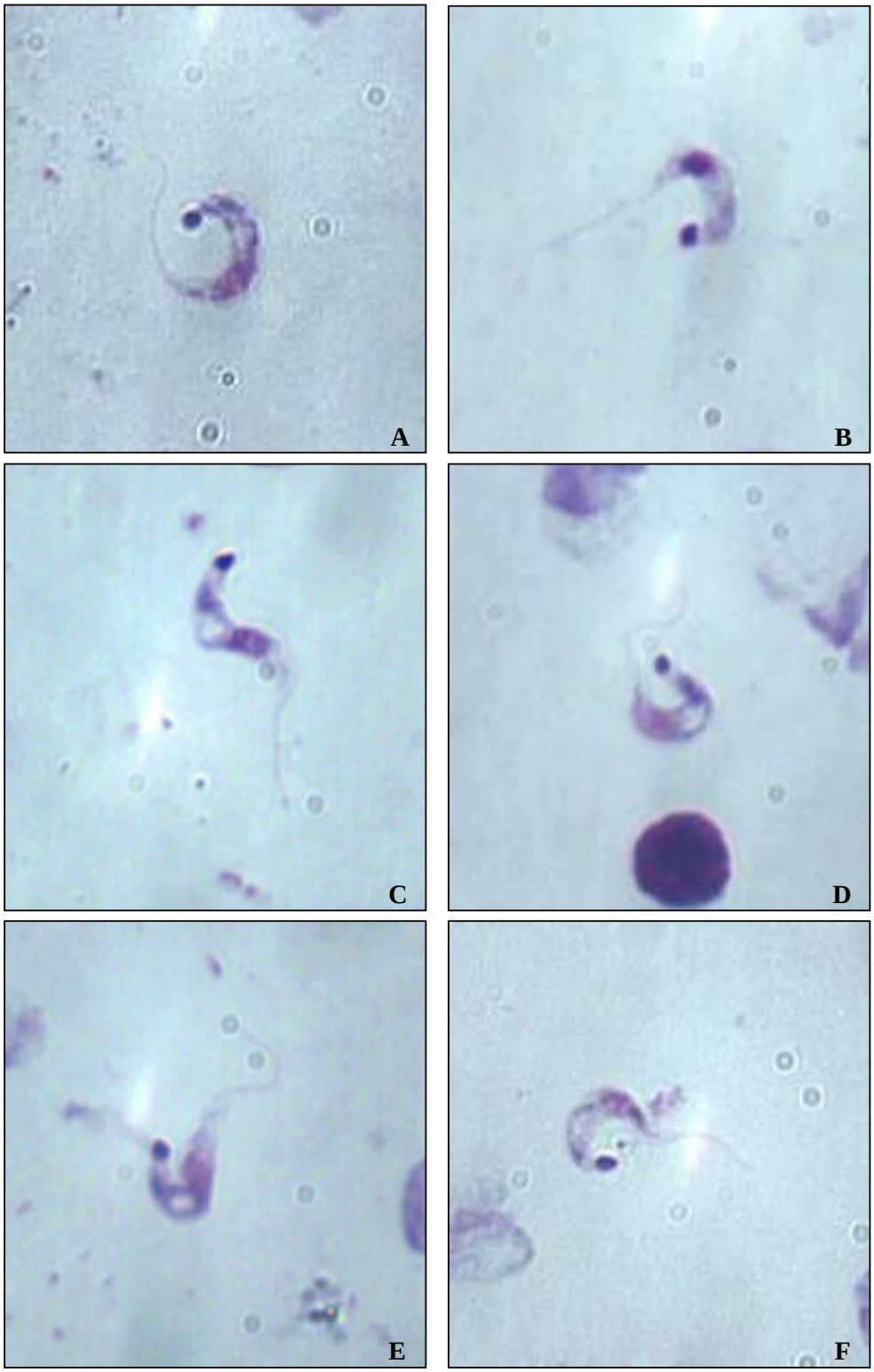


Figura 11. Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa QM2 de *T. cruzi*, obtidas aleatoriamente em gota espessa no 15º dia pós-infecção, onde **A, B, C** e **F** são formas intermediárias e **D** e **E** são formas largas, aumento de 1000X.

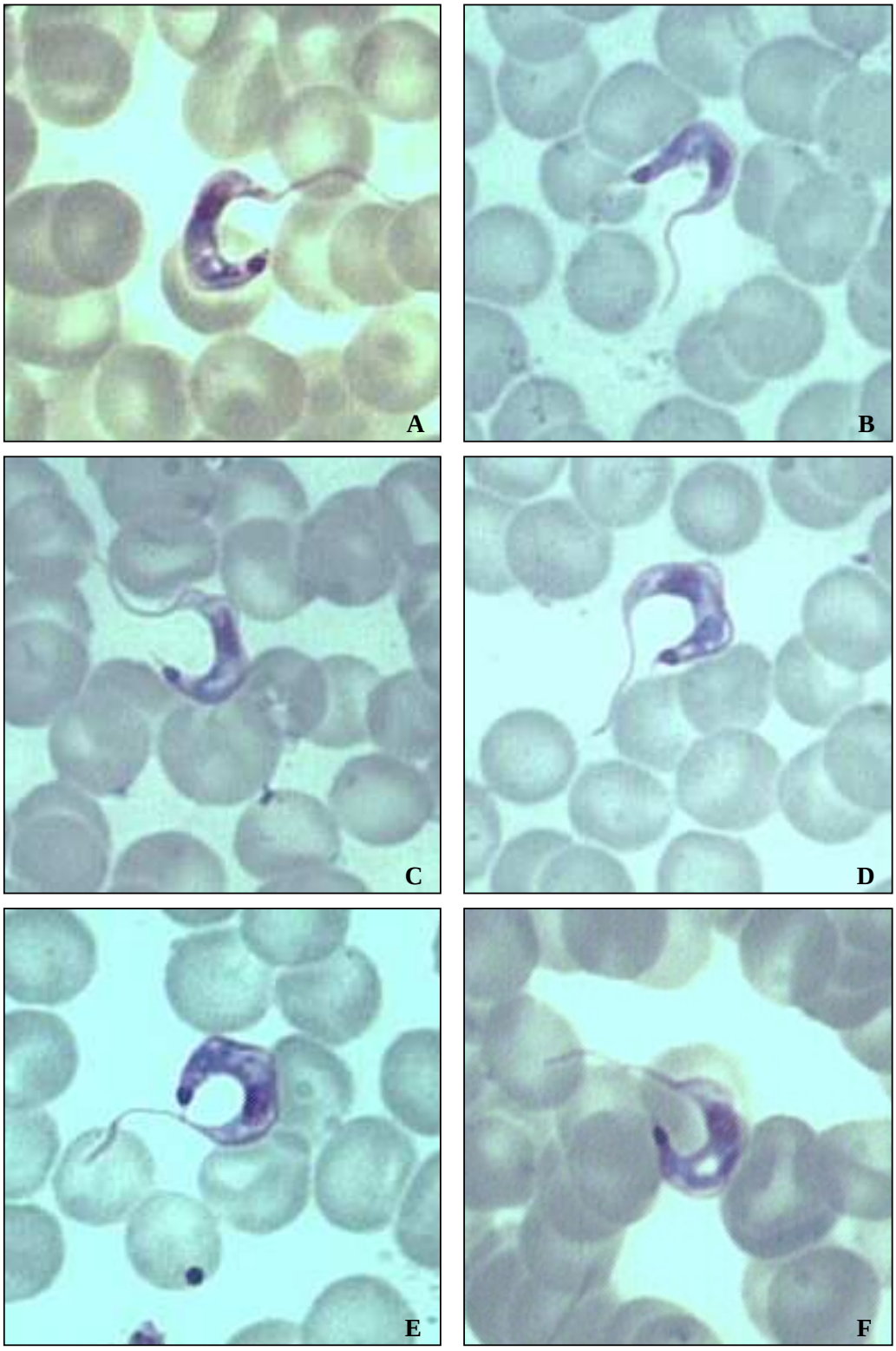


Figura 12. Formas tripomastigotas sanguíneas da cepa QB1 de *T. cruzi*, obtidas aleato-riamente em esfregaço sanguíneo no 15º dia pós-infecção, onde **A, C, D** e **E** são formas intermediárias, **B** é forma delgada e **F** é forma larga, aumento de 1000X.

Os resultados estatísticos obtidos neste estudo e os resultados dos testes de comparações entre as cepas, estão resumidos nas Tabelas de 27 a 34, e Figuras 13 a 20, nas quais o valor exterior está indicado pela ordem em que foi colhido (Anexo 1) e na descrição dos mesmos, para orientação da leitura das Figuras, foi anotado entre parênteses.

Tabela 27. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável comprimento do flagelo da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa (n = 30)					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
Compri-mento do flagelo	Limite inferior	4,60	6,00	3,19	3,87	5,59	8,1(p = 0,087) NS[2]
	Valor mínimo	5,19	6,36	5,04	5,25	5,21	
	Q_1	6,70	7,29	6,34	6,18	6,94	
	Mediana[1]	7,33**a**	7,84**a**	7,58**a**	7,18**a**	7,43**a**	
	Q_3	8,10	8,15	8,44	7,72	7,85	
	Valor Máximo	10,05	9,42	9,32	8,90	10,05	
	Limite superior	9,15	9,94	11,59	10,03	9,20	
	Semi-amplitude interquartílica	0,70	0,43	1,05	0,77	0,45	

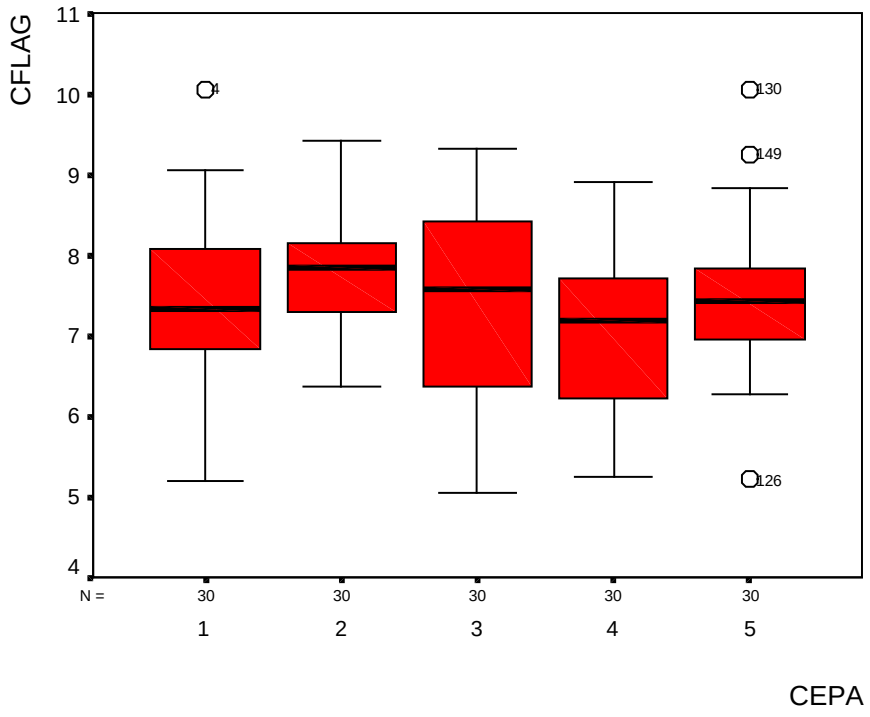
(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(2) NS = não-significante

Na Tabela 27 e na Figura 13, observa-se que o menor comprimento de flagelo (CFLAG) encontrado (valor mínimo) foi de 5,04µm para a cepa QM1; 5,19µm para a cepa QJ1; 5,21µm para a cepa QB1; 5,25µm para a QM2 e para a cepa QJ3 6,36µm. O comprimento máximo do flagelo foi de 10,05µm para as cepas QJ1 e QB1; 9,42µm para a QJ3; para a cepa QM1 9,32µm e 8,90µm para a cepa QM2.

Verifica-se que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima

dele. Portanto, 25% dos comprimentos dos flagelos estão abaixo ou iguais a 6,18µm para a cepa QM2 e 7,29µm para a cepa QJ3, sendo os demais intermediários a esses valores (6,34µm para a cepa QM1; 6,70µm para a cepa QJ1; 6,94µm para a cepa QB1). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% dos comprimentos dos flagelos, apresentam valor igual ou superior a 7,72µm para a cepa QM2 e 8,44µm para a cepa QM1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 7,72µm; cepa QJ1 8,10µm e cepa QJ3 8,15µm).

Observa-se ainda, que 50% dos comprimentos de flagelo encontrados, valores medianos, são iguais ou inferiores a 7,18µm para a cepa QM2 e a 7,84µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (7,33µm para a cepa QJ1; 7,43µm para a cepa QB1 e 7,58 para a cepa QM1); verifica-se também que 50% dos valores encontram-se entre 6,70 e 8,10 para a cepa QJ1; 7,29 e 8,15 para a cepa QJ3; 6,34 e 8,44 para a cepa QM1; 6,18 e 7,72 para a cepa QM2 e 6,94 e 7,85 para a cepa QB1.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 13. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exterior para a variável comprimento do flagelo das cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Deve-se observar que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente não-significante quando se compararam as cepas segundo o comprimento de flagelo, o que permite afirmar que as cepas não diferem quanto ao comprimento do flagelo.

Na Figura 13, pode-se observar a presença de valores exteriores , ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos ou baixos em relação aos demais, sendo o valor 10,05(4) para a cepa QJ1 e os valores 5,91(126), 9,25(130) e 10,05(149) para a cepa QB1.

Tabela 28. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável comprimento do corpo da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
Comprimento do corpo	Limite inferior	11,72	9,15	6,71	8,46	9,02	35,1 ($p < 0,001$) SIGNIF.[3]
	Valor mínimo	10,90	11,55	10,59	9,25	9,54	
	Q_1	13,22	12,72	12,05	11,04	11,81	
	Mediana[1]	13,56**c**	13,98**c**	14,22**c**	11,98**a**	12,84**b**	
	Q_3	14,22	15,10	15,60	12,76	13,68	
	Valor máximo	15,60	16,47	17,38	14,73	14,71	
	Limite superior	15,72	18,67	20,94	15,34	16,47	
	Semi-amplitude interquartílica	0,50	1,19	1,78	0,86	0,93	

(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(3) SIGNIF. = SIGNIFICANTE

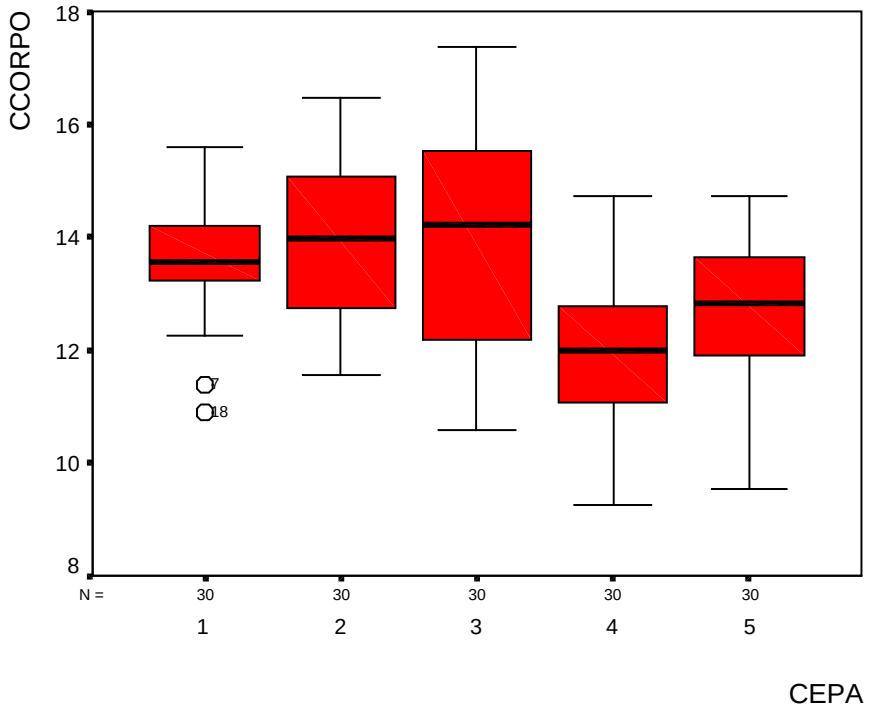
Pode-se observar na Tabela 28 e Figura 14, que o menor comprimento de corpo (CCORPO) encontrado (valor mínimo) foi de 9,25µm para a cepa QM2 e 11,55µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (9,54µm para a cepa QB1; 10,59 para cepa QM1 e 10,90 para a cepa QJ1). O comprimento máximo de corpo foi de 14,71µm para a cepa QB1 e 17,38µm para a cepa QM1, sendo os demais valores intermediários a esses (14,73µ m QM2, 15,60µm QJ1 e 16,47µm QJ3).

Verifica-se também que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% dos comprimentos de corpos estão abaixo ou iguais a 11,04µm para a cepa QM2 e 13,22 para a cepa QJ1, sendo os demais intermediários a esses valores (11,81 para a cepa QB1; 12,05 para a cepa QM1; 12,72 para a cepa QJ3). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% dos comprimentos de corpos, apresentam valor igual ou superior a 12,76µm para

a cepa QM2 e 15,60µm para a cepa QM1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 13,68µm; cepa QJ1 14,22µm e cepa QJ3 15,10µm).

Observa-se ainda que 50% dos valores são iguais ou inferiores a 11,98µm para a cepa QM2 e a 14,22µm para a cepa QM1, sendo os demais valores intermediários a esses (12,84µm para a cepa QB1; 13,56µm para a cepa QJ1 e 13,98µm para a cepa QM1), segundo o comprimento de corpo. Encontram-se 50% dos valores para a cepa QJ1 entre 13,22 e 14,22; para a cepa QJ3 entre 12,72 e 15,10; para a cepa QM1 entre 12,05 e 15,60; para a cepa QM2 entre 11,04 e 12,76.

Deve-se observar ainda, que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente significante quando se compararam as cepas segundo o comprimento de corpo, portanto sendo lícito afirmar que as cepas diferem entre si, apresentando a cepa QM2 o menor valor mediano (11,98µm), diferindo da cepa QB1, a qual apresentou um valor mediano intermediário (12,845µm) entre aquela cepa (QM2) e o grupo de cepas que não apresentaram diferenças significativas entre si: QJ1(13,56µm), QJ3(13,98µm) e QM1(14,22µm), das quais difere estatisticamente.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 14. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores para a variável comprimento do corpo das cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 14, pode-se observar a presença de valores exteriores , ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito baixos em relação aos demais, sendo os valores 11,39(7) e 10,90(18) para a cepa QJ1.

Tabela 29. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável comprimento total da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
Comprimento total do corpo	Limite inferior	15,83	17,56	11,98	13,22	15,76	35,1 ($p < 0,001$) SIGNIF.[3]
	Valor mínimo	16,36	19,08	15,81	15,36	16,29	
	Q_1	19,46	20,74	19,12	17,39	19,00	
	Mediana[1]	20,98**c**	21,68**c**	21,46**c**	18,98**a**	19,78**b**	
	Q_3	22,17	22,86	23,87	20,17	21,15	
	Valor Máximo	24,39	24,43	26,62	21,75	22,99	
	Limite superior	25,80	26,04	31,01	24,34	24,39	
	Semi-amplitude interquartílica	1,35	1,06	2,38	1,39	1,08	

(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(3) SIGNIF. = SIGNIFICANTE

Na Tabela 29 e Figura 15, observa-se que o menor comprimento total encontrado (valor mínimo) foi de 15,36µm para a cepa QM2 e 19,08µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (15,81µm para a cepa QM1; 16,29 para cepa QB1 e 16,36 para a cepa QJ1). O comprimento total máximo foi de 21,75µm para a cepa QM2 e 26,62µm para a cepa QM1, sendo os demais valores intermediários a esses (22,99µm para QB1; 24,39µm para QJ1 e 24,43µm para a QJ3).

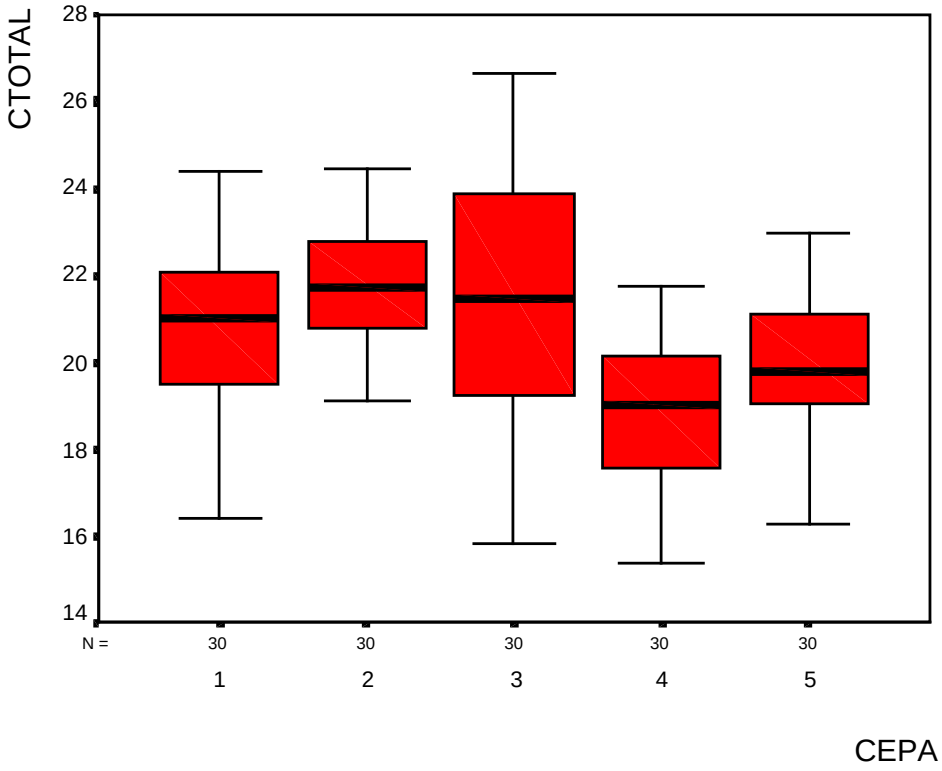
Verifica-se também que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% dos comprimentos totais dos parasitas estão abaixo ou iguais a 17,39µm para a cepa QM2 e 20,74µm para a cepa QJ3, sendo os demais intermediários a esses valores (19,00 para a cepa QB1; 19,12 para a cepa QM1; 19,46 para a cepa QJ1). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75%

abaixo dele. Dessa forma, 25% dos comprimentos totais dos parasitas, apresentam valor igual ou superior a 20,17µm para a cepa QM2 e 23,87µm para a cepa QM1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 21,15µm; cepa QJ1 22,17µm e cepa QJ3 22,86µm).

Observa-se que 50% dos valores são iguais ou inferiores a 18,98µm para a cepa QM2 e a 21,68µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (19,78µm para a cepa QB1; 20,98µm para a cepa QJ1 e 21,46µm para a cepa QM1), segundo o comprimento total. Dos valores achados, podemos observar que 50% encontram-se entre 19,46 e 22,17 para a cepa QJ1, entre 20,74 e 22,86 para a cepa QJ3, entre 19,12 e 23,87 para a cepa QM1, entre 17,39 e 20,17 para a cepa QM2 e para a cepa QB1 entre 19,00 e 21,15.

Deve-se observar ainda que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente significante quando se compararam as cepas segundo o comprimento total, portanto sendo lícito afirmar que as cepas diferem entre si, apresentando a cepa QM2 o menor valor mediano (18,98µm), diferindo da cepa QB1, a qual apresentou um valor mediano intermediário (19,78µm) entre aquela cepa (QM2) e o grupo de cepas que não apresentaram diferenças significativas entre si: QJ1 (20,98µm), QM1 (21,46µm) e QJ3 (21,68µm), das quais difere estatisticamente.

Na Figura 15, não se observa a presença de valores exteriores, ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos ou baixos em relação aos demais.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 15. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores para a variável comprimento total do corpo para as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Tabela 30. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável largura da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
Largura	Valor mínimo	1,27	1,44	1,17	1,18	1,35	5,9 (p = 0,205) NS.[2]
	Q_1	1,56	1,63	1,45	1,48	1,64	
	Mediana[1]	1,72**a**	1,80**a**	1,76**a**	1,71**a**	1,78**a**	
	Q_3	2,07	1,99	1,90	1,85	1,88	
	Valor Máximo	2,76	2,65	2,13	2,14	2,05	
	Semi-amplitude interquartílica	1,82	1,81	1,68	1,67	1,76	

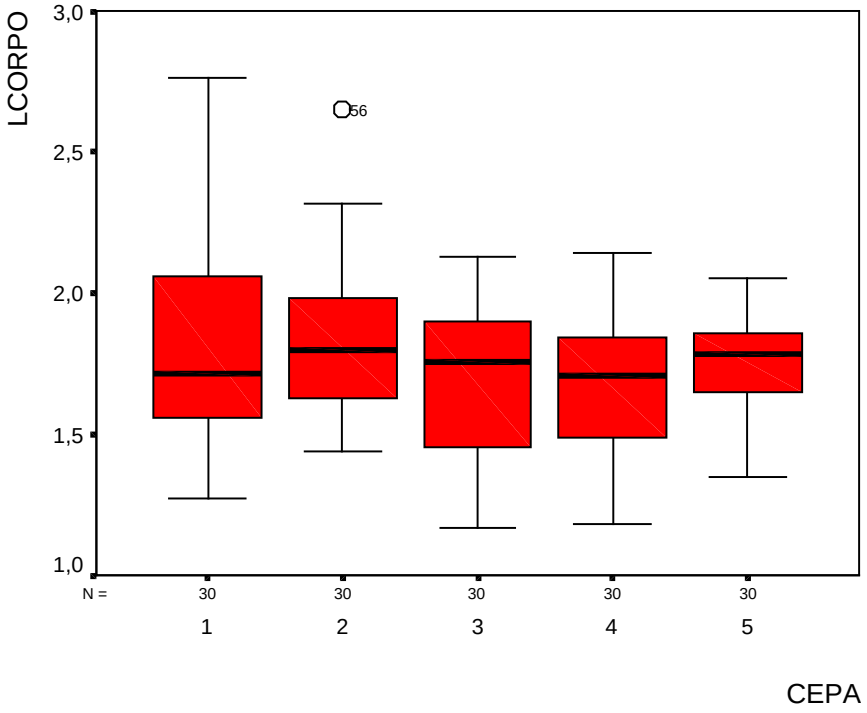
(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(2) NS = não-significante

Na Tabela 30 e Figura 16, observa-se que a menor largura encontrada (valor mínimo) foi de 1,17µm para a cepa QM1; 1,18 para a cepa QM2; 1,27 para a cepa QJ1; 1,35 para a cepa QB1 e para a cepa QJ3, 1,44µm. O máximo da largura foi de 2,05µm para a cepa QB1; 2,13 para a QM1; 2,14 para a cepa QM2; 2,65 para a cepa QJ3; 2,76 para a cepa QJ1.

Verifica-se que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% das larguras estão abaixo ou iguais a 1,45µm para a cepa QM1 e 1,63 para a cepa QJ3, sendo os demais intermediários a esses valores (1,48 para a cepa QM2; 1,56 para a cepa QJ1; 1,64 para a cepa QB1). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% da largura, apresentam valor igual ou superior a 1,85µm para a cepa QM2 e 2,07µm para a cepa QJ1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 1,88; cepa QM1 1,90 e cepa QJ3 1,99µm).

Observa-se ainda que 50% da largura encontrados, valores medianos, são iguais ou inferiores a 1,71µm para a cepa QM2 e a 1,80µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (1,72µm para a cepa QJ1; 1,76µm para a cepa QM1 e 1,78 para a cepa QB1).

Deve-se observar ainda que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente não-significante quando se compararam as cepas segundo a largura, o que permite afirmar que as cepas não diferem quanto a largura.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 16. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valor exterior para a variável largura das cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 16, pode-se observar a presença de valor exterior, ou seja valor que não se comporta como os demais do conjunto de dados, por ser muito alto em relação aos demais, sendo o valor 2,65(56) para a cepa QJ3.

Tabela 31. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável Área do cinetoplasto (ACIN) da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
ACIN	Limite inferior	0,19	0,56	0,46	0,40	0,21	22,1 ($p < 0,001$) SIGNIF.[3]
	Valor mínimo	0,66	0,81	0,63	0,41	0,46	
	Q_1	0,73	0,89	0,79	0,94	0,69	
	Mediana[1]	0,90 **ab**	0,93 **bc**	0,92 **ab**	1,06**c**	0,86**a**	
	Q_3	1,10	1,10	1,02	1,30	1,01	
	Valor Máximo	1,57	1,30	1,22	2,35	1,17	
	Limite superior	1,64	1,43	1,35	1,84	1,49	
	Semi-amplitude interquartílica	0,18	0,11	0,11	0,18	0,16	

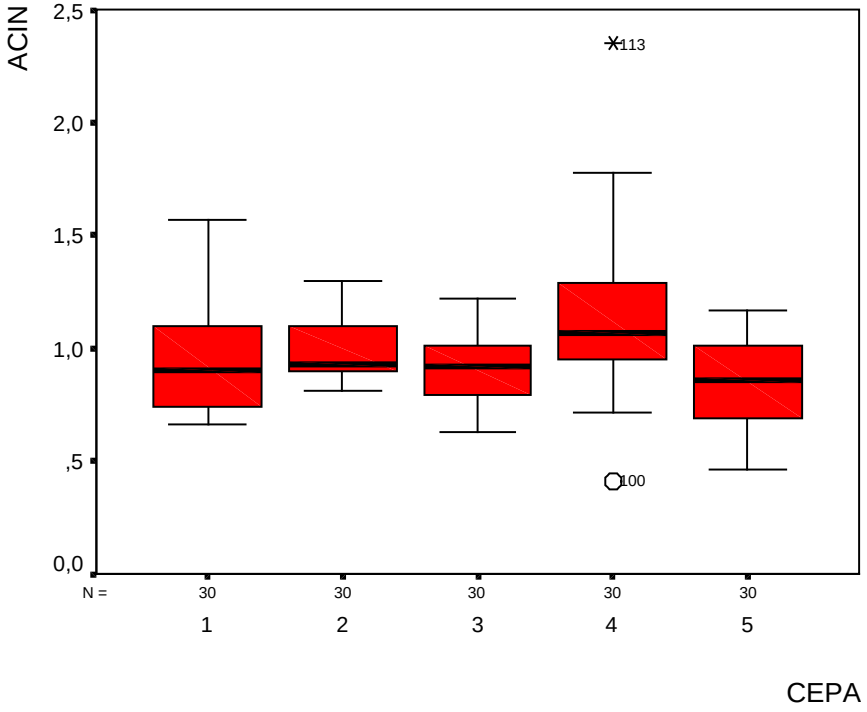
(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(3) SIGNIF. = SIGNIFICANTE

Pode-se observar na Tabela 31 e Figura 17 que o menor ACIN encontrado (valor mínimo) foi de 0,41µm para a cepa QM2 e 0,81µm para a cepa QJ3, sendo os demais valores intermediários a esses (0,46µm para a cepa QB1; 0,63µm para cepa QM1 e 0,66µm para a cepa QJ1). O ACIN máximo foi de 1,17µm para a cepa QM1 e 2,35µm para a cepa QM2, sendo os demais valores intermediários a esses (1,22µm para a cepa QM1; 1,30µm para a QJ3 e 1,50µm para a QJ1).

Verifica-se também que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% dos ACIN estão abaixo ou iguais a 0,69µm para a cepa QB1 e 0,94µm para a cepa QM2, sendo os demais intermediários a esses valores (0,73µm para a cepa QJ1; 0,79 para a cepa QM1; 0,89µm para a cepa QJ3). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma,

25% da ACIN, apresentam valor igual ou superior a 1,17µm para a cepa QB1 e 2,35µm para a cepa QM2, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QM1 1,22µm; cepa QJ3 1,30µm e cepa QJ1 1,57µm).

Deve-se observar que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente significante quando se compararam as cepas segundo a ACIN, portanto sendo lícito afirmar que as cepas diferem entre si, apresentando a cepa QB1 o menor valor mediano (0,86µm), diferindo da cepa QJ3, a qual apresentou um valor mediano intermediário (0,93µm) entre aquela cepa (QB1) e a cepa QM2 (1,06µm); as cepas QJ1(0,90) e QM1(0,92) não apresentaram diferenças significativas da cepa QB1 e nem da QJ3.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM 1; 4= QM 2; 5= QB1

Figura 17. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores da variável ACIN para as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 17, pode-se observar a presença de valores exteriores , ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos ou muito baixos em relação aos demais, sendo o valores 0,41(100) e 2,35(113) para a cepa QM2.

Tabela 32. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável distância posterior - núcleo (PN) da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	Q3I	QM1	QM2	QB1	
PN	Limite inferior	6,63	5,83	4,40	5,32	6,18	37,9 (p < 0,001) SIGNIF.[3]
	Valor mínimo	6,75	6,59	6,50	6,10	6,33	
	Q_1	8,13	8,26	7,68	7,00	7,50	
	Mediana[1]	8,68**b**	8,91**b**	9,25**b**	7,33**a**	7,86**a**	
	Q_3	9,16	9,91	10,04	8,12	8,38	
	Valor Máximo	10,25	11,82	12,07	9,30	9,46	
	Limite superior	10,66	12,34	13,58	9,80	9,70	
	Semi-amplitude interquartílica	0,50	0,81	1,18	0,56	0,44	

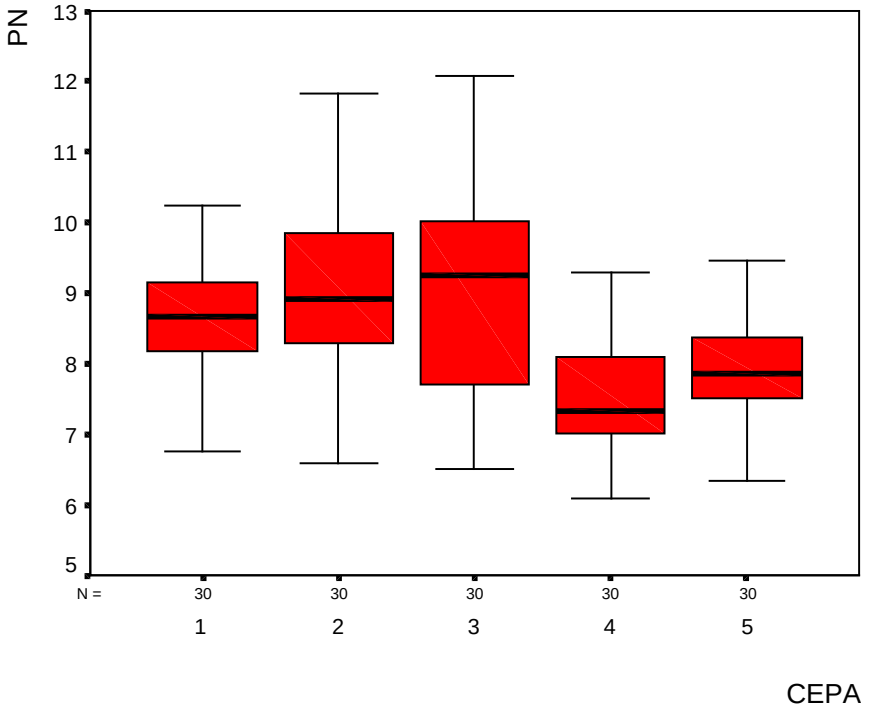
(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(3) SIGNIF. = SIGNIFICANTE

Pode-se observar na Tabela 32 e Figura 18 que o menor PN encontrado (valor mínimo) foi de 6,10µm para a cepa QM2 e 6,75µm para a cepa QJ1, sendo os demais valores intermediários a esses (6,33µm para a cepa QB1; 6,50 para cepa QM1 e 6,59m para a cepa QJ3). O PN máximo foi de 9,30µm para a cepa QM2 e 12,07µm para a cepa QM1, sendo os demais valores intermediários a esses (9,46µm para a cepa QB1; 10,25µm para a cepa QJ1 e 11,82µm para a cepa QJ3).

Verifica-se também que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% da distância posterior-núcleo está abaixo ou igual a 7,00µm para a cepa QM2 e 8,26µm para a cepa QJ3, sendo os demais intermediários a esses valores (7,50 para a cepa QB1; 7,68 para a cepa QM1; 8,13 para a cepa QJ1). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% da distância posterior-núcleo, apresenta valor igual ou superior a 8,12µm para a cepa QM2 e 10,04µm para a cepa QM1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 8,38µm; cepa QJ1 9,16µm e cepa QJ3 9,91µm).

Observa-se que 50% dos valores são iguais ou inferiores a 7,33µm para a cepa QM2 e a 9,25µm para a cepa QM1, sendo os demais valores intermediários a esses (7,86µm para a cepa QB1; 8,68µm para a cepa QJ1 e 8,91µm para a cepa QJ3), segundo o PN.

Deve-se observar que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente significante quando se compararam as cepas segundo o PN, portanto sendo lícito afirmar que as cepas diferem entre si, apresentando a cepa QM2 o menor valor mediano (7,33µm; a qual não difere estatisticamente da cepa QB1 (7,86µm, ambas apresentando diferenças estatisticamente significativas das cepas QJ1(8,68), QJ3(8,91) e QM1(9,25), as quais não apresentam diferenças significativas entre si.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 18. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores da variável PN para as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 18, não se observa a presença de valores exteriores, ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos ou muito baixos em relação aos demais.

Tabela 33. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável anterior – núcleo (NA) da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
NA	Limite inferior	3,87	3,06	2,36	1,13	2,98	11,0 (p = 0,026) SIGNIF.[3]
	Valor mínimo	3,84	3,29	2,98	2,95	3,13	
	Q_1	4,71	4,50	4,10	3,62	4,41	
	Mediana[1]	5,00**b**	5,00**b**	4,73**b**	4,18**a**	5,00 **ab**	
	Q_3	5,26	5,35	5,32	5,27	5,57	
	Valor Máximo	6,13	6,09	6,23	5,89	6,87	
	Limite superior	6,10	6,79	7,06	7,76	8,06	
	Semi-amplitude interquartílica	0,28	0,48	0,58	0,83	0,61	

(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(3) SIGNIF. = SIGNIFICANTE

Pode-se observar na Tabela 33 e Figura 19 que o menor AN encontrado (valor mínimo) foi de 2,95µm para a cepa QM2 e 3,84µm para a cepa QJ1, sendo os demais valores intermediários a esses (2,98µm para a cepa QM1, 3,13 para cepa QB1 e 3,29 para a cepa QJ3. O NA máximo foi de 5,89µm para a cepa QM2 e 6,87µm para a cepa QB1, sendo os demais valores intermediários a esses (6,09 para a cepa QJ3; 6,13 para a cepa QJ1 e 6,23 para a cepa QM1).

Verifica-se também que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% dos AN estão abaixo ou iguais a 3,62µm para a cepa QM2 e 4,71 para a cepa QJ1, sendo os demais intermediários a esses valores (4,10 para a cepa QM1; 4,41 para a cepa QB1; 4,50 para a cepa QJ3). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% dos valores AN, apresentam valor igual ou superior a 5,26µm para a cepa QJ1 e 5,57µm para a

cepa QB1, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QM2 5,27µm; cepa QM1 5,32µm e cepa QJ3 5,35µm).

Observa-se que 50% dos valores são iguais ou inferiores a 4,18µm para a cepa QM2 e a 5,00µm para as cepas QJ1, QJ3 e QM1; sendo o valor para a cepa QB1 - 4,73 - intermediário a eles, segundo o AN.

Deve-se observar também que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente significante quando se compararam-se as cepas segundo o AN, portanto sendo lícito afirmar que as cepas diferem entre si, apresentando a cepa QM2 o menor valor mediano (4,18), apresentando diferença significativa das cepas QJ1, QJ3 e QB1 (5,00), as quais não diferem estatisticamente entre si. A cepa QB1 apresentou um valor mediano intermediário (4,73), apresentando diferença significativa da cepa QM2, e apresentando diferença não significativa das demais.

Legenda: 1= QJ 1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

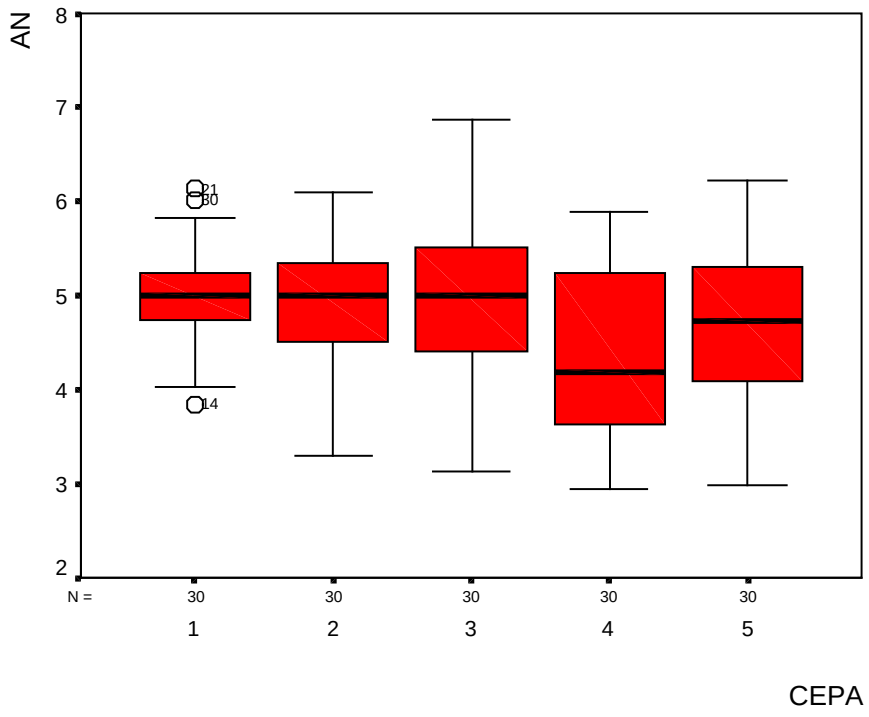


Figura 19. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores da variável A/N para as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 19, pode-se observar a presença de valores exteriores , ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos ou muito baixos em relação aos demais, sendo o valores 3,84(14), 21(6,13) e 30(6,12) para a cepa QJ1.

Tabela 34. Mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), semi-amplitude interquartílica e valores mínimo e máximo da variável índice nuclear (IN) da cepa e resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Variável	Medida Descritiva	Cepa					Resultado do Teste
		QJ1	QJ3	QM1	QM2	QB1	
IN	Limite inferior	1,23	0,82	0,70	0,34	0,90	2,33 (p = 0,675) NS.[2]
	Valor mínimo	1,26	1,33	1,23	1,24	1,20	
	Q_1	1,62	1,60	1,54	1,42	1,53	
	Mediana[1]	1,71 **a**	1,79**a**	1,78**a**	1,80**a**	1,74**a**	
	Q_3	1,84	2,12	2,08	2,14	1,94	
	Valor Máximo	2,55	2,87	2,95	2,49	2,40	
	Limite superior	2,23	1,90	2,92	3,22	2,57	
	Semi-amplitude interquartílica	0,13	0,26	0,28	0,36	0,21	

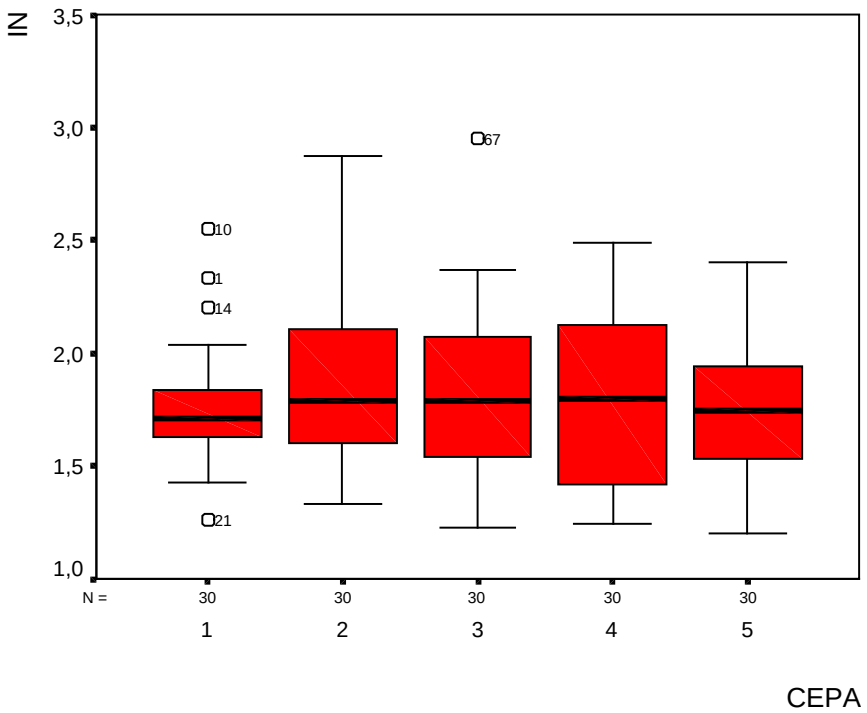
(1) duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem no nível 5% de significância.
(2) NS = NÃO-SIGNIFICANTE

Na Tabela 34 e Figura 20, observa-se que o menor IN encontrado (valor mínimo) foi de 1,20µm para a cepa QB1; 1,23 para a cepa QM1; 1,24 para a cepa QM2; 1,26 para a cepa QJ1 e para a cepa QJ3 1,33µm. O IN máximo foi de 2,40µm para a cepa QB1; 2,49 para a QM2, para a cepa QJ1 2,55; 2,87 para a cepa QJ3 e 2,95 para a cepa QM1.

Verifica-se que o primeiro quartil (Q_1) é o valor que separa o conjunto de dados em duas partes: 25% dos dados estão abaixo e 75% estão acima dele. Portanto, 25% dos IN estão abaixo ou iguais a 1,42µm para a cepa QM2 e 1,62 para a cepa QJ1, sendo os demais intermediários a esses valores (1,53 para a cepa QB1; 1,54 para a cepa QM1; 1,60 para a cepa QJ3). Observando o valor do terceiro quartil (Q_3), pode-se afirmar que 25% dos dados estão acima dele e 75% abaixo dele. Dessa forma, 25% dos índices nucleares, apresentam valor igual ou superior a 1,84µm para a cepa QJ1 e 2,14µm para a cepa QM2, sendo os demais intermediários a esses valores (cepa QB1 1,94; cepa QM1 2,08 e cepa QJ3 2,12µm).

Observa-se que 50% dos IN encontrados, valores medianos, são iguais ou inferiores a 1,71µm para a cepa QJ1 e 1,80µm para a cepa QM2, sendo os demais valores intermediários a esses (1,74µm para a cepa QB1; 1,78µm para a cepa QM1 e 1,79 para a cepa QJ3).

Deve-se observar, que o teste estatístico utilizado apresentou um resultado estatisticamente não-significante quando se compararam as cepas segundo o IN, o que permite afirmar que as cepas apresentaram diferenças estatisticamente não significativas quando estudou-se essa variável.



Legenda: 1= QJ1; 2= QJ3; 3= QM1; 4= QM2; 5= QB1

Figura 20. *Box-plot* com a mediana, quartil 1 (Q_1), quartil 3 (Q_3), limite inferior, limite superior e valores exteriores da variável IN para as cinco cepas de *T. cruzi* estudadas.

Na Figura 15, pode-se observar a presença de valores exteriores , ou seja valores que não se comportam como os demais do conjunto de dados, por serem muito altos

ou muito baixos em relação aos demais, sendo os valores 2,55(10), 1(2,33), 2,20(14) e 1,26(21) para a cepa QJ1 e o valor 2,95(67) para a cepa QM1.

4.5 Caracterização genotípica

A análise do domínio divergente do gene 24 S α rRNA, amplificado por PCR e realizada por eletroforese em gel de acilamida a 8% corado com prata mostrou fragmentos de 110 pb, ou seja, *T. cruzi* I, onde se agrupam as cepas que predominam no ambiente silvestre, conforme demonstrado pela Figura 21.

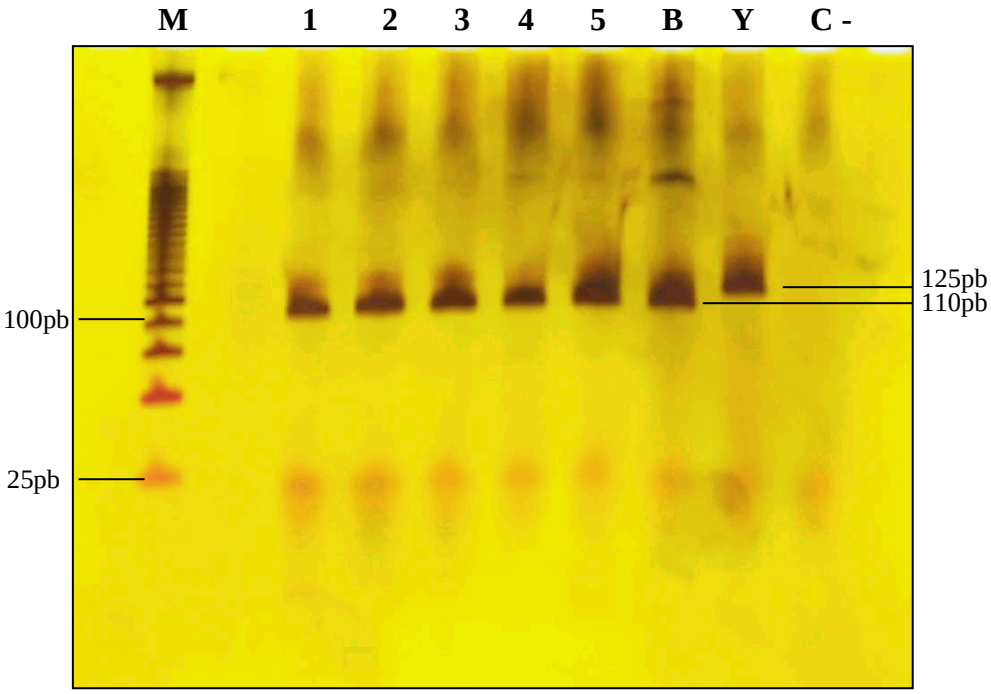


Figura 21. Análise do dimorfismo genético da fração 24Sa do rRNA de *Trypanosoma cruzi* por PCR e eletroforese em gel de acrilamida 8%, corado com prata. M - marcador de peso molecular de 25pb; 1: QJ1; 2: QJ3; 3: QM1; 4: QM2; 5: QB1; B: cepa Bolívia; Y: cepa Y e C: controle negativo da reação de PCR.

5 DISCUSSÃO

A ocorrência da doença de Chagas diminuiu acentuadamente em áreas endêmicas como Argentina, Brasil, Chile e Uruguai, após o efetivo controle dos principais insetos vetores (WHO, 2002).

Atualmente, subsiste o risco de domiciliação de vetores desde o ambiente silvestre (SILVEIRA, 2000), aceitando-se como possível a reintrodução do ciclo domiciliar da doença de Chagas (FERRAZ FILHO e RODRIGUES, 1987), pois a doença não pode ser erradicada por ser uma zoonose (WHO, 2002).

Assim, o estudo fenotípico e genotípico de cepas isoladas de triatomíneos silvestres justifica-se plenamente, principalmente nas regiões onde existe o risco de domiciliação destes vetores, como é o caso do município de Quaraí- RS.

5.1 Coleta dos triatomíneos

Em 1950, quando o controle da transmissão vetorial da doença de Chagas foi institucionalizado pelo Serviço Nacional de Malária, o Estado do Rio Grande do Sul apresentava uma prevalência da infecção chagásica de 8,8% na população rural (VINHÃES e DIAS, 2000).

Di Primio (1957) estudando a distribuição dos triatomíneos no Estado do Rio do Grande do Sul, mostrou o predomínio de *T. infestans*, tendo sido encontrado em 67 (55%) municípios, *T. rubrovaria* em 26 (22%) e *T. circummaculata* em 3 (2,6%). Esse autor encontrou índices de infecção pelo *T. cruzi* de 40,4% para *T. infestans*, 25,5% para *T. rubrovaria* e zero para *T. circummaculata*. No município de Quaraí, foram coletados 100 exemplares de *T. infestans* em seis bairros, sendo que desses, sete apresentavam infecção pelo *T. cruzi*. A espécie *T. rubrovaria* foi encontrada em dois bairros, Branquilhos e fazenda do Tuna, onde foram coletados 11 exemplares, os quais não estavam infectados pelo *T. cruzi*.

Nesta busca e captura por triatomíneos silvestres, nenhum exemplar de *T. infestans* foi encontrado, fato esperado, pois essa espécie, quando encontrada restringe-se ao domicílio ou peridomicílio de focos residuais da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (DIAS. 2002).

Não se pode descartar a hipótese do encontro de *T. infestans* nessa região do Estado, mesmo porque nesta pesquisa a busca não foi direcionada a esse triatomíneo, sendo realizada em ambiente silvestre, em locais pedregosos, habitat do *T. rubrovaria* (RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002). Além do que, o pequeno período de tempo disponível para a coleta, que foi realizada em três dias, com total de 21 horas e apenas seis coletores não permitiu uma busca nos domicílios e peridomicílios onde se poderia encontrar *T. infestans*.

Assim, o predomínio de *T. rubrovaria*, 92,9% do total dos triatomíneos coletados em regiões pastoris de seis bairros de Quaraí vem confirmar as investigações realizadas por Almeida et al. (2000), pois, para esse autor, essa espécie tem características pre-adaptativas para o intradomicílio, necessitando ser mantido sob constante vigilância.

Nesses exemplares coletados, o índice de infecção pelo *T. cruzi* foi de 1,6%, maior que o encontrado por Salvatella et al. (1994) no Uruguai com 0,34% dos triatomíneos infectados. O encontro de ninfas positivas em seis bairros demonstra que o ciclo silvestre está instalado no município. Foi encontrada também uma porcentagem maior de exemplares nos bairros mais próximos à área urbana de Quaraí, como Branquilhos e Macarrão, localizados a 6,2 e 12,9 Km respectivamente, servindo de alerta para as autoridades responsáveis pela vigilância e controle da endemia, pois torna-se cada vez mais evidente o aumento do risco da infecção humana pela via vetorial.

Confirmando os achados de Salvatella et al. (1995), apenas dois exemplares adultos de *T. rubrovaria* foram coletados, demonstrando uma característica típica dessas colônias, que varia conforme a estação do ano, com maiores populações entre outubro e novembro. Durante todo o ano, predominam as formas de terceiro, quarto e quinto estádio, sendo os adultos encontrados de outubro a março. Dessa forma, sugere-se que as atividades de controle dos triatomíneos sejam realizadas antes de outubro quando ocorre a dispersão dos exemplares adultos.

Observa-se que *T. circummaculata*, encontrado apenas em dois bairros, está ocupando progressivamente o território do município de Quaraí, apesar de não haver sinais de colonização nas moradias humanas (RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002). No levantamento realizado por Di Primio em 1957, não foi encontrado *T. circummaculata* nesse município, porém em Alegrete e Rosário do Sul, que são vizinhos a ele, foram coletados dois exemplares,

indicando a possibilidade de dispersão a partir desses municípios, ou do Uruguai, que faz fronteira com Quaraí, pois nesse país, o *T. circummaculata* ocupa o segundo lugar em importância (FRANCA ROGRIGUES et al., 1980).

Nos exemplares coletados de *T. circummaculata* não foi observada infecção por Trypanosomatidae, provavelmente devido à característica de essa espécie possuir menor avidez para alimentar-se sobre os animais reservatórios da doença de Chagas (RUAS NETO e CORSEUIL, 2002).

Coabitando com *T. rubrovaria*, o *P. tupynambai*, foi encontrado em pequeno número nessa busca por triatomíneos rupestres. Esse fato, comprovado também por vários autores (SALVATELLA, 1986; LOROSA et al., 2000) pode ser justificado pelo micro habitat dessa espécie, que são ocos de pedras semi-enterradas em solo úmido, onde a alimentação é escassa (SALVATELLA, 1986), limitando o crescimento das colônias. Apesar de as seis ninfas se *P. tupynambai* não estarem infectadas por Trypanosomatidae, alguns autores (LOROSA et al., 2000; RUAS NETO e CORSEUIL, 2002) já encontraram essa espécie com infecção natural pelo *T. cruzi*.

5.2 Prova da precipitina

Brumpt (1927) citado por Lorosa et al. (1999), referia o ecletismo alimentar dos triatomíneos, que na natureza se alimentavam de répteis e anfíbios; sendo esse polifagismo um dos fatores que torna difícil o extermínio desses insetos.

Para Salvatella et al. (1994), Lorosa et al. (2000) e Ruas-Neto e Corseuil (2002) é marcante o ecletismo alimentar de *T. rubrovaria, T. circummaculata* e *P. tupynambai*. Ruas-Neto e Corseuil (2002) relataram que ninfas de 1º estádio de *T.*

circummaculata dependem da hemolinfagia sobre blastódeos para seguir seu desenvolvimento até adultos.

Neste trabalho, os resultados da prova da precipitina realizada nos treze exemplares (4,1%) de *T. rubrovaria* positivos para Trypanosomatidae, demonstraram essa falta de especificidade quanto às fontes que servem de alimentação, sugando os vertebrados que, provavelmente, estão mais disponíveis em cada ecotópo, confirmando os achados dos autores acima.

Dentre os treze triatomíneos que tiveram o conteúdo intestinal examinado, oito apresentaram alimentação única, sendo quatro deles positivos para anti-soro de roedor e quatro positivos para anti-soro de cabra, resultados que apontam para a possibilidade de esses animais estarem representando as principais fontes de infecção para Trypanosomatidae.

Para Salvatella et al. (1994, 1995) os roedores são apontados como os principais reservatórios de *T. cruzi*.

Ressalta-se que sete (53,8%) dos treze tritomíneos positivos para Trypanosomatidae foram coletados nos bairros Macarrão e Branquilhos, que são os mais próximos à área urbana de Quaraí, como já referido no ítem anterior. Um desses sete triatomíneos, capturado no bairro Branquilhos, mostrou reação de precipitina positiva para anti-soro humano e porco.

O encontro positivo para anti-soro humano na reação de precipitina também foi confirmado por Lorosa et al. (2000), Ruas-Neto e Corseuil (2002) e Almeida et al. (2002), reafirmando a importância epidemiológica do *T. rubrovaria*, salientando a necessidade de vigilância constante.

A ocorrência de resultados não reagentes em quatro triatomíneos na reação da precipitina deve-se provavelmente à insuficiência de material sangüíneo na amostra do

conteúdo intestinal ou à possibilidade de o animal que serviu de fonte alimentar não estar contemplado na bateria de anti-soros utilizada, como os lagartos, que foram observados nos locais de coleta, pois Lorosa et al. (2000), Ruas-Neto e Corseuil (2002) e Almeida et al. (2002) também observaram os répteis como fonte alimentar dos triatomíneos em ambientes semelhantes.

5.3 Cepas não isoladas

Apesar das semelhanças morfológicas observadas entre as formas de Trypanosomatidae quando se realizou o exame a fresco em aumento de 400 vezes das fezes dos 13 triatomíneos positivos, de oito insetos não se conseguiu o isolamento.

Descartando o não isolamento dessas cepas por motivos de ordem técnica, supõe-se a possibilidade da presença de outros tripanossomatídeos não patogênicos para o homem, que podem compartilhar e habitar o intestino dos triatomíneos juntamente com o *T. cruzi*, como o caso do *Trypanosoma rangeli* e *Blastocrithidia triatomae* (SCHAUB E BÖKER, 1986; CUBA-CUBA, 1998; SILVA-JÚNIOR et al., 2003; SANTOS-PEREIRA et al., 2003).

Inicialmente, a diferenciação desses tripanossomatídeos poderia ter sido realizada por uma comparação morfológica mais acurada, utilizando método de coloração específico, como o de May-Grünwald-Giemsa, citado por Rodrigues e Silva (2002).

Embora lâminas de esfregaço do conteúdo intestinal dos triatomíneos positivos tenha sido feito, esse recurso foi prejudicado nesta pesquisa provavelmente pela escassez deste material, uma vez que o preparo das lâminas foi realizado após o exame a fresco

e obtenção do material para a prova da precipitina. Também pode ter sofrido influência da coloração utilizada, que no caso foi o Giemsa.

Da mesma forma, a pesquisa para *T. rangeli* também não ocorreu, pois não se pensou no momento em realizar exames das glândulas salivares ou hemolinfa desses triatomíneos, pois apesar de alguns autores relatarem o encontro das formas tripomastigotas dessa espécie de tripanossomatídeo nas fezes, o exame das glândulas salivares ou hemolinfa são os preferidos.

Apesar de os triatomíneos do gênero *Rhodnius* serem os frequentemente parasitados pelo *T. rangeli*, exemplares de *T. dimidiata* também foram encontrados albergando este parasita (CUBA-CUBA, 1998; GUHL e VALLEJO, 2003).

O encontro do *T. rangeli* na região sul do Brasil foi relatado por Steindel et al. (1991) quando isolaram esse parasita de roedores silvestres no Estado de Santa Catarina.

Embora hajam evidências da presença do *T. rangeli* na região sul do Brasil não se encontraram relatos sobre a infecção desse Trypanosomatidae em *T. rubrovaria* coletados no Estado do Rio Grande do Sul, pois sabe-se que o parasita co-existe com o *T. cruzi* em áreas endêmicas para a doença de Chagas (CUBA-CUBA, 1998; GUHL e VALLEJO, 2003, GURGEL-GONÇALVES et al., 2004).

5.4 Caracterização fenotípica

5.4.1 Curva parasitêmica

5.4.1.1 Período prepatente

A análise das curvas parasitêmicas realizadas nesse trabalho permitiu observar que na primeira curva, a cepa QJ1 mostrou período prepatente de 3 a 10 dias com média de 5,4 dias. Com a segunda curva, o período prepatente variou de 5 a 7 dias com média de 6,6 dias.

Para a cepa QJ3, o período prepatente com a realização da primeira curva variou de 3 a 14 dias, com média de 11,7 dias e na segunda curva, as formas tripomastigotas foram observadas a partir do 5º dia após a inoculação, com média de 5 dias.

Com a cepa QM1, observou-se o período prepatente entre 3 e 12 dias na primeira curva com média de 4,9 dias e de 7 a 12 dias, com média de 8,8 dias na segunda curva.

Para a cepa QM2, o período prepatente foi observado entre 3 e 10 dias, com média de 5,3 dias com a realização da primeira curva e de 5 a 10 dias com média de 6,8 dias com a segunda curva.

A cepa QB1 mostrou período prepatente entre 3 a 7 dias com média de 5 dias com a realização da primeira curva, e com a segunda esse período foi de 5 a 12 dias com média de 6,4 dias.

Devera et al. (2002) referiram que o período prepatente seria influenciado pela parasitemia da cepa, sendo que as de elevada parasitemia teriam períodos prepatentes mais curtos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa com a realização das curvas parasitêmicas não mostraram influência da parasitemia no período prepatente, como pode ser observado com a cepa QM2 que exibe elevada parasitemia e prepatente semelhante a QB1 de baixa parasitemia.

Esses resultados mostram uma concordância com os obtidos por Martins et al. (2003) que observaram período prepatente curto em uma cepa de baixa parasitemia.

Observou-se que a primeira curva parasitêmica com as cepas QJ1, QM1, QM2 e QB1, quando a quantidade de inóculo foi maior, mostrou períodos prepatentes menores em relação à segunda curva.

Com a cepa QJ3, o período prepatente foi menor na segunda curva em relação à primeira, quando se utilizou quantidade menor de tripomastigotas no inóculo.

A duração do período prepatente sendo influenciado pela quantidade de tripomastigotas do inóculo já foi observado por outros autores, como podemos citar o realizado por Oliveira et al. (1993), quando estudaram o comportamento de uma cepa de *T. cruzi* recém isolada de um paciente chagásico crônico e o de Martinez (2004), quando estudou duas cepas de *T. cruzi* isoladas de *T. rubrovaria*, também coletados no município de Quaraí-RS.

Oliveira et al. (1993) e Martinez (2004) realizaram curvas parasitêmicas com diferentes inóculos, utilizando a via intraperitoneal e observaram uma relação direta entre a quantidade de tripomastigotas do inóculo, o início da parasitemia e o seu pico.

Além da quantidade de tripomastigotas do inóculo, outros fatores também podem influenciar na evolução experimental da parasitemia, como a via de inoculação (PINTO et al., 1986; BELDA NETO et al., 1990; BAHIA et al.,2002) e a origem dos tripomastigotas (BELDA NETO e RIBEIRO, 1989; BELDA NETO et al., 1990; BAHIA et al., 2002).

5.4.1.2- Parasitemia

A observação das curvas parasitêmicas permitiu a constatação de grande variação da parasitemia durante a fase aguda em todos os animais inoculados com as cinco cepas como pode ser observado pela Figura 2, quando as curvas foram traçadas logo após o isolamento sem a padronização do inóculo, e pela Figura 4 quando as curvas foram traçadas com inóculo padronizado.

Apesar das cinco cepas terem sido isoladas do município de Quaraí- RS, observou-se comportamento diversificado entre elas, até entre duas cepas isoladas do mesmo bairro, como o caso da QJ1 e QJ3, isoladas dos triatomíneos provenientes do bairro Jarau e da QM1 e QM2, isoladas dos triatomíneos coletados no bairro Macarrão.

Assim, para uma melhor análise foram realizadas curvas parasitêmicas pela média logarítmica, pois segundo Sogayar et al. (1993), as análises das curvas realizadas dessa forma reduzem a influência de valores aberrantes em uma mesma cepa.

Desse modo, ao analisar as Figuras 3 e 5, observa-se que as cepas QJ3 e QB1 apresentaram níveis parasitêmicos mais baixos com oscilações constantes do número de tripomastigotas/ 5µL de sangue.

As cepas QJ1 e QM1 apresentaram níveis parasitêmicos mais elevados, observando-se um comportamento mais homogêneo durante a fase aguda quando comparadas às cepas QJ3 e QB1.

Com a cepa QM2 foi observado comportamento mais agressivo, níveis parasitêmicos elevados causando a morte de 92,3 % dos animais, geralmente no pico parasitêmico da fase aguda, ao redor do 21º dia.

Camandaroba et al. (2001) estudando clones da cepa Colombiana referiram como elevada parasitemia picos entre 100 a 500 tripomastigotas em 50 campos em aumento de 400 vezes.

Para Devera et al. (2002), cepas de elevada parasitemia foram aquelas com picos parasitêmicos maiores que 1.500 tripomastigotas/5µL, de média parasitemia aquelas que apresentavam de 500 a 1.499 parasitas/5µL e baixa, quando os picos eram inferiores a 500 formas/5µL.

Conforme os autores acima, as cepas QJ1, QM1 e QM2 seriam consideradas de elevada parasitemia nos dois estudos realizados (primeira e segunda curva parasitêmica). A cepa QB1, seria de média parasitemia na primeira curva e baixa na segunda, já a cepa QJ3 seria baixa na primeira e elevada na segunda.

Cabe ressaltar que os autores não relataram a interferência dos intercampos, que pode aumentar em 27% o resultado final (MARTINS, 1999), fato que foi considerado nesta pesquisa.

A variação da parasitemia durante a fase aguda entre as cepas foi consequência do comportamento peculiar de cada cepa, do tipo do modelo experimental utilizado, do sexo e da quantidade do inóculo utilizado.

O encontro de comportamentos variados em cepas isoladas de uma mesma região como os obtidos nesse trabalho, já foi relatado por Andrade (1974), Schlemper Jr. et al. (1986), Carneiro et al. (1991) e Martinez (2004), ao estudarem cepas isoladas dos Estados da Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul respectivamente.

Observaram-se variações na mesma cepa influenciadas pelo inóculo, ou seja, quando houve a realização da primeira curva as cepas QJ1, QM1, QM2 e QB1 mostraram

parasitemia mais elevada. Com a cepa QJ3, encontrou-se parasitemia maior na segunda curva, quando o inóculo foi maior.

A quantidade do inóculo influenciando na parasitemia também foi observado por vários autores (PINTO et al.,1986; BELDA NETO et al., 1990; PINTO, 2000 e MARTINEZ, 2004).

Notou-se que com as cepas QJ1, QJ3 e QM1, o início do pico parasitêmico foi mais precoce com inóculo maior; com a cepa QB1, o inóculo não influenciou o início do pico.

Interessante ressaltar que com a cepa QM2, o início do pico foi mais tardio com inóculo maior, como também não foi observada alteração da virulência, mostrando comportamento bastante agressivo para os camundongos “Swiss” nos dois inóculos.

O dia de parasitemia máxima variou de cepa para cepa, e na mesma cepa, o que pôde ser observado com a realização das duas curvas, não sendo nesse momento notada a influência do inóculo.

5.4.1.3- Duração da fase aguda

Entre as cinco cepas estudadas, apenas em uma, QM2, não foi possível determinar a duração da fase aguda com a realização das duas curvas parasitêmicas, pois a cepa demonstrou e, ainda após dois anos e meio de seu isolamento, continua a demonstrar comportamento bastante agressivo para camundongos “Swiss”, causando a morte dos animais no pico da parasitêmia com a elevação do número de tripomastigotas/5µL de sangue.

Com as outras cepas, observou-se com as duas curvas, a evolução dos camundongos para a fase crônica, com diminuição lenta do número de tripomastigotas/5µL de sangue.

5.4.2 Tropismo tissular

O estudo do tropismo tissular das cepas isoladas foi realizado apenas com o primeiro inóculo, ou seja, com o número de formas que cada cepa apresentava em 0,1 mL de sangue no momento da infecção.

Durante a fase aguda, observou-se infiltrado inflamatório mononuclear a partir do 7º dia em músculo esquelético com as cepas QM2 e QB1. No coração, o processo inflamatório foi observado a partir do 7º dia com a cepa QM2 e a partir do 10º dia com a cepa QJ3.

Para Lopes (2002), essa resposta inflamatória seria desencadeada pelo rompimento das células pelos ninhos parasitários, liberando no interstício as formas íntegras ou degeneradas, que atuariam como imunógenos, formando-se assim os microfocos inflamatórios às custas de mononucleares, aos quais poderiam se associar polimorfonucleares.

Além do infiltrado inflamatório mononuclear em músculo esquelético e coração, foi observada nesses órgãos a destruição de algumas fibras musculares com ou sem parasitas, o que provavelmente reflete a ação efetora do sistema imunológico na destruição dos agentes etiológicos. Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa foram observados por Schlemper Jr. et al. (1983), Andrade et al. (1985), Castro e Brener (1985), Oliveira et al. (1993) e Devera et al. (2002).

A destruição de fibras musculares poderia também ser explicada por reações cruzadas, desencadeadas por frações subcelulares do parasita e de células miocárdicas, agora expostas ao sistema imunológico (LOPES, 2002)

Assim, com as cepas QJ1 e QB1 não foram observadas formas amastigotas nos órgãos estudados, apesar da presença de infiltrado inflamatório. Com as cepas QJ3 e

QM1, ninhos de amastigotas em quantidade discreta foram encontrados no 30º dia em coração e em músculo esquelético, respectivamente, enquanto que a cepa QJ3 apresentou processo inflamatório em coração a partir do 7º dia, e a cepa QM1 a partir do 21º dia em músculo esquelético.

Com a cepa QM2, que mostrou parasitemia mais elevada em comparação com as outras quatro cepas, o encontro de ninhos parasitários foi observado em quantidade discreta a intensa a partir do 14º dia em coração e em músculo esquelético enquanto que o infiltrado inflamatório ocorreu a partir do 7º dia tanto em músculo esquelético como em coração.

No fígado, foi notado processo inflamatório tanto portal como lobular, variando de discreto a intenso a partir do 7º dia pós-infecção com as cepas QM2, QB1 e QJ3 e a partir do 10º dia com as cepas QJ1 e QM1. A inflamação hepática pode ser explicada pela resposta precoce do fígado à infecção pelo *T. cruzi* (OKUMURA, 1983).

Raras formas amastigotas de *T. cruzi* foram observadas nas células de Kupffer no 14º dia após a infecção com a cepa QM2. A presença de amastigotas nessas células se deve provavelmente à ação do sistema fagocítico mononuclear na eliminação de agentes circulantes estranhos.

Em concordância com essa possibilidade, Andrade (1974) encontrou formas amastigotas no baço, localizadas no interior de células macrofágicas, enquanto Oliveira et al. (1993) notaram que o fígado apresentava proliferação de células mononucleares no parênquima, infiltrado linfocitário nos espaços-portas e hiperplasia de células de Kupffer, sem o parasita.

Durante a fase crônica, foi observado infiltrado inflamatório mononuclear focal nos órgãos estudados, com ausência de parasitas.

Barretto et al. (1989) obtiveram resultados semelhantes aos observados nesta pesquisa, relatando que o processo inflamatório da doença de Chagas tende a ser multifocal.

Com a cepa QJ3, foram observados no coração infiltrado inflamatório, edema e necrose, e com a cepa QM2 encontrou-se fibrose focal em músculo esquelético, sem parasitas.

A ausência de ninhos de amastigotas era esperada, pois existe uma diminuição do parasitismo tecidual na fase crônica da doença, provavelmente em função da atividade do sistema imunológico, o que torna difícil e rara a sua visualização.

Para a demonstração do *T. cruzi* em meio ao processo inflamatório, Lopes (2002) relata o emprego da técnica da imunoperoxidase e PCR.

Para Higuchi (1997), o *T. cruzi* pode sobreviver à fase crônica da doença de Chagas ao causar um quadro de imunodepressão, com diminuição da expressão de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+.

Schlemper Jr. et al. (1983) ao estudarem a fase crônica em 70 camundongos também encontraram infiltrado inflamatório mononuclear sem parasitas em grande parte dos animais.

Com relação à fibrose, Schlemper Jr. et al. (1983) também a observaram como um fenômeno tardio em casos crônicos da doença.

No cólon, observou-se na fase crônica da doença, processo inflamatório mononuclear mural com as cepas QJ3, QM1, QM2, e nos plexos mioentéricos com a cepa QB1, sem parasitas.

Esses resultados também foram observados por Oliveira et al. (1993), que encontraram no cólon discretro infiltrado inflamatório com ninhos de parasita somente 40 dias após a infecção.

Assim, ao analisar os resultados dos cortes histológicos, pode-se considerar que todas as cinco cepas possuem patogenicidade para o camundongo, sendo que a cepa QM2 mostrou-se mais virulenta, segundo definições de virulência e patogenicidade de Neves (2005).

Observou-se também que a patogenicidade parece não depender do inóculo, fato observado por Andrade (1974), Oliveira et al. (1993) e Martins et al. (1997), mesmo porque, apesar de o inóculo não ter sido padronizado nessa fase do experimento, o número de tripomastigotas inoculados em cada cepa variou de acordo com as características de cada uma.

5.4.3 Estudo morfológico

Estudos realizados por Dias e Freitas Filho (1943) deixaram claro a preocupação quanto à caracterização do *T. cruzi* em relação às outras espécies do gênero. Desse modo, para Barretto (1965), o aspecto morfológico das formas tripomastigotas constitui o primeiro elemento de identificação.

Por outro lado, a mensuração tem sido usada para caracterizar as diversas cepas de *T. cruzi* (FERRIOLI et al., 1968; BELDA NETO, 1973; MARTINEZ, 2004), principalmente, as recentemente isoladas como desta pesquisa.

Embora vários estudos mensurando formas tripomastigotas de *T. cruzi* tenham sido realizados, como os de Ferrioli et al. (1968); Belda Neto (1973); Schlemper Jr et al. (1986); Martinez (2004) não foi proposta uma definição quanto aos critérios para a classificação dessas formas em largas, intermediárias e delgadas, ficando apenas as observações pessoais dos pesquisadores que as analisaram.

A análise dos valores médios obtidos com a mensuração das formas tripomastigotas captadas aleatóriamente de cada cepa mostrou, como características gerais,

cinetoplasto volumoso, de localização terminal ou subterminal, algumas formas com citoplasma vacuolizado, núcleo grande e arredondado, localizado no terço anterior, conferindo a essas um alto índice nuclear (IN).

Segundo Zeledon e Vieto (1958), citado por Ferrioli et al. (1968), haveria uma correlação entre o valor do índice nuclear médio e a virulência das cepas; as que apresentavam núcleo localizado em posição anterior, consequentemente, com valores altos do IN, seriam mais virulentas.

Esse fato apresentado por Zeledon e Vieto (1958) não foi confirmado com os resultados obtidos nesta pesquisa, uma vez que todas as cepas apresentam o núcleo em posição anterior, com IN médio variando de 1,75µm a 1,88µm, sendo que a cepa QM2 com IN médio de 1,81µm mostrou maior virulência para camundongos em comparação a cepa QJ3 com IN médio de 1,88µm. Ferrioli et al. (1968), Belda Neto (1973) e Martinez (2004) também não encontraram o IN médio influenciando na virulência das cepas, resultados confirmados por esta pesquisa.

Vários estudos também foram realizados numa tentativa de relacionar a largura das cepas de *T. cruzi* a uma determinada região geográfica, como os de Brener e Chiari (1963) e Schlemper Jr. et al. (1986) ao estudarem cepas isoladas da Região Sul do Brasil.

Apesar de esses autores acima citados relatarem que as cepas da Região Sul se caracterizavam por serem mais largas que as outras, os valores dessas medidas não são expressos.

Assim, ao comparar os resultados da largura média desta pesquisa com os de Belda Neto (1973) e Martinez (2004) nota-se que as cinco cepas apresentam predomínio de formas com larguras intermediárias conforme referido por Silva (1959), sendo observada apenas a presença de algumas formas largas e algumas delgadas.

Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que as características morfológicas do *T. cruzi* não possuem uma distribuição regional no país, tanto é que para Andrade (1974), o aparecimento de formas largas ou delgadas estaria relacionado com a rapidez com que ocorre a multiplicação parasitária e para Devera et al. (2002), que estudaram o biodema de cepas de *T. cruzi* de três áreas endêmicas do Estado de Minas Gerais, as formas largas são um achado comum em cepas de baixa virulência.

Ainda para Brener e Chiari (1963); Andrade (1974) e Pinto (2000) as formas tripomastigotas largas e intermediárias predominam nas cepas que são isoladas de humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres.

Com base na análise estatística realizada neste trabalho, onde vários paramêtros das cinco cepas foram comparados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de comprimento do flagelo, índice nuclear e largura.

As cinco cepas diferiram em relação ao comprimento do corpo, comprimento total, área do cinetoplasto, distância posterior-núcleo e distância anterior-núcleo.

Ferrioli et al. (1968) ao estudarem a morfologia de várias cepas de *T. cruzi* encontraram diferenças no comprimento total e índice nuclear (IN), referindo serem essas mensurações as mais importantes para caracterizar os tripanossomos.

Considerando que o comprimento total é obtido em função do comprimento do corpo e do comprimento do flagelo, observou-se pela análise estatística realizada nesta pesquisa, que as diferenças do comprimento total entre as cinco cepas estudadas, foram em função do comprimento do corpo, uma vez que não houve diferença estatísticamente significativa entre as mensurações dos comprimentos dos flagelos.

Semelhante ao comprimento total, observou-se em relação ao índice nuclear (IN), uma vez que este valor é calculado dividindo-se a distância P/N pela A/N. Assim, a análise estatística mostrou diferenças entre as mensurações das distâncias P/N e A/N isoladas, mas não no cálculo do IN, podendo-se inferir que esse valor está relacionado ao comprimento do corpo da cepa.

A mensuração do comprimento total médio obtido em cada uma das cinco cepas aqui estudadas variou de 18,89µm a 21,73µm, compatíveis com os resultados de Martinez (2004) ao estudar duas cepas de *T. cruzi* isoladas de *T. rubrovaria* da mesma região estudada neste trabalho, apesar de que uma análise estatística entre essas mensurações não tenha sido realizada para uma comparação mais acurada.

Embora os dados não permitam conclusões definitivas, o que chama a atenção é que a cepa QM2 que foi a mais virulenta para os animais, em todos esses paramêtros analisados foi diferente das demais, sem, no entanto poder-se afirmar que isso esteja relacionado com a virulência, pois ao comparar apenas os valores médios entre a cepa QM2 e os da cepa Y obtidos por Martinez (2004), não se observam valores em comum entre as mesmas, o que impossibilita relacionar esses resultados com virulência.

Dessa forma, pode-se confirmar as citações de Schlemper Jr. et al. (1986), onde a morfologia do *T. cruzi* é uma característica intrínseca do parasita.

Relacionando os resultados biológicos discutidos no item três deste capítulo, com os morfológicos aqui discutidos, segundo a classificação de Andrade (1985), pode-se enquadrar como tipo III as cepas QJ1, QJ3, QM1 e QB1, as quais apresentaram picos parasitêmicos ao redor do 30º dia, baixa virulência, predomínio de formas intermediárias e tropismo para músculo esquelético e cardíaco. A cepa QM2, onde encontramos picos parasitêmicos ao redor do 21º dia, predomínio de formas intermediárias, alta virulência e tropismo para músculo esquelético e cardíaco, como tipo II.

5.5 Caracterização genotípica

A caracterização genotípica realizada por eletroforese em gel de acrilamida a 8% corada com prata, após a reação de PCR com os primers D71 e D72 (SOUTO e ZINGALES, 1993), mostrou fragmentos de 110 pares de base para as cinco cepas isoladas.

Dessa forma, foi possível classificá-las genotipicamente como zimodema 1, linhagem 2, *T. cruzi* I, segundo Recommendations from a Satellite Meeting (1999), onde foram agrupadas as cepas relacionadas com o ciclo silvestre do *T. cruzi*.

Martinez e Rosa (2003) isolaram recentemente, duas cepas de *T. cruzi* de *T. rubrovaria* dessa mesma região do Estado do Rio Grande do Sul e denominaram QG1 e QG2. Essas cepas foram classificadas molecularmente segundo a técnica de Souto e Zingales (1993) como pertencentes à Linhagem 2, *T. cruzi* I por Martinez (2004), estando esses resultados de acordo com os obtidos neste trabalho.

Para Martinez (2004), esse fato já era esperado, por ser *T. rubrovaria* considerado um triatomíneo silvestre (BARRETTO, 1976), embora estudos recentes no Estado do Rio Grande do Sul, terem demonstrado um aumento da freqüência dessa espécie de triatomíneo no domicílio (ALMEIDA et al., 2000, 2002).

Vários autores isolaram e classificaram cepas de *T. cruzi* de mamíferos e triatomíneos silvestres na tentativa de encontrar características biológicas e moleculares comuns referentes ao ciclo silvestre e ciclo domiciliar do parasita.

Assim, Fernandes et al. (1997), isolaram 35 cepas de *T. cruzi* no Estado do Rio Grande do Sul, sendo 29 de pacientes chagásicos crônicos, duas de mamíferos silvestres e quatro de triatomíneos. Dessas quatro cepas de triatomíneos, duas foram isoladas de *T.*

infestans, que foram capturados no interior de moradias e duas de *P. megistus*, considerado triatomíneo silvestre.

Os autores acima, utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% corado com prata, que permitiu mostrar o perfil de RAPD (Random Amplification of Polimorphic DNA) das cepas isoladas. Desse modo, as cepas isoladas do *P. megistus* foram agrupadas no zimodema Z1, e as cepas isoladas dos pacientes, mamíferos silvestres e *T. infestans* nos zimodemas Z2 e ZB.

Fernandes et al. (1999) isolaram cepas de *T. cruzi* de mamíferos silvestres como marsupiais (*Didelphis marsupialis, Philander opossum*), primatas (*Leontopithecus rosalia*), roedores (*Holochilus brasiliensis*), edentata (*Bradipus torquatus*) e também de triatomíneos silvestres (*Rhodnius* sp e *T. vitticeps*) do Estado do Rio de Janeiro. Esses autores utilizaram para classificar as cepas isoladas, o espaço não transcrito do gene mini-exon, que foi amplificado por PCR segundo Souto et al. (1996). Os resultados mostraram que todas as cepas de *T. cruzi* isoladas dos primatas pertenciam à Linhagem 1, enquanto as isoladas dos outros mamíferos pertenciam às Linhagens 1 ou 2 ou 1+2.

As cepas isoladas dos exemplares de *Rhodnius* sp pertenciam a Linhagem 2, e a cepa isolada de *T. vitticeps* à Linhagem 1. Esse resultado chamou a atenção, pois apesar do *T. vitticeps* ser considerado um triatomíneo silvestre, ele estava albergando uma cepa de *T. cruzi* associada ao ciclo domiciliar do parasita. Segundo os autores a explicação para esse fato é que o *T. vitticeps* está envolvido com a transmissão do parasita para os primatas, e concluem que no Estado do Rio de Janeiro existe a presença das duas linhagens de *T. cruzi* infectando mamíferos silvestres em um mesmo ecótopo. Relatam ainda, que o fato de à Linhagem 1 estar melhor adaptada aos primatas poderia explicar o predomínio desta linhagem na infecção humana no Brasil.

Macedo et al. (2004) concordam com os relatos dos autores acima, referindo que o grupo *T. cruzi* II é aparentemente mais associado com os primatas e infecções humanas, enquanto *T. cruzi* I está mais adaptado aos marsupiais e é raramente isolado de humanos.

Como poucos estudos moleculares têm sido realizados com cepas isoladas de *T. rubrovaria*, semelhantes ao de Martinez (2004), e com resultados plenamente de acordo com os obtidos nesta pesquisa, não podemos descartar a hipótese de encontrar cepas pertencentes a Linhagem 1, *T. cruzi* II nos triatomíneos *T. rubrovaria* no Estado do Rio Grande do Sul.

6 CONCLUSÕES

1. A taxa de infecção natural em *T. rubrovaria* por Trypanosomatidae foi de 4,2% e 1,6% foram confirmados como *Trypanosoma cruzi*, entre os 309 exemplares examinados.

2. Os resultados da prova da precipitina demonstraram a presença desses triatomíneos no peridomicílio, alimentando-se de animais de criação da região e de humanos.

3. As cinco cepas isoladas mostram-se facilmente cultiváveis em meio LIT e em animais de laboratório.

4. Todas apresentam parasitemia patente.

5. As cepas QJ3 e QB1 apresentam parasitemia baixa, enquanto a QJ1 e QM1 média parasitemia e a QM2 alta parasitemia.

6. Em relação à morfologia, as cepas são semelhantes em largura e índice nuclear, diferindo no comprimento total, sendo a QM2 de menor tamanho.

7. O tropismo tissular mostrou que todas as cepas são patogênicas, com presença do infiltrado inflamatório em fígado, músculo esquelético e cardíaco na fase aguda e também em cólon na fase crônica. Os parasitas foram observados em músculo esquelético, cardíaco e fígado durante a fase aguda.

8. A caracterização fenotípica permitiu agrupar as cepas QB1, QJ1, QJ3 e QM1 como tipo III, e a cepa QM2 como tipo II.

9. A caracterização genotípica permitiu caracterizar as cepa QB1, QJ1, QJ3, QM1 e QM2 como *T. cruzi* I.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. A.; VINHÃES, M. C.; ALMEIDA, J. R.; SILVEIRA, A. C.; COSTA, J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p. 761-768, 2000.

ALMEIDA, E. A.; DUARTE, R.; NASCIMENTO, R. G.; PACHECO. R. S.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic resources and ecological observations of five populations collected in state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1127-1131, 2002.

ALVARENGA, N. J.; BRONFEN, E. Metaciclogênese do *Tripanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop,** v. 30, p. 247-250, 1997.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (contribuição ao estudo geral da doença de Chagas em nosso meio). **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, p. 65-121, 1974.

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

ANDRADE, V.; ANDRADE, S. G., BARRAL-NETTO, M.; PONTES, A. L.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 18, p. 143-154, 1985.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B**.** Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 30, p. 27-35, 1997.

ARAGÃO, M. B.; DIAS, E. Aspectos climáticos da doença de Chagas. I: considerações sobre a distribuição geográfica do *Triatoma infestans*. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 8, p. 633-641, 1956.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M.; MELO, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 36, p. 359-363, 2003.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Estatística para la investigación biomédica.** 3º ed. Madrid: Harcout e Brace, 1997, 593 p.

ARRUDA, M. V.; REINACH, F. C.; COLLI, W.; ZINGALES, B. Sequence of the 24 S α ribossomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 40, p. 35-42, 1990.

BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; COELHO, G. L. M.; LANA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic tripomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 35, p. 339-345, 2002.

BARRETTO, M. P. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.7, p. 305-315, 1965.

BARRETTO, M. P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 10, p. 339-353, 1976.

BARRETTO, M. P.; RIBEIRO, R. D. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypznosoma cruzi*. LXXVII: observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1941. **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v.41, p. 317-320, mai., 1981.

BARRETTO, A. C. P.; HIGUCHI, M. L.; LUZ, P. L.; LOPES, E. A.; BELLOTTI, G.; MADY, C.; STOLF, N.; ARTEAGA-FERNANDEZ, E.; PILEGGI, F. Comparação entre alterações histológicas da miocardiopatia da doença de Chagas e cardiomiopatia dilatada. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 52, p.79-83, 1989.

BELDA NETO, F. M. **Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909.** Araraquara, 1973. 76p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara.

BELDA NETO, F. M. & RIBEIRO, R. D. Estudo do comportamento da infecção experimental de subamostras do *Trypanosoma cruzi*, após passagem em cultura e em triatomíneo. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.11, p. 1-13, 1989.

BELDA NETO, F. M.; RIBEIRO, R. D.; ALBUQUERQUE, S.; ROSA, J. A. Considerações sobre o comportamento da infecção de camundongos por subamostras de *Trypanosoma cruzi*, através de inóculos diferenciados por via subcutânea e intraperitoneal. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.12, p. 141-149, 1990.

BENTO, D. N. C.; FARIAS, L. M.; GODOY, M. F.; ARAÚLO, J. F. Epidemiologia da doença de Chagas na zona rural do município de Tersina- Piauí, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.25, p. 51-58, jan/mar, 1992.

BRAND, T.; TOBIE, E. J.; KISSING, R. E.; ADAMS, G. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, v. 85, p. 5-16, 1949.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, p. 389-396, 1962.

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

BRUMPT, E. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Role regulateur dês hotes intermediaires. Passage à travers la peau. **Bull. Soc. Path. Exotique**, v. 6, p. 172-176, 1913.

CAMANDAROBA, E. L. P.; CAMPOS, R. F.; MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzimic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.34, p. 151-157, 2001

CAMARGO, E. P. Growth and differention in *Trypanosoma cruzi*.I. Origem of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, p. 93-104, 1964.

CAMPOS, E. S. Estudos sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. **An. Fac. Méd. São Paulo**, v. 2, p. 197-201, 1927.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 387-393, 1991.

CASTRO, M. A. P.; BRENER, Z. Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 18, p. 223-229, 1985.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. Sp., ajente etiolojico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Tripanosomíase americana- forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 37-59, 1916.

COURA, J. R.; BARRETT, T. V.; NARANJO, M. A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica?. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.,** v. 27, p. 251-253, out/dez, 1994.

CUBA-CUBA, C. A. Revisión de los aspectos bilógicos y diagnósticos el *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.,** v. 31, p. 207-220, mar-abr, 1998.

DEVERA, R.; ILLIRRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAÚJO, R.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Biodemas de cpas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 35, p. 323-330, 2002.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflafelados do gênero *Schizotrypanum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.38, p. 427-436, 1943.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 5, p. 48-74.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.,** v. 35, supl 3, p. 59-64, 2002.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C. Situação atual da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, supl 2, p. 19-21, 1996.

DI PRIMIO, R. Atual distribuição geográfica dos triatomíneos e seus índices de infecção no Rio Grande do Sul. **Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre**, v.17, p. 17-39, 1957.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B.; NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 13, p. 272-280, 1964.

FERNANDES, C. D.; MURTA, S. M. F.; CERÁVOLO, I. P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL, P. G.; STEINDEL, M.; NARDI,N.; ROMANHA, A.J. Caracterization 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.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. B. P.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am . J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 807-811, 1998.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A.P.; MOREL, C. M.; ZINGALES. B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. J. The complexity of the sylvatic cycle of *trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brasil) revelead by the non-transcibed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v.118, p. 161-166, 1999.

FERRAZ FILHO, A. N.; RODRIGUES, V. L. C. C. Distribuição e índice de infecção natural de triatomíneos capturados na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 20, p. 25-30, jan/mar, 1987.

FERRIOLI FILHO, F.; BARRETO, M. P.; CARVALHEIRO, J. R. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas. **Rev Soc. Bras. Med. Trop.,** v.2, p.1-8, 1968.

FINGER, J. A.; FONTOURA, V. S.; CALIXTO, L. C. **Quaraí: localização no Estado e vias de acesso**. [S. l.}, 2001. Disponível em: http://planeta.terra.com.br/educação/quaraí/localiza.htm. Acesso em 24/02/05.

FRANCA RODRIGUES, M.; LINDNER, C., SALVATELLA, R.; FERNÁNDEZ, R. L.; MOREIRA, L. P. Importância médica y ecologia de los triatomíneos de la República Oriental del Uruguay. **Res. J. Cienc. Nat**. v.1, p. 35-36, 1980.

FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; NUSSENZWEIG, V.; BARRETO, J. G. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. **Rev. Paul. Med.**, v. 40, p. 36-40, 1952.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO JÚNIOR, J. C. Estudos dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Rev Soc. Bras. Med. Trop.,** v.8, p.75-81, 1974.

GALVÃO, C.; JUBERG, J.; CARCAVALLO, R. V.; SEGURA, C. A. M.; GALINDEZ-GIRON, I.; CURTO de CASAS, S. I. Distribuição Geográfica e Dispersão Alti-latitudinal de Alguns Gêneros e Espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 33-37, 1998.

GONÇALVES, T. C. M.; ROCHA, D. S.; CUNHA, R. A. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, p. 348-52, 2000.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – na updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 435-442, 2003.

GURGEL-GOLÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTE, M. A.; PALMA, R. T.; ABAD-FRANCH(3), F.; CARRANZA, J. C.; CUBA-CUBA, C. A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the federal district of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.46, p.323-330, 2004.

HIGUCHI, M. L. Doença de Chagas. Importância do parasita na patogenia da forma crônica cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.64, p. 251-254, 1997.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estastística, disponível em http: www.ibge. gov.br. Acesso em 28/02/05.

LENT, H.; WYGODZNSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and significance as vectors of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. History,** v.163, p. 123-520, 1979.

LOPES, E. R. Resposta inflamatória na fase crônica da forma adquirida da doença de Chagas. **Rev. Pat. Trop.**, v. 31, p. 23-59, 2002.

LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; SANTOS, S. M.; PEREIRA, C. A; VINHÃES, M. C. Estudo do comportamento alimentar de algumas espécies de triatomíneos com auxílio da técnica de precipitina. **Entomol. y Vect.**, v. 6, p. 112-125, 1999.

LOROSA, E. S.; NUNES, I. M.; VINHÃES, M. C.; ANDRADE, R. E.; JUBERG, J. Preferência alimentar de algumas espécies de triatomíneos capturados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com o auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. **Entomol. y Vect.**, v.7, p. 211-225, 2000.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas'disease. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 119-124, 1998.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Struture of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 1-12, 2004.

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

MARTINEZ, I. **Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae) coletados em ambiente silvestre.** 98f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.

MARTINS, H. M. B.; ALVES, M.F. C.; SILVEIRA, L. A.; PFRIMER, I. A. H.; ANDRADE, S. G. Quadro histopatológico em camundongos isogênicos C3H/HeJ e C57BL/10 na fase aguda da infecção com cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas nas regiões central (Goiás) e sul (Rio Grande do Sul) do Brasil. **Rev. Pat. Trop.**, v. 26, p. 189-198, 1997.

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

MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C.; JANZI, E. Z. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre com enfermedad de Chagas. **Mepra**, v. 28, p. 41-46, 1936.

MEDINA-LOPES, M. D. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, p. 151-153, 1988.

MELLO, D. A. Roedores, marsupuis e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambaí- Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Saúde Pública**, S. Paulo, v. 16, p. 282-91, 1982.

MILES, M. A.; LANHA, M.,S., M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. Further enzimic character of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, p. 221-237, 1980.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

NEVES, D. P. Glossário. In. Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 3-5.

OKUMURA, M. Doença de Chagas experimental. In: Raia, A. A. **Manifestações digestivas da Moléstia de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1983. p. 33-59.

OLIVEIRA, E. C.; STEFANI, A. M. M.; LUQUETTI, A. O.; VÊNCIO, E. F.; MOREIRA. M. A. R.; SOUZA, C.; REZENDE, J. M. *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. **Rev. Soc. Bras. Med. São Paulo**, v. 26, p. 25-33, 1993.

PELLEGRINO, J. Transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e candidatos a doadores. **Rev. Bras. Med.**, v. 6, p. 297-301, 1949.

PINTO, F. H.; RIBEIRO, R. D.; BELDA NETO, F. M.; PRADO JÚNIOR, J. C. Estudo comparativo do cpmportamento da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Saúde Pública**, v. 20, p. 133-140, 1986.

PINTO, P. L. S. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo – Brasil. São Paulo, 2000. 139 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Píblica da Universidade de São Paulo.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v.1, p. 92-100, 2001.

QUARAÍ: números gerais. 2000/2004. Disponível em: http://www.citybrazil.com.br/rs/quaraí. Acesso em: 24/02/05.

RASSI, A. Clinica: fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, p: 249-264.

RECOMMENDATIONS from a satellite meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, supl 1, p. 429-432, 1999.

REICHE, E. M. V.; JANKEVICIUS, J. V. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. **Rev. Bras. Anál. Clín.,** v.29, p. 29-40, 1997.

RIBEIRO, R. D.; GARCIA, T. A. R.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; LOPES, R. A. Estudo da transmisão do *Trypanosoma cruzi* pelo *Psammolestes tertius*, considerado vetor secundário ou acidental do parasita, na natureza. **Rev. Ciênc. Farm.**, S. Paulo, v. 13, p.105-109, 1991.

RODRIGUES, V. L. C.; SILVA, R. A. Infecção natural por *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) em triatomíneos capturados no programa de controle da doença de Chagas do Estado de São Paulo, Brasil. . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 35, supl III, p. 191, 2002.

ROSA, J. A. **"Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1º e 5º estádio de *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemíptera, Rduviidae)".** 1995. 209f. Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; CILENSE, M.; BELDA NETO, F. M. Head morfhology of 1st and 5th instar nynphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). **Int. J. Insect Morphol. Embriol.**, v. 28, p. 362-375, 1999.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S.; SANTOS, J. L. F.; CILENSE, M. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemíptera, Reduviidae). **Rev. Saúde Pública**, v.34, p. 538-542, 2000.

RUAS-NETO, A. L.; CORSEUIL, E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Entomol. Vect.**, v. 9, p. 231-249, 2002.

SALVATELLA, R. Aspectos do ciclo evolutivo de *Panstrongylus tupynambai* Lent, 1942 (Hemíptera, Triatominae) em laboratório. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.,** v. 38, p. 7-10, 1986.

SALVATELLA, R.; CALEGARI,L.; PUIME, A.; BASMADJIAN, Y.; ROSA, R.; GUERRERO, J.; MARTINEZ, M.; MENDARO, G.; BRIANO, D.; MONTERO, C.; WISNIVESKY-COLLI, C. Perfil alimentario de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) en ámbitos peridomiciliarios, de una localidad rural de Uruguay. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36, p. 311-320, 1994.

SALVATELLA, R.; ROSA, R.; BASMADJIAN, Y.; PUIME, A.; CALEGARI, L.; GUERRERO, J.; MARTINEZ, M.; MENDARO, G.; BRIANO, D.; MONTERO, C.; WISNIVESKY-COLLI, C. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic enviroments of Uruguay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 325-328, 1995.

SANTOS-PEREIRA, S. M.; SANTOS, B. N.; SILVA-JÚNIOR, R.; SOUSA, M. A. Análise morfométrica dos cinetoplastos de epimastigotas de culturas axênicas de diferentes espécies de *Trypanosoma* de mamíferos e *Blastocrithidia triatomae*: comparação com *T. cruzi*. . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, supl I, p. 371, 2003.

SCHAUB, G. A.; BÖKER, C. A. Scanning electron microscopic studies of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the rectum of *Triatoma infestans* (Reduviidae). **J. Protozool.** v. 33, p. 266-270, 1986.

SCHLEMPER JR., B. R.; ÁVILA, C. M.; COURA, J. R.; BRENER, Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 16, p. 23-30, 1983.

SCHELEMPER JR., B. R.; STEIDEL, M.; GARGIONI, R.; FARIAS, C. J. M.; OLIVEIRA, R.; TRIANON, J. A. X. Reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* e suas relações com o domicílio humano na Ilha de Santa Catarina. **Arq. Cat. Med.**, v. 14, p. 91-96, jun, 1985.

SCHELEMPER JR., B. R.; ISHIDA, M. M.; STEIDEL, M.; GARGIONI, R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 191-198, 1986.

SCHUMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, p. 547-557, 1991.

SHIKANAI-YASSUDA, M.A; LOPES, M. H.; TOLEZANO, J. E.; UMEZAWA, E.; AMATO NETO, V.; BARRETO, A. C. P.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A. A. B.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A. A.; DUARTE, A.; ODONE, V.; CERRI, G. C.; SATO, M.; POSI, D.; SHIROMA, M. Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.32, p. 16-27, 1990.

SILVA, I. G. Influência da temperatura na biologia de Triatomíneos. I. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemíptera, Reduviidae). **Rev. Goiana Med.**, v. 31, p. 1-37, 1985.

SILVA-JÚNIOR, R.; RAMOS-DA-SILVA, A.; SOUSA, M. A. Co-manutenção *in vitro* e *in vivo* de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli* (Protozoa, Kinetoplastida): influência da cepa do parasita e da espécie do triatomíneo na seleção ou predomínio destas espécies. . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, supl I, p. 371, 2003.

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

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

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, supl 2, p. 11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C.; VINHÃES, M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, supl 2, p. 15-60, 1998.

SIQUEIRA, A. F. Estudos sobre a reação da precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 2, p. 41-53, 1960.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas'disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 35, p. 395-398, 1993.

SOUSA, O. E. Relationship beteween vector species and their vectorial capacity for certain strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Arg. Microbiol.**, v. 20, supl, p. 63-70, 1988.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequences. **Mol. Biochem. Parasitol.,** v. 62, p. 45-52, 1993.

SOUTO, R. P., FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major philogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 83, p. 141-152, 1996.

SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. M.; LIMA, J. A. N.; VALENTE, S. A. S. Epidemiolgia de um caso de doença de Chagas na Ilha do Mosqueiro-Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, p. 187-192, out/dez, 1988.

STEINDEL, M.; CARVALHO-PINTO, J. C.; TOMA, H. K.; MANGIA R. H.; RIBEIRO-RODRIGUEZ, R.; ROMANHA, A. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina State: first report of this Trypanosome in Southerm Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 73-79, 1991.

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

TOSTES JR., S.; LOPES, E. R.; PEREIRA, E. L.; CHAPADEIRO, E. Miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos CD4+ e dos CD8+ no exsudato inflamatório. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 27, p. 127-134, 1994.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patolojica da “Moléstia de Carlos Chagas”. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276-293, 1911.

VIEIRA, S. **Bioestatística: Tópicos avançados – Testes não –paramétricos, tabelas de contingência e análise de regressão.** Rio de Janeiro: Ed. Campus, 2003. 212p.

VILLANUEVA, A. O. N (coord.). **Gestão integrada de inundações na bacia hidrográfica do rio Quaraí/Cuareim (Brasil/Uruguai)**: recompilação das informações básicas existentes e diagnóstico preliminar (lado brasileiro). Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Disponível em: www.iph.ufrgs.br/pop_ups/recompilaçãoBrasil.pdf. Acesso em: 07 mar. 2005.

VINHÃES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16 , supl 2, p. 7-12, 2000.

WHO. Comité de Expertos de la OMS. **Control of Chagas disease.** Geneva. 2002. 106 p. (Série de Informes Técnicos, 905).

WILHELMS, T. M. S.; BEDIN, C.; TORRES, M. A.; ABBAD, P. R. S.; LIPPOLD, K. J. Experiência em melhoria habitacional para o controle da doença de Chagas no Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36 , supl 1, p. 367, 2003.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini exon gene sequences. **Int. Parasitol.**, v. 28, p. 105-112, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1. Medidas das 30 formas tripomastigotas sanguíneas obtidas aleatoriamente das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas, onde nº = número de ordenação; cflag = comprimento do flagelo; ccorpo = comprimento do corpo; ctotal = comprimento total, lcorpo = largura do corpo; acin = área do cinetoplasto; pn = distância posterior – núcleo; na = distância anterior – núcleo; in = índice nuclear.

Cepa	nº	cflag	ccorpo	ctotal	lacorp	acin	pn	na	in
	1	7,13	13,22	20,35	2,30	0,74	9,15	4,07	2,33
	2	7,08	13,51	20,60	1,55	0,86	8,69	4,82	1,80
	3	5,96	15,22	21,18	1,91	0,91	10,06	5,16	1,95
	4	10,05	14,35	24,39	1,92	0,93	9,11	5,24	1,74
	5	7,42	13,29	20,71	1,59	0,86	8,35	4,94	1,69
	6	7,69	13,62	21,31	1,51	0,68	8,48	5,14	1,65
	7	8,06	11,39	19,45	1,56	0,83	6,75	4,64	1,45
	8	6,07	13,31	119,39	1,69	0,91	8,33	4,98	1,67
	9	7,48	15,29	22,77	1,62	0,66	9,75	5,54	1,76
	10	9,04	14,27	23,31	1,62	0,90	10,25	4,02	2,55
	11	8,16	13,66	21,82	1,84	0,69	8,63	5,03	1,72
	12	6,85	12,61	19,46	1,27	0,90	7,46	5,15	1,45
	13	7,22	13,38	20,59	2,76	1,13	7,97	5,41	1,47
	14	8,58	12,30	20,87	1,66	1,10	8,46	3,84	2,20
QJ1	15	7,90	12,34	20,25	2,63	0,90	8,18	4,16	1,97
	16	5,78	13,22	18,10	1,59	0,90	7,26	5,07	1,43
	17	6,83	14,55	21,38	2,10	0,79	9,24	5,31	1,74
	18	5,47	10,90	16,36	1,69	0,86	6,75	4,15	1,63
	19	8,40	14,20	22,60	1,30	0,66	8,80	5,40	1,63
	20	6,31	14,17	20,48	1,56	1,10	9,18	4,99	1,84
	21	7,21	13,88	21,09	2,09	1,25	7,75	6,13	1,26
	22	8,24	13,84	22,08	2,32	1,57	8,71	5,13	1,70
	23	6,13	13,30	19,43	1,83	1,13	8,93	4,37	2,04
	24	5,19	13,39	18,57	2,06	1,20	8,66	4,73	1,83
	25	7,59	15,60	23,19	1,97	1,00	9,77	5,83	1,68
	26	8,08	13,77	21,85	1,95	0,98	8,94	4,83	1,85
	27	7,05	12,25	19,30	1,28	0,71	7,43	4,82	1,54
	28	8,75	13,70	22,44	1,52	0,69	8,87	4,83	1,84
	29	8,04	13,28	21,32	2,36	1,17	8,27	5,01	1,65
	30	7,24	15,56	22,80	1,74	0,69	9,54	6,02	1,58

ANEXO 1. Medidas das 30 formas tripomastigotas sanguíneas obtidas aleatoriamente das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas, onde nº = número de ordenação; cflag = comprimento do flagelo; ccorpo = comprimento do corpo; ctotal = comprimento total, lcorpo = largura do corpo; acin = área do cinetoplasto; pn = distância posterior – núcleo; na = distância anterior – núcleo; in = índice nuclear (Continuação).

Cepa	nº	cflag	Ccorpo	ctotal	lacorp	acin	pn	na	in
	32	8,15	12,99	21,13	1,63	0,83	7,98	5,01	1,59
	33	6,81	13,65	20,47	1,62	0,83	8,66	4,99	1,74
	34	7,23	13,32	20,55	1,66	0,83	8,20	5,12	1,60
	35	7,29	13,71	21,01	1,82	0,86	8,28	5,43	1,52
	36	7,37	14,99	22,37	2,08	1,08	9,05	5,94	1,52
	37	8,61	12,73	21,34	1,95	0,90	9,44	3,29	2,87
	38	7,86	11,55	19,42	1,61	1,12	6,59	4,96	1,33
	39	7,40	11,68	19,08	2,26	0,90	7,82	3,86	2,03
	40	7,20	12,03	19,23	1,44	0,93	7,52	4,51	1,67
	41	7,50	13,08	20,58	1,48	0,83	8,88	4,20	2,11
	42	8,02	13,85	21,87	2,32	1,27	8,80	5,05	1,74
	43	8,16	15,12	23,28	1,75	0,84	10,31	4,81	2,14
	44	8,09	14,51	22,60	1,81	0,96	9,18	5,33	1,72
	45	9,10	12,68	21,78	1,73	0,98	7,71	4,97	1,55
	46	6,36	14,11	20,80	2,18	1,10	8,85	5,59	1,58
QJ3	47	7,28	14,33	21,62	1,63	1,03	8,95	5,38	1,66
	48	7,96	15,09	23,05	1,79	1,12	10,45	4,64	2,25
	49	7,29	13,64	20,92	1,53	1,03	8,67	4,97	1,74
	50	7,86	16,47	24,33	2,02	1,18	11,82	4,65	2,54
	51	8,35	12,54	20,89	1,70	1,30	8,80	3,74	2,35
	52	9,42	11,67	21,08	1,46	1,18	7,71	3,96	1,95
	53	7,82	15,65	23,29	1,98	0,93	10,13	5,34	1,93
	54	7,89	12,65	20,54	1,82	0,81	8,65	4,00	2,16
	55	8,20	15,15	23,35	1,74	0,91	9,06	6,09	1,49
	56	7,80	14,99	22,79	1,98	1,18	9,86	5,13	1,92
	57	9,00	15,43	24,43	2,65	0,91	10,11	5,32	1,90
	58	7,95	15,59	23,53	2,21	0,90	10,10	5,49	1,84
	59	7,38	14,88	22,26	1,91	0,93	9,84	5,04	1,95
	60	7,21	14,54	21,75	1,96	0,93	10,08	4,46	2,26
	61	7,10	15,38	22,48	1,54	1,03	9,86	5,70	1,70

ANEXO 1. Medidas das 30 formas tripomastigotas sanguíneas obtidas aleatoriamente das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas, onde nº = número de ordenação; cflag = comprimento do flagelo; ccorpo = comprimento do corpo; ctotal = comprimento total, lcorpo = largura do corpo; acin = área do cinetoplasto; pn = distância posterior – núcleo; na = distância anterior – núcleo; in = índice nuclear (Continuação).

Cepa	nº	cflag	Ccorpo	ctotal	lacorp	acin	pn	na	in
	63	5,22	10,59	15,81	1,27	0,91	7,32	3,27	2,24
	64	8,79	11,21	20,00	1,39	1,20	7,70	3,51	2,19
	65	8,09	11,69	19,78	1,93	1,03	7,05	4,64	1,52
	66	7,67	11,18	18,85	1,17	0,90	7,86	3,32	2,37
	67	8,41	12,91	21,32	2,04	1,22	8,71	4,20	2,07
	68	7,53	11,68	19,21	1,49	0,79	7,48	4,20	1,78
	69	8,13	12,37	20,50	1,77	0,84	9,24	3,13	2,95
	70	8,78	14,62	23,39	1,92	0,79	9,26	5,36	1,73
	71	6,90	10,99	17,90	1,48	0,63	6,59	4,40	1,50
	72	9,24	15,02	24,26	2,13	0,74	10,03	4,99	2,01
	73	7,94	14,39	22,33	1,89	0,64	9,61	4,78	2,01
	74	7,55	16,31	23,86	1,84	0,95	9,44	6,87	1,37
	75	5,17	12,17	17,34	1,52	0,93	6,71	5,46	1,23
	76	7,17	16,74	23,91	1,90	0,93	10,21	6,53	1,56
QM1	77	7,61	15,08	22,69	1,40	0,88	10,07	5,01	2,01
	78	5,85	15,53	21,38	1,97	1,10	9,65	5,88	1,64
	79	7,76	16,83	24,59	1,82	1,01	10,61	6,22	1,71
	80	8,72	13,88	22,59	1,77	1,06	8,44	5,44	1,55
	81	5,25	10,98	16,23	1,45	0,73	6,50	4,48	1,45
	82	9,24	17,38	26,62	1,82	0,84	12,07	5,31	2,27
	83	7,96	15,82	23,79	1,92	1,00	10,38	5,44	1,91
	84	8,51	15,40	23,91	1,66	1,20	9,88	5,52	1,79
	85	9,32	13,81	23,13	1,74	0,90	9,40	4,41	2,13
	86	7,15	14,40	21,55	1,57	0,86	9,64	4,76	2,03
	87	5,04	13,44	18,49	1,45	0,74	8,51	4,93	1,73
	88	7,29	16,69	23,98	1,86	0,93	10,93	5,76	1,90
	89	6,23	14,13	20,36	1,22	0,98	7,82	6,31	1,24
	90	6,98	17,01	23,99	2,01	1,20	11,69	5,32	2,20
	91	6,37	14,31	20,68	1,55	1,01	8,57	5,74	1,49
	92	5,76	12,54	18,30	1,31	0,73	7,60	4,94	1,54

ANEXO 1. Medidas das 30 formas tripomastigotas sanguíneas obtidas aleatoriamente das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas, onde nº = número de ordenação; cflag = comprimento do flagelo; ccorpo = comprimento do corpo; ctotal = comprimento total, lcorpo = largura do corpo; acin = área do cinetoplasto; pn = distância posterior – núcleo; na = distância anterior – núcleo; in = índice nuclear (Continuação).

Cepa	nº	cflag	Ccorpo	ctotal	lacorp	acin	pn	na	in
	94	7,02	14,73	21,75	2,14	1,67	9,30	5,43	1,71
	95	5,25	13,33	18,59	1,58	0,88	8,10	5,23	1,55
	96	7,28	13,82	21,10	1,56	1,25	8,07	5,75	1,40
	97	7,20	13,05	20,25	2,11	1,10	8,97	4,08	2,20
	98	5,39	12,14	17,53	1,43	1,08	7,12	5,02	1,42
	99	5,37	11,56	16,93	1,38	0,71	8,09	3,47	2,33
	100	6,27	10,43	16,70	1,62	1,17	6,10	4,33	1,41
	101	5,91	10,97	16,88	1,77	1,29	6,97	4,00	1,74
	102	7,55	11,69	19,23	1,91	1,01	6,91	4,78	1,45
	103	7,73	11,42	19,15	1,86	0,41	7,49	3,93	1,91
	104	8,87	9,97	18,84	1,76	0,88	7,02	2,95	2,38
	105	5,61	11,34	16,95	1,71	1,12	7,07	4,27	1,66
	106	7,71	12,78	20,49	1,88	0,90	7,08	5,70	1,24
	107	6,04	12,52	18,57	1,79	1,42	7,01	5,51	1,27
	108	8,38	12,56	20,94	1,62	1,22	7,80	4,76	1,64
QM1I	109	6,78	12,13	18,92	1,71	1,05	6,73	5,40	1,25
	110	5,38	9,98	15,36	1,18	0,80	6,78	3,20	2,12
	111	7,40	11,14	18,54	1,43	0,95	7,88	3,26	2,42
	112	6,40	13,68	20,08	1,79	1,39	7,79	5,89	1,32
	113	7,15	12,76	19,92	2,13	1,03	7,26	5,50	1,32
	114	6,22	9,25	15,47	1,22	0,96	6,20	3,05	2,03
	115	8,90	12,61	21,51	1,49	1,78	8,94	3,67	2,44
	116	7,42	12,72	20,14	2,01	2,35	8,18	4,54	1,80
	117	6,71	12,33	19,04	1,71	1,67	8,63	3,70	2,33
	118	8,14	12,84	20,97	1,84	1,05	8,23	4,61	1,79
	119	8,30	11,83	20,13	1,73	1,20	8,44	3,39	2,49
	120	7,38	11,17	18,55	1,44	1,00	7,40	3,77	1,96
	121	8,32	11,07	19,39	1,35	0,93	7,25	3,82	1,90
	122	7,52	10,76	18,28	1,69	1,00	7,13	3,63	1,96
	123	6,52	10,08	16,59	1,53	1,32	6,51	3,57	1,82

ANEXO 1. Medidas das 30 formas tripomastigotas sanguíneas obtidas aleatoriamente das cinco cepas de *T. cruzi* isoladas, onde nº = número de ordenação; cflag = comprimento do flagelo; ccorpo = comprimento do corpo; ctotal = comprimento total, lcorpo = largura do corpo; acin = área do cinetoplasto; pn = distância posterior – núcleo; na = distância anterior – núcleo; in = índice nuclear (Continuação).

Cepa	nº	cflag	Ccorpo	ctotal	lacorp	acin	pn	na	in
	124	7,38	14,71	22,08	1,58	0,88	8,57	6,14	1,40
	125	8,82	14,18	22,99	1,93	0,98	9,46	4,72	2,00
	126	6,95	13,65	20,59	1,70	0,90	8,26	5,39	1,53
	127	7,79	13,22	21,00	1,84	1,01	7,62	5,60	1,36
	128	7,11	12,79	19,90	1,42	0,61	8,03	4,76	1,69
	129	5,21	13,85	19,06	1,56	0,54	7,62	6,23	1,22
	130	8,00	14,18	22,18	1,68	0,78	9,44	4,74	1,99
	131	7,73	10,72	18,45	1,92	1,17	7,50	3,22	2,33
	132	6,75	9,54	16,29	1,35	0,83	6,56	2,98	2,20
	133	10,05	12,87	22,92	1,85	0,93	8,12	4,75	1,71
	134	7,98	11,04	19,02	1,99	0,79	7,79	3,25	2,40
	135	6,67	12,24	18,92	1,85	0,56	7,92	4,32	1,83
	136	7,25	11,91	19,15	1,56	0,69	7,88	4,03	1,96
	137	7,60	12,02	19,62	1,65	0,46	7,92	4,10	1,93
	138	7,82	11,51	19,33	1,98	0,86	7,56	3,95	1,91
QB1	139	8,18	11,31	19,49	1,78	0,64	7,22	4,09	1,77
	140	7,70	10,62	18,31	1,80	0,84	7,45	3,17	2,35
	141	6,85	12,08	18,92	1,79	0,93	7,45	4,63	1,61
	142	7,62	12,80	20,43	1,66	0,86	8,45	4,35	1,94
	143	6,54	11,96	18,50	1,81	1,17	7,67	4,29	1,79
	144	6,93	13,06	19,98	1,94	1,05	8,36	4,70	1,78
	145	7,45	13,66	21,10	2,05	1,15	7,48	6,18	1,21
	146	7,40	13,90	21,30	1,86	1,01	8,95	4,95	1,81
	147	7,93	14,04	21,98	1,73	1,15	8,84	5,20	1,70
	148	7,53	10,44	17,97	1,50	0,64	6,33	4,11	1,54
	149	6,27	13,39	19,66	1,68	0,69	7,85	5,54	1,42
	150	6,98	12,46	19,44	1,63	0,68	7,64	4,82	1,59
	151	7,40	13,37	20,77	1,99	0,70	8,07	5,30	1,52
	152	9,25	13,73	22,98	1,83	1,07	8,69	5,04	1,72
	153	7,18	13,53	20,71	1,68	0,91	7,38	6,15	1,20

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
UNESP – CÂMPUS DE ARARAQUARA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909 (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) A PARTIR DE TRIATOMÍNEOS SILVESTRES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

LUCIAMÁRE PERINETTI ALVES MARTINS

ARARAQUARA – SP
2005

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo