

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

MARTA APARECIDA MORETO

**MORPHOLOGICAL VARIATION OF *Trypanosoma rangeli*
IN DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS**

São José dos Campos, SP

2007

MARTA APARECIDA MORETO

**“Variação Morfológica do *Trypanosoma rangeli*
em diferentes condições de cultivo”**

Dissertação apresentada no programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Oliveira

São José dos Campos, SP

2007

São José dos Campos, SP

2007

M249m

Moreto, Marta Aparecida.

Varição morfológica do *Trypanosoma rangeli* em diferentes condições de cultivo /
Marta Aparecida Moreto; Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Oliveira. São José dos
Campos, 2007.

1 Disco laser: Color

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1 Trypanosoma 2. *Trypanosomatidae*/classificação 3. Parasitologia I. Oliveira, Marco
Antonio de , Orient., II Título.

CDU: 576.8

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica,
desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:

Marta Aparecida

Data:

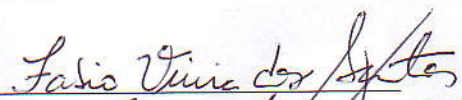
19/12/07

MARTA APARECIDA MORETO

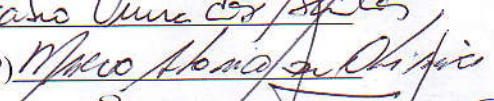
**“VARIÇÃO MORFOLÓGICA DOTRYPANOSOMA RANGELI EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

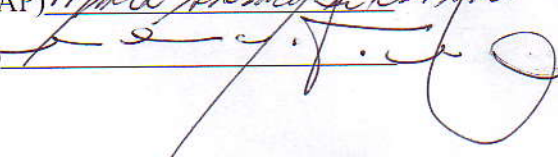
Prof. Dr. **FÁBIO VIEIRA DOS SANTOS** (UNIVAP)



Prof. Dr. **MARCO ANTONIO DE OLIVEIRA** (UNIVAP)



Prof. Dr. **MARCELO GIOVEDI FUNKE** (UNINOVE)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2007.

A DEUS

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tivesse amor, sou como bronze que soa, ou como um sino que tine. E ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e tivesse toda a fé, até o ponto de transportar montes, se não tivesse amor, nada seria”. (São Paulo)

Dedico este trabalho aos meus pais
Genoveva Spataro Moreto (*in memóriam*)
Luiz Moreto (*in memóriam*).

Ao meu marido, sem seu carinho,
dedicação, amor e respeito, com seu
apoio ilimitado, sempre meu porto
seguro, nada seria construído.

Aos meus filhos Luiz Henrique, Talita
e Felipe pelo carinho. A minha neta
Lívia que amo tanto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Oliveira pelos ensinamentos transmitidos, amizade e orientação constante na confecção deste trabalho.

A Prof^ª. Dra. Josane Mittmann, pela amizade, carinho, conhecimento e pelas conversas agradáveis.

A Prof^ª. Dra. Stella Regina Zamuner pela confiança, pelo respeito, e por todos os ensinamentos e conhecimentos, Stella você é uma pessoa maravilhosa.

A Prof^ª. Dra. Cristina Pacheco Soares, pela compreensão, paciência e apoio.

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, pelo exemplo de integridade e carinho. Todo o meu respeito.

A Ivone Paranaíba Vilela Monteiro, pela disponibilidade, sempre com uma palavra amiga e sincera, um sorriso e atenção, Ivone você me ajudou nos momentos mais difíceis nesta jornada sempre me apoiando e levantando o meu astral, Deus te abençoe.

A minha Mestra Professora Karla Andressa Ruiz Lopes, pela amizade, companheirismo, carinho, dedicação e conselhos, Karlinha você é uma pessoa maravilhosa e iluminada, aprendi muito com você.

Ao meu Mestre Professor Antonio Carlos Guimarães Prianti Junior, com todo carinho, respeito, amizade, pelas palavras de apoio, Toni você é maravilhoso.

Ao Cristiano de Cristo Gomes pelo apoio, pela ajuda, carinho, amizade, Cris você é uma pessoa abençoada por Deus.

Aos amigos Alexandre, Aline, Maíra, Fernanda, Kenia pela atenção, pela ajuda no laboratório, pelas conversas agradáveis, pelo apoio e paciência comigo. Muito obrigada.

Aqueles que direta ou indiretamente participaram deste estudo, muito obrigada.

Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanecia completamente por descobrir à minha frente.

Isaac Newton

MORETO, Marta Aparecida. **Variação morfológica do *Trypanosoma rangeli* em diferentes condições de cultivo.** 2007. 51 f. 1 CD-ROM. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

A família *Trypanosomatidae* pertence à ordem *Kinetoplastida* e compreende protozoários que se caracterizam pela presença de um único flagelo e de uma estrutura mitocondrial organizada. Os gêneros pertencentes a esta família parasitam animais vertebrados, invertebrados e plantas. No gênero *Trypanosoma* encontramos o *Trypanosoma rangeli* que é um protozoário não patogênico para o homem e apresenta diversas características relacionadas com o *Trypanosoma cruzi* que é patogênico ao homem, sendo: compartilhamento de vetores, hospedeiro o *Rhodnius prolixus*, distribuição geográfica e semelhanças antigênicas. Existem algumas características biológicas do *Trypanosoma rangeli* que permitem diferenciá-lo do *Trypanosoma cruzi*, como a sua provável incapacidade de invadir células de mamíferos, o seu desenvolvimento na hemolinfa e nas glândulas salivares dos triatomíneos e a sua transmissão ao hospedeiro vertebrado através da picada – via inoculativa. O objetivo desse estudo é a análise morfológica e morfométricas das cepas Choachí e SC-58 do *Trypanosoma rangeli*, cultivados no meio LIT (Liver Infusion Tryptose) em diferentes concentrações de hemina: 2,5mg/ml; 5,0mg/ml; 10mg/ml e 15mg/ml, nos dias 1; 3 e 6 após o inóculo dos parasitas. Foi digitalizado aproximadamente 50 campos microscópicos por lâmina, utilizando o microscópio Leica BLM equipado com câmara CCD com a interface Qwin. Os parâmetros analisados foram: comprimento celular médio; diâmetro dos parasitas; comprimento do flagelo livre; tamanho do cinetoplasto; diâmetro do núcleo dos parasitas e comprimento total dos parasitas. Os valores obtidos para cada parâmetro foi analisado utilizando os softwares Origin 6.0, com o qual se obteve os valores da média e desvio padrão para cada parâmetro. A comparação das médias entre os diferentes tratamentos foram realizadas com a aplicação do Test *t* de Student. Os resultados no presente estudo mostraram que os parasitas cultivados em meio LIT nas diferentes concentrações de hemina sofreram mudanças morfológicas. A principal mudança foi no tamanho total dos protozoários da cepa Choachí, causando uma redução estatisticamente significativa.

Palavras chave: *Trypanosoma rangeli*; Família *Trypanosomatidae*; Morfologia; Morfometria.

MORETO, Marta Aparecida. **Morphological variation of *Trypanosoma rangeli* in different cultivation conditions.** 2007. 51 f. 1 CD-ROM. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.

The *Trypanosomatidae* family belongs to *Kinetoplastida* order and comprehends protozoa which describe the presence of only one flagellum and an organized mitochondrial structure. The species of this family sponge vertebrate animals, invertebrates and plants. In the *Trypanosoma* specie we find the *Trypanosoma rangeli* which is a non pathogenic protozoon for the man. It presents several characteristics similar to the *Trypanosoma cruzi* which is pathogenic for the man like: vectors sharing, *Rhodnius prolixus* dwelling, geographical distribution and antigenic similarities. There are some biological characteristics of *Trypanosoma rangeli* that differentiate it from *Trypanosoma cruzi*, as its probable incapacity to invade mammals cells, its Hemolymph and Triatominae salivary glands development and its vertebral dwelling transmission through its bite – inoculative via. The purpose of this study is the morphology and morphometric analysis of Choachí cepa and SC-58 of *Trypanosoma rangeli*, cultivated in the LIT (Liver Infusion Tryptose) in different concentrations of hemine: 2.5 mg/ml; 5.0mg/ml; 10mg/ml and 15mg/ml, in the days 1, 3 and 6 after parasites inoculation. It was scanned approximately 50 microscopic fields per blade, using BLM Leica microscope equipped with camera CCD with the interface QWin. The studied parameters were: average cell length, parasites diameter; length of the free flagellum; kinetoplast size; parasites nucleus diameter and total length of the parasites. The values obtained for each parameter was analyzed using the Origin 6.0 software, with which the values of average and standard deviation for each parameter were obtained. The mean comparison between different treatments was done with the t-Student Test. The results presented on this work show that the cultivated parasites in LIT culture in different hemina concentrations make morphological changes on parasites. The main change was total size of protozoon of cepa Choachí, causing meaningful statistic reductions.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosomatidae* family, Morphology, Morphometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A: Forma tripomastigota de *T. Cruzi* em sangue de camundongo, B: Forma tripomastigota de *T. rangeli* em sangue de camundongo. Experimentalmente infectado, corado por Giemsa (aumento de 1.000x). (Grisard *et al.*, 1999).
.....21
- Figura 2** – Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.....23
- Figura 3** – Ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* no triatomíneo.....25
- Figura 4** - Mapa das Américas Central e do Sul mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992 (sombreado) e os relatos da presença do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (?). (Segundo Grisard e Steindel, 2004)28
- Figura 5** - A: Cepa Choachí 2,5 mg/mL (do inóculo), B: Cepa SC-58 2,5 mg/ml (do inóculo). Digitalizadas utilizando-se o microscópio Leica BLM32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – A família *Trypanosomatidae*.....16
- Tabela 2** – Demonstração de valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das cepas Choachí e SC-58, cultivados em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo na 2,5 mg/mL de hemina.....35
- Tabela 3** – Demonstração de valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros Comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das cepas Choachí e SC-58, cultivados em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo na 5,0 mg/mL de hemina.....36
- Tabela 4** – Demonstração de valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das cepas Choachí e SC-58, cultivados em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo na 10 mg/mL de hemina.....38
- Tabela 5** – Demonstração de valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das cepas Choachí e SC-58, cultivados em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo na 15 mg/mL de hemina.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC – Comprimento celular

CCB – Centro de Ciências Biológicas

D – Diâmetro

DP – Desvio Padrão

F – Flagelo

g – Grama

IMAGEJ – Image Processing and Analysis in Java

K – Cinetoplasto

l – Litro

LIT – Meio de Infuso de Fígado e Triptose (Liver Infusion Tryptose)

mg – Miligrama

MIP – Microbiologia e Parasitologia

mL – Mililitros

N – Núcleo

NEUBAWER – Neubauer Improved Chamber

ORIGIN 6.0 – Microcal Software Inc

pH – Potencial Hidrogeniônico

SBF – Soro Fetal Bovino

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

µl – Microlitro

µm – Micrômetro

\bar{X} - Média

x – Vezes

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 A família Trypanosomatidae..... | 14 |
| 1.2 Taxonomia..... | 16 |
| 1.3 Morfologia..... | 17 |
| 1.3.1 Aparência Externa..... | 17 |
| 1.3.2 Citologia..... | 17 |
| 1.3.3 Multiplicação..... | 18 |
| 1.4 Ciclo Vital..... | 18 |
| 1.4.1 Estágios de Desenvolvimento..... | 19 |
| 1.4.2 Ciclo no Mamífero..... | 20 |
| 1.4.3 Seção Salivaria..... | 20 |
| 1.4.4 Ciclo no Inseto..... | 20 |
| 1.5 <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> – semelhanças e diferenças..... | 21 |
| | |
| 2 OBJETIVOS..... | 29 |
| | |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.1 Cepas de <i>Trypanosoma rangeli</i> | 30 |
| 3.2 Cultivo de manutenção do <i>Trypanosoma rangeli</i> | 30 |
| 3.3 Cultivo dos parasitos nas condições experimentais..... | 31 |
| 3.4 Preparações dos esfregaços para acompanhamento das mudanças morfológicas do <i>Trypanosoma rangeli</i> cultivados na presença de diferentes concentrações de hemina..... | 31 |
| 3.5 Morfologia dos parasitos..... | 32 |
| | |
| 4 RESULTADOS..... | 33 |
| | |
| 5 DISCUSSÃO..... | 41 |
| | |
| 6 CONCLUSÃO..... | 45 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 46 |

1 Introdução

1.1 A família *Trypanosomatidae*

A família *Trypanosomatidae* pertence à ordem Kinetoplastida, e compreende protozoários que se caracterizam pela presença de um flagelo e de uma estrutura mitocondrial organizada na forma de maxi e mini-círculos de DNA denominada cinetoplasto (HONIGBERG *et al.*, 1964; LEVINE *et al.*, 1980).

Os gêneros pertencentes a esta família parasitam animais vertebrados, invertebrados e plantas, apresentando-se em diferentes formas: promastigotas, coanomastigotas, amastigotas, epimastigotas, opistomastigotas e tripomastigotas (Tabela 1). Estas formas são definidas de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, do ponto de origem do flagelo e em relação à ausência ou presença de flagelo livre e membrana ondulante. Os parasitas deste gênero podem ser classificados como monoxênicos, que possuem apenas hospedeiros definitivos ou heteroxênicos, que possuem hospedeiro intermediário e definitivo (Tabela 1) (HONIBERG *et al.*, 1964; LEVINE *et al.*, 1980).

A ocorrência de um ou mais estágios morfológicos durante o ciclo de vida destes protozoários, em combinação com o hospedeiro de origem, constitui a base para o estabelecimento dos vários gêneros da família (Tabela 1), que serão brevemente descritos a seguir, com base na classificação empregada por Honiberg e Levine.

Gênero *Blastocrithidia*: pertencem a este gênero os parasitas de insetos que se caracterizam pela presença de formas epimastigotas. A transmissão ocorre diretamente entre os hospedeiros através das fezes.

Gênero *Crithidia*: compreende organismos caracterizados por formas coanomastigotas, possuindo apenas insetos como hospedeiros (monoxênicos). O mecanismo de transmissão parece incluir um estágio de vida capaz de infectar as larvas dos hospedeiros.

Gênero *Endotrypanum*: é representado por flagelados heteroxênicos, parasitas de insetos flebotomíneos e mamíferos. Formas promastigotas e amastigotas são encontradas

nos insetos, enquanto nos mamíferos encontram-se as formas epimastigotas e tripomastigotas.

Gênero *Hepertomonas*: compreende flagelados que são parasitas de insetos. As formas opistomastigotas caracterizam o gênero, embora promastigotas e paramastigotas também ocorram em seu ciclo biológico. A transmissão ocorre por contaminação direta entre hospedeiros ou através de estágios de vida livre.

Gênero *Leishmania*: são incluídos neste gênero os flagelados que são parasitas de insetos flebotomíneos, nos quais são encontradas as formas promastigotas e paramastigotas, e vertebrados, onde se proliferam sob a forma de amastigotas intracelulares parasita heteroxênico.

Gênero *Leptomonas*: promastigotas são as principais formas observadas entre os organismos deste gênero, mas algumas espécies produzem também amastigotas, ou cistos flagelares. Parasitam uma grande variedade de insetos, além de nematóides e protozoários. A transmissão de inseto para inseto ocorre por contaminação direta com cistos.

Gênero *Phytomonas*: é representado por organismos heteroxênicos que possuem plantas e insetos como hospedeiro. Formas promastigotas são predominantes, mas encontram-se também em formas amastigotas. São transmitidos de planta para planta através de hemípteros.

Gênero *Rhynchoidomonas*: parasitas monoxênico pouco conhecido, apresentando-se sob formas tripomastigotas nos túbulos de Malpighi do inseto.

Gênero *Trypanosoma*: são constituídos por flagelados heteroxênicos que possuem como hospedeiros insetos triatomíneos e vertebrados. Nos primeiros, apresentam-se sob as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos e nos vertebrados apresentam-se como amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. Compreendem muitas espécies que parasitam mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Das espécies descritas, as consideradas patogênicas para o homem são o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma brucei*. De acordo com a via de transmissão eles são classificados em *Salivaria*, cujas formas metacíclicas são transmitidas por inoculação, e *Stercoraria*, cujas formas metacíclicas são eliminadas pelas fezes (exceto

o *Trypanosoma rangeli*). Estão agrupados na secção *Salivaria* os subgêneros *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* e *Pycnomonas*. Na secção *Stercoraria* estão os subgêneros *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*.

Tabela 1: A família *Trypanosomatidae*

| Ciclo Evolutivo | Gênero | Hospedeiro | Formas no ciclo evolutivo |
|-----------------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| Monoxênico | Blastocrithidia | Insetos | epimastigota |
| | Crithidia | Insetos | coanomastigota |
| | Hepertomonas | Insetos | promastigota/opistomastigota |
| | Leptomonas | insetos/nematóides | promastigota |
| | Rynchoidomonas | Insetos | tripomastigota |
| Heteroxênico | Endotrypanum | Insetos | epimastigota/tripomastigota |
| | | Vertebrados | amastigota/tripomastigota |
| | Leishmania | Insetos | promastigota |
| | Phytomonas | Vertebrados | amastigota |
| | | insetos/plantas | promastigota |
| | | Vertebrados | amastigota/tripomastigota |

Fonte: Honingberg *et al.*, (1964); Levine *et al.*, (1980)

1.2 Taxonomia

Todos os hemoflagelados pertencem à família *Trypanosomatidae*. Baseado no modo de transmissão, Hoare (1972) e Losos (1986) concordaram na divisão do gênero *Trypanosoma* em duas seções: *Salivaria* e *Stercoraria*. Os tripanosomas da seção *Salivaria* são aqueles transmitidos através das glândulas salivares (inoculativa), e os *Stercoraria* aqueles que são transmitidos por meio das fezes dos insetos vetores (contaminativa). Nessas revisões, esses autores concordaram também na divisão da seção *Salivaria* em quatro subgêneros (*Duttonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*) e a seção *Stercoraria* em três subgêneros (*Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*). Losos (1986) sugere uma classificação prática dos tripanosomas de importância médica e veterinária, como se segue:

Salivaria

Subgênero *Duttonella*

Espécie: *Trypanosoma vivax*

Subgênero *Nannomonas*

Espécies: *Trypanosoma congolense*, *T. simiae*

Subgênero *Trypanozoon*

Espécies: *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. evansi*
e *T. equiperdum*

Subgênero: *Pycnomonas*

Espécie: *Trypanosoma suis*

Stercoraria

Subgênero *Schizotrypanum*

Espécie: *Trypanosoma cruzi*

1.3 Morfologia

1.3.1 Aparência Externa

As formas tripomastigotas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas, o corpo é alongado e achatado. Ao corte transversal apresenta-se elíptico ou oval e suas extremidades são afiladas. A extremidade pela qual avança durante a locomoção é costumeiramente descrita como anterior final. Ela tipicamente termina em um fino ponto, enquanto que o final da extremidade posterior varia na forma, mas geralmente é mais larga, afilando mais abruptamente ou terminando em uma forma rombuda ou ainda apresentando a ponta arredondada (HOARE, 1972).

1.3.2 Citologia

As principais organelas de um tripanosoma são o núcleo, o cinetoplasto, o sistema mastigonte representado pelo corpo basal e o flagelo (HOARE, 1972).

1.3.3 Multiplicação

Em todos os casos a divisão dos tripanosomas se processa em uma seqüência definida envolvendo sucessivamente o corpo basal, flagelo, cinetoplasto e núcleo, culminando na clivagem do citoplasma (HOARE, 1972).

1.4 Ciclo vital

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas digenéticos, aqueles cujo ciclo vital envolve dois hospedeiros. Um destes, um animal vertebrado é o hospedeiro final, enquanto diversos invertebrados hematófagos representam os hospedeiros intermediários ou vetores, os quais transmitem a infecção para novos hospedeiros vertebrados. Na literatura, alguns autores preferem usar o termo “inoculadores mecânicos” ao invés de “vetores” para se referir a transmissão mecânica de tripanosomas (HOARE, 1972).

No caso de tripanosomas de mamíferos os vetores mais conhecidos são insetos hematófagos, embora outros invertebrados hematófagos podem também atuar como vetores. As formas sanguíneas dos tripanosomas são tomadas pelo inseto durante repasto sanguíneo. Após, então, os tripanosomas empreendem um ciclo de desenvolvimento no hospedeiro intermediário, culminando na produção de formas infectivas especiais, conhecidas como tripanosomas metacíclicos ou metatripanosomas. Os tripanosomas metacíclicos são transmitidos para um novo hospedeiro por vários métodos, de acordo com a sua localização no vetor. O sucesso na transmissão pode normalmente ser efetuado somente após o parasita ter completado seu ciclo de desenvolvimento no hospedeiro intermediário e produzido os metatripanosomas. Os estágios intermediários no vetor não são infectivos para o hospedeiro vertebrado (HOARE, 1972).

No caso da transmissão mecânica, as formas sanguíneas dos tripanosomas são transferidas diretamente de um mamífero, para outro, por insetos hematófagos (por exemplo espécies de *Tabanidae* e *Somoxidae*) ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado. No caso da transmissão mecânica com agulhas, pode-se dizer também que é uma infecção com ação de veículo. Em contraste com a transmissão cíclica, que pode ser tão longa quanto for a vida do vetor, a habilidade para transmitir os tripanosomas mecanicamente é de curta duração (geralmente mensuradas em minutos), dependendo da sobrevivência dos parasitas nas peças bucais do inseto (HOARE, 1972).

1.4.1 Estágios de Desenvolvimento

No curso de seu ciclo vital digenético os tripanosomas passam por vários estágios de desenvolvimento, os quais têm sido definidos por termos derivados do gênero dos *Trypanosomatidae* dos quais eles representam as formas mais típicas (HOARE, 1972).

A principal característica que distingue os estágios morfológicos dos *Trypanosomatidae* é a disposição do flagelo no corpo, como determinado pelo seu ponto de partida (indicado pela posição do Cinetoplasto), seu curso e ponto de emergência de sua porção distal livre. Desde então esta característica "flagelar" serviu como base para a classificação do estágio em questão. A raiz - mastigota é um termo grego que significa chicote (HOARE, 1972).

A terminologia abaixo citada é utilizada por Hoare (1972) e mundialmente aceita:

(a) AMASTIGOTA. Estágio "Leishmanial", representado por formas arredondadas ou alongada, sem flagelo livre.

(b) ESFEROMASTIGOTA. Arredondada ("Leishmanial") possuindo um flagelo livre; representando um estágio transitório entre as formas amastigota e mastigotas.

(c) PROMASTIGOTA. Estágio "Leptomonada", representado por formas alongadas com um cinetoplasto antenuclear. Flagelo aparecendo próximo ao cinetoplasto e emergindo no final da extremidade anterior do corpo.

(d) OPISTOMASTIGOTA. Estágio "Tripanomórfico", representado (somente no gênero *Herpetomonas*) por formas alongadas com cinetoplasto pós-nuclear. Flagelo aparecendo próximo ao cinetoplasto, então passando através do corpo e emergindo no final da extremidade anterior.

(e) EPIMASTIGOTA. Estágio "Critidial", representado por formas alongadas com cinetoplasto justanuclear. O flagelo aparece próximo ao cinetoplasto e emerge ao longo do corpo para correr ao longo da sua superfície ou ao longo da membrana ondulante.

(f) TRIPOMASTIGOTA. Verdadeiro estágio "Tripanosoma", representado por formas alongadas com cinetoplasto pós-nuclear. O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo para correr ao longo da sua superfície ou membrana ondulante.

(g) COANOMASTIGOTA. Estágio peculiar, geralmente com cinetoplasto antenuclear. O flagelo surgindo de um reservatório com formato de funil e emergindo no final da extremidade anterior do corpo (restrito ao gênero *Crithidia*).

1.4.2 Ciclo no Mamífero

O desenvolvimento dos tripanosomas nos hospedeiros mamíferos é relativamente simples. É iniciado pela introdução de metatripanosomas pelo inseto hospedeiro, ou passivamente pela contaminação de membranas mucosas do hospedeiro mamífero ou pele (no caso de espécies *Stercoraria* como o *T. cruzi*) ou ativamente pela inoculação através de uma picada no caso de espécies *Salivaria*, como por exemplo, *T. evansi* e *T. vivax* (HOARE, 1972).

1.4.3 Seção *Salivaria*

A reprodução desta seção normalmente toma lugar na corrente circulatória por fissão binária no estágio tripomastigota. Os tripanosomas da seção *Salivaria* também são capazes de invadir tecidos dos seus hospedeiros, sendo regular a ocorrência de amastigotas e outros estágios (HOARE, 1972).

1.4.4 Ciclo no Inseto

Os tripanosomas *Salivaria T. evansi* e *T. vivax* encontrados na América do Sul são apenas transmitidos mecanicamente. Devido a perda da habilidade de se desenvolver ciclicamente, *T. evansi* é também transmitido mecanicamente na África. O *T. vivax* africano é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé. As formas sanguíneas de tripanosomas do hospedeiro infectado são ingeridas pela tsé-tsé e localizadas no esôfago e faringe (MOLOO; GRAY, 1989) onde se transformam em formas epimastigotas. Depois de 24 horas as formas epimastigotas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam intensivamente e se localizam nas paredes do labro. As formas epimastigotas migram depois em direção à hipofaringe onde se transformam em formas tripomastigotas, e depois em formas infectantes, também chamadas “metatripanosomas” (MOLOO; GRAY, 1989).

1.5 *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* – semelhanças e diferenças

O *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 é um protozoário hemoflagelado, heteroxênico que infecta seres humanos e animais domésticos e silvestres. Sua distribuição geográfica é sobreposta a do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (agente etiológico da Doença de Chagas) encontrando-se na América Central e em vários países da América do Sul (Figura 1) (GRISARD *et al.*, 1999). Apesar de não ser considerado patogênico para o homem, o *Trypanosoma rangeli* induz resposta imune humoral com altos títulos de anticorpos, que apresentam reatividade cruzada com os antígenos de *Trypanosoma cruzi* empregados no diagnóstico da doença de Chagas (GUHL *et al.*, 1987; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; VASQUEZ *et al.*, 1997). O *Trypanosoma rangeli* e o *Trypanosoma cruzi* parecem ser semelhantes antigenicamente (AFCHAIN *et al.*, 1979; SALDAÑA; SOUZA, 1996; SALDAÑA, 1997). Além disso, também compartilham um grande número de reservatórios e vetores (De LEON, 1949, 1952; HOARE, 1972; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992, 1998; MILES *et al.*, 1983; CUBA CUBA, 1998; GRISARD *et al.*, 1999).

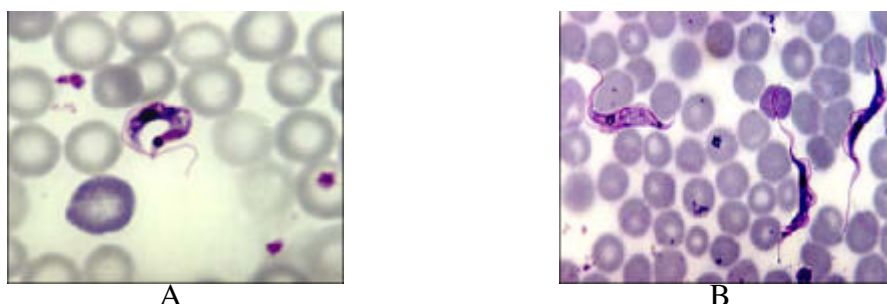


Figura 1. A: Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em sangue de camundongo, B: Forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo. Experimentalmente infectado e corado por Giemsa (aumento de 1.000x)
Fonte: Grisard *et al.* (1999).

Os tripanossomas são divididos em duas seções, Salivaria e Stercoraria, de acordo com sua via de transmissão (HOARE, 1972). A classificação do *Trypanosoma rangeli* é controversa pelo fato deste parasita apresentar características ambíguas. Atualmente, ele está incluído no subgênero *Hepertosoma* da seção Stercoraria (HOARE, 1972).

Os ciclos de vida destes dois parasitas apresentam diferenças entre si. Apesar de compartilharem vetores e hospedeiros, existem algumas características biológicas do

Trypanosoma rangeli que permitem diferencia-lo do *Trypanosoma cruzi*, como a sua provável incapacidade de invadir células de mamíferos, o seu desenvolvimento na hemolinfa e nas glândulas salivares dos triatomíneos e a sua transmissão ao hospedeiro vertebrado através da picada – via inoculativa (TOBIE, 1964; D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; STEINDEL *et al.*, 1994; GRISARD *et al.*, 1999).

No ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, as formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. No vetor, elas diferenciam-se em epimastigotas, que são formas proliferativas, multiplicando-se por fissão binária. Na porção terminal do tubo digestivo do inseto, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados juntamente com as fezes durante a alimentação do inseto. Os tripomastigotas metacíclicos, que são formas infectivas, penetram no hospedeiro vertebrado invadindo as células, onde se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados no meio extracelular e podem infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto vetor, dando continuidade ao ciclo (TOBIE, 1964; D’ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; STEINDEL *et al.*, 1994; GRISARD *et al.*, 1999).

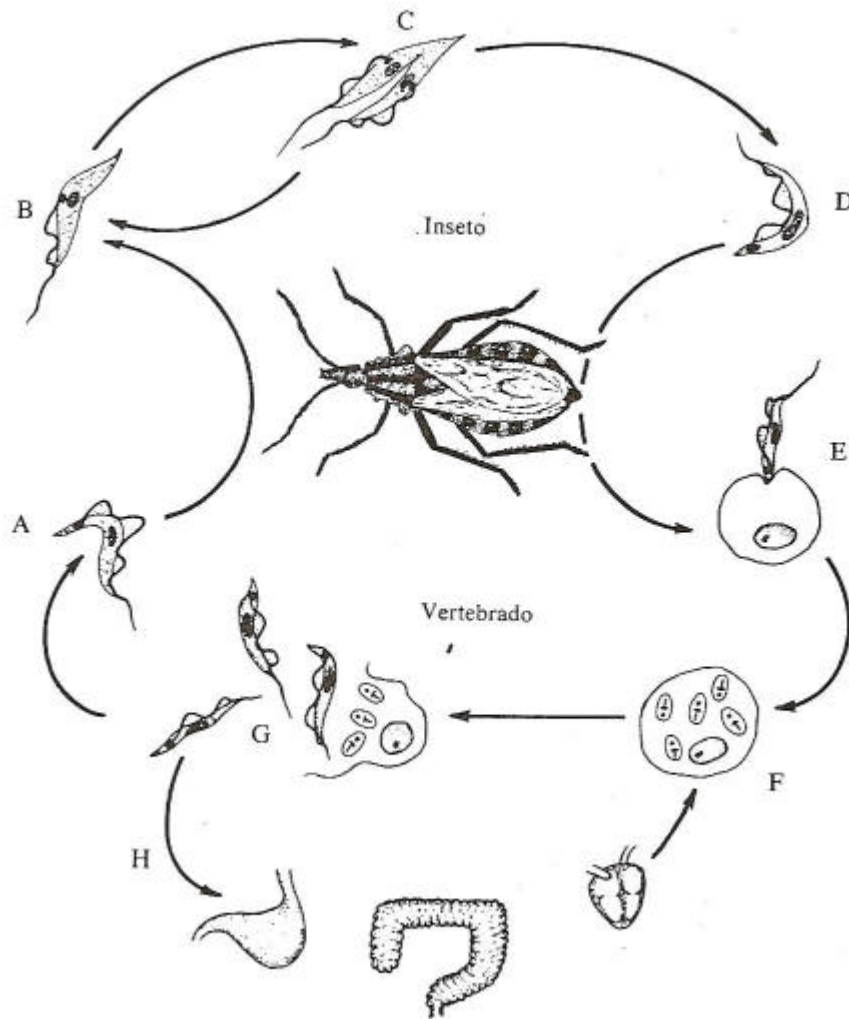


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

O barbeiro, ao picar um hospedeiro portador de *T. cruzi*, ingere juntamente com seu sangue formas tripomastigotas circulantes (A). No tubo digestivo do barbeiro os tripomastigotas se transformam em epimastigotas (B), que se dividem por divisão binária (C) e assim aumentam a população de flagelados no tubo digestivo do barbeiro. Depois de algum tempo de evolução os epimastigotas se transformam de novo em tripomastigotas, que se concentram nas partes terminais do tubo digestivo do inseto. Esses tripomastigotas são chamados metacíclicos (D). Ao picar um novo vertebrado, entre eles o homem, os barbeiros evacuem no momento da picada e depositam as fezes sobre sua pele ou mucosas. A partir daí os metacíclicos podem chegar às camadas subjacentes da pele e mucosas, onde são fagocitados por macrófagos (E), em cujo interior proliferam sob a forma de amastigotas (F). Os amastigotas abarrotam as células, rompem-nas e se libertam sob a forma de tripomastigotas (G) que ganham a circulação, sendo chamados tripomastigotas sanguícolas. Eles podem invadir novas células, inclusive de órgãos como o coração e intestinos e reiniciar o ciclo intracelular (H). Mas podem também ser ingeridos pelo barbeiro, dando início a um novo ciclo (A). (Adaptado, com permissão de D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992).

O ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* no vetor triatomíneo é bastante conhecido. A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Formas tripomastigotas são ingeridas, as quais no tubo digestivo do

inseto diferenciam-se em epimastigotas. Os epimastigotas invadem a hemocele (AÑEZ, 1983) e multiplicam-se no interior dos hemócitos ou livremente na hemolinfa. Seis dias após a invasão da hemocele, os parasitas começam a atravessar ativamente as paredes das glândulas salivares e alcançam o lúmem, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, sendo essas formas inoculadas com a saliva do triatomíneo no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (FIGURA 3). Ao contrário do ciclo evolutivo no vetor, o curso da infecção por *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro vertebrado até o presente momento não é bem elucidado. Nos primeiros dias após a infecção os parasitas são visualizados na circulação, e durante a primeira semana há um pequeno aumento na parasitemia que vai decaindo lentamente e, a partir do décimo quinto dia, os parasitas são detectados através de métodos indiretos, como xenodiagnóstico e hemocultura (AÑEZ, 1983).

Osório *et al.*, (1995), descreveram uma forma intracelular do parasita em experimentos com células promonocíticas de mamíferos em cultura de tecido, mas não detectaram divisão celular, e como não houve acompanhamento do ciclo completo do *Trypanosoma rangeli* nestas células, com liberação de formas tripomastigotas no sobrenadante da cultura, não há como considerar este resultado representativo do que ocorre *in vivo*.

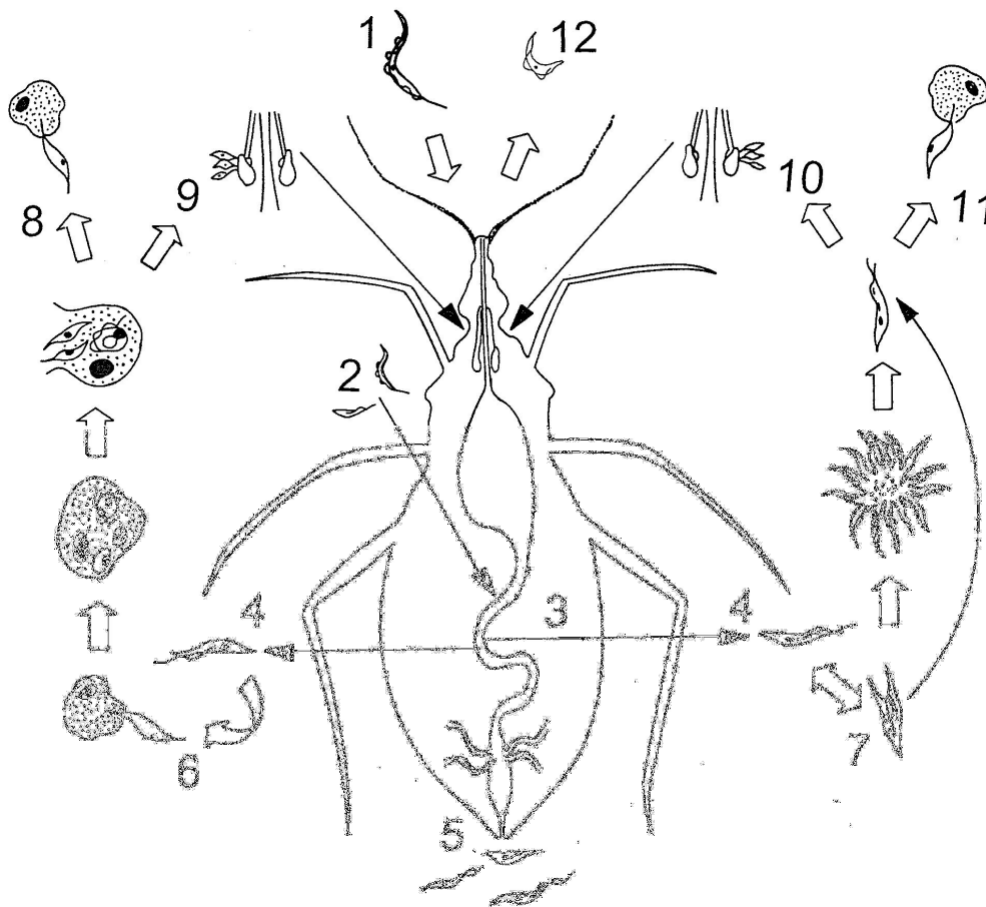


Figura 3: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma rangeli* no triatomíneo.

- (1) Infecção do triatomíneo pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto; (2) Após a ingestão, as formas predominantes no intestino médio são epimastigotas e tripomastigotas; (3) Formas epimastigotas escapam do intestino e alcançam a hemocele; (4) Formas do parasito são usualmente encontradas nas fezes; (5) Na hemolinfa, epimastigotas podem invadir e multiplicar-se dentro de hemócitos; (6) Ou dividir de forma livre na hemolinfa; (7) Não está comprovada se parasitos derivados da divisão intra-hemocitária podem invadir as glândulas salivares; (8) Ou mesmo reinfecar novos hemócitos; (9) Parasitos derivados da divisão extracelular são capazes de invadir e multiplicar-se dentro das glândulas salivares; (10) Também não é claro se esses parasitos são capazes de infectar hemócitos; (11) Metatripanossomas, (12) produzidos na luz das glândulas salivares são injetados com a saliva durante o repasto sanguíneo. (Adaptado, com permissão de D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1992).

Ao contrário do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero (SOUTO *et al.*, 1999), podendo ser detectado em aproximadamente 20 gêneros de animais distribuídos em 5 diferentes ordens (DEANE, 1958 a, 1958 b; D' ALESSANDRO, 1976; MILES *et al.*, 1983; STEINDEL *et al.*, 1991; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; SULLIVAN *et al.*, 1993; GRISARD *et al.*, 1999).

De Leon (1952) detectou pela primeira vez o *T. rangeli* em amostras de sangue humano enquanto estudava a doença de Chagas na Guatemala. Desde então, mais de 2.600 casos de infecção humana já foram descritos (D' ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; STEINDEL, 1993; GRISARD *et al.*, 1999).

Diferentemente do *T. cruzi*, cuja transmissão ocorre exclusivamente pelos dejetos de triatomíneos infectados (via contaminativa), o *T. rangeli* é transmitido pela picada de triatomíneos infectados (via inoculativa). A transmissão do *T. rangeli* através de formas presentes nas fezes é considerada possível, devendo, entretanto, ocorrer em uma frequência muito menor do que a transmissão anterior em condições naturais (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1992).

O tripomastigota sanguíneo é a única forma evolutiva do *T. rangeli* detectável no hospedeiro vertebrado. Esta forma do parasito apresenta características biológicas compatíveis com outras espécies do subgênero *Herpetosoma*. Os tripomastigotas apresentam polimorfismo, podendo ser observadas formas delgadas e largas medindo de 26 a 34 µm de comprimento, incluindo o flagelo. A membrana ondulante é bem desenvolvida, estando o núcleo localizado na metade anterior do corpo, e o cinetoplasto pequeno e puntiforme apresenta localização subterminal (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1992).

As espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* são os principais vetores naturais e experimentais do *T. rangeli*. Entretanto outras espécies como *Triatoma dimidiata*, *T. patagonica*, *T. protracta* e *T. infestans* também são capazes de transmitir o parasita em condições experimentais (D' ALESSANDRO, 1976; TOVAR, URDANETA-MORALES; TEJERO, 1989; STEINDEL *et al.*, 1991; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; STEINDEL, 1993; COURA *et al.*, 1996).

A infecção do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado é caracterizada, portanto, pela ausência de patogenicidade, ausência de formas em divisão nos tecidos e no sangue e pela limitada duração da parasitemia (D' ALESSANDRO, 1976). Como consequência da ausência de manifestações clínicas na infecção por *T. rangeli* e a falta de procedimentos adequados para o diagnóstico específico, acredita-se numa subestimação do número de casos humanos de

infecção pelo *T. rangeli* e, conseqüentemente uma possível superestimação nos casos de infecção pelo *T. cruzi* (SOUSA; JOHNSON, 1971).

Devido a esta grande similaridade, o diagnóstico da doença de Chagas em regiões onde o *T. cruzi* e o *T. rangeli* coexistem apresenta-se como um sério problema em função da ocorrência de resultados falso-positivos (GUHL; MARINKELLE, 1982; GUHL *et al.*, 1987; HUDSON *et al.*, 1992; ROSS; NOVOA-MONTERO, 1983; SALDAÑA *et al.*, 1993; SALDAÑA *et al.*, 1996 a, 1996 b; GRISARD *et al.*, 1999; VARGAS *et al.*, 2000).

Neste contexto, o correto diagnóstico da infecção chagásica e a identificação específica destes dois parasitas são extremamente relevantes tanto do ponto de vista social, terapêutico como epidemiológico (GUHL *et al.*, 1987; HUDSON *et al.*, 1992; ROSS; NOVOA-MONTERO, 1983; SALDAÑA *et al.*, 1993; SALDAÑA *et al.*, 1996 a, 1996 b; GRISARD *et al.*, 1999; VARGAS *et al.*, 2000).

Ao contrário do *T. cruzi*, a distribuição e a freqüência das infecções por *T. rangeli* em hospedeiros vertebrados e triatomíneos são pouco conhecidas. Até a presente data, os relatos de ocorrência do *T. rangeli* apresentam uma distribuição geográfica que se sobrepõe a do *T. cruzi*, estendendo-se do Sul do México até o Sul da América do Sul (Figura 4). Não há relatos da existência do *T. rangeli* no Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai (De LEON, 1949, 1952; HOARE, 1972; D' ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; CUBA, 1998; SOUTO *et al.*, 1999).

No Brasil, flagelados semelhantes ao *T. rangeli* foram inicialmente observados, através de suas características morfológicas, nas fezes de ninfas de *Panstrongylus megistus* (STEINDEL, 1993). O primeiro caso de infecção humana foi detectado em 1996 na região Amazônica (COURA *et al.*, 1996).



Figura 4 – Mapa das Américas Central e do Sul mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992 (sombreado) e os relatos da presença do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•).
Fonte: Grisard e Steindel, (2004).

2 OBJETIVOS

Com o objetivo de analisar a morfologia das cepas Choachí e SC-58 do *Trypanosoma rangeli*, cultivados no meio LIT em diferentes concentrações de hemina.

Acompanhar as mudanças morfológicas em diferentes concentrações de hemina: 2.5 mg/mL; 50 mg/mL; 10 mg/mL e 15 mg/mL, nos dias 1; 3 e 6 após o inóculo dos parasitas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Trypanosoma rangeli*

Foram utilizadas, no presente estudo, as cepas Choachí, originalmente isolada de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado, capturado no Estado de Cundinamarca, Colômbia (SCOTHELLIUS, 1987) e a cepa SC-58, isolada por hemocultura do roedor *Echymys dasythrix*, naturalmente infectado na ilha de Santa Catarina – Estado de Santa Catarina, Brasil (STEINDEL *et al.*, 1991).

Estas cepas encontram-se depositadas no criobanco do laboratório de Protozoologia no Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB/UFSC).

3.2 Cultivo de manutenção de *Trypanosoma rangeli*

A manutenção das formas epimastigotas das cepas Choachí e SC-58 de *Trypanosoma rangeli* foram cultivadas em meio LIT pH 7,2 (CAMARGO, 1964) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SBF) a 28°C em estufa bacteriológica. A cada intervalo de 7 dias as cepas eram sub-cultivadas no mesmo meio de cultura, os inóculos eram constituídos de 10% da cultura original.

Composição do meio LIT (Liver Infusion Tryptose)

| Componentes..... | g/l |
|---------------------------------------|--------|
| Infuso de fígado (Difco)..... | 5,00 |
| Triptose..... | 5,00 |
| NaCl..... | 4,00 |
| KCl..... | 0,40 |
| Na ₂ PO ₄ | 8,00 |
| Glicose..... | 2,00 |
| *Hemina..... | 0,66mL |
| ** Soro bovino..... | 100 mL |

pH 7,2 ajustado com HCl 2 N

* Previamente dissolvido em NaOH 0,1 N

** Inativado a 68°C por 1 hora

3.3 Cultivo dos parasitos nas condições experimentais

Para realização dos experimentos os protozoários foram obtidos a partir do meio de cultura padrão. O volume de meio a ser utilizado foi determinado a partir de uma contagem prévia dos protozoários.

Para o início do cultivo experimental foram semeadas em cada tubo a $1,0 \times 10^6$ células/mL. A concentração de protozoários foi determinada utilizando-se um hemocítômetro (câmara de Neubauer) partindo-se de uma diluição inicial de 1:100.

A partir do inóculo foram preparados esfregaços da cultura para determinação da morfologia inicial dos protozoários. Para tanto, em lâminas previamente lavadas, foram depositados 10 µl de meio contendo protozoários. Este volume de meio foi distendido sobre a lâmina de forma a criar um filme delgado, o qual foi seco ao ar. Em seguida, o esfregaço foi fixado com metanol puro por 1 minuto. Após, o excesso de líquido foi dispensado e adicionou-se sobre o esfregaço 3 mL de GIEMSA, que foi deixado por 20 minutos sobre o mesmo. O GIEMSA utilizado foi preparado a partir de uma solução estoque, previamente filtrada em papel Whatmann, a solução de coloração foi preparada adicionando-se 3 gotas de corante para cada mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2.

3.4 Preparações dos esfregaços para acompanhamento das mudanças morfológicas do *Trypanosoma rangeli* cultivados na presença de diferentes concentrações de hemina.

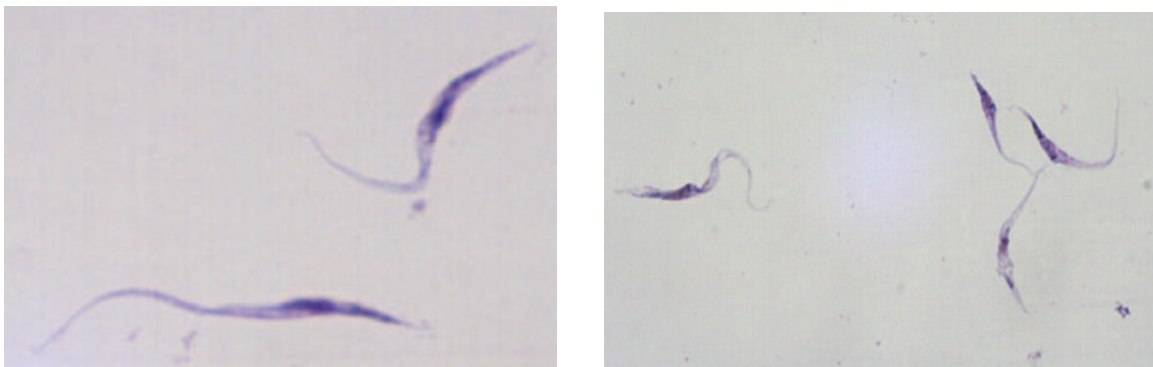
A fim de acompanhar as mudanças morfológicas ocorridas nos protozoários cultivados na presença de diferentes concentrações de hemina, preparou-se cultivo em duplicata contendo as seguintes concentrações de hemina: 2.5 mg/mL; 5.0 mg/mL; 10 mg/mL e 15 mg/mL.

Nos dias 1, 3 e 6 após o inóculos dos parasitas nos meios de cultivo, foram preparados os esfregaços em duplicatas, as quais foram corados como descrito anteriormente.

3.5 Morfologia dos parasitos

Para a determinação de parâmetros morfológicos dos protozoários foram digitalizados, aproximadamente 50 campos microscópios por lâmina, utilizando-se o microscópio Leica BLM equipado com uma câmera CCD com a interface QWin. A medição dos parâmetros foi realizada com o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os parâmetros mensurados foram os seguintes: Comprimento celular médio; diâmetro dos parasitas; flagelo livre; tamanho do cinetoplasto; diâmetro do núcleo dos parasitas e comprimento total dos parasitas (corpo + flagelo) (Figura 5).

Os valores obtidos para cada parâmetro foram analisados utilizando os softwares Origin 6.0, com o qual foram obtidos os valores de média e desvio padrão de cada parâmetro. A comparação das médias entre os diferentes tratamentos foi realizada aplicando o Teste *t* de Student. Os resultados foram apresentados como valores de média \pm desvio padrão.



A

B

Figura 5. A: Cepa Choachí 2.5mg/mL (do inóculo), B: Cepa SC-58 2.5mg/ml (do inóculo). Digitalizadas utilizando-se o microscópio Leica BLM.

4 RESULTADOS

Nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, a coluna “Dia 0” contém as medidas obtidas a partir dos parasitas cultivados em meio LIT com a concentração de Hemina padrão, antes do início de cada tratamento com as diferentes concentrações de hemina. Em nenhuma das condições empregadas nesse estudo foram detectadas alterações significativas nos parâmetros “tamanho do Cinetoplasto” e “diâmetro do Núcleo”. Após 1 dia de cultivo no meio contendo 2.5 mg/mL de hemina, os parasitas da cepa Choachí apresentaram uma redução significativa no comprimento celular, que ao final do experimento era de aproximadamente 13,21 μm . Com relação a cepa SC-58 não se observou o mesmo fenômeno, os valores continuaram próximo ao do início do experimento. Com 6 dias de cultivo os parasitas apresentavam um comprimento celular de aproximadamente 15,97 μm (Tabela 2).

Com relação ao diâmetro dos parasitas, observou-se um comportamento semelhante ao observado para o comprimento celular para a cepa Choachí, ou seja, os valores obtidos a partir dos parasitas antes de serem cultivados no meio com 2.5 mg/mL de hemina eram maiores que ao final do experimento. Da mesma forma que os valores obtidos para este parâmetro não variou significativamente para a cepa SC-58 (Tabela 2).

Para o comprimento do flagelo livre observou-se um comportamento oposto nas duas cepas, enquanto os valores deste parâmetro diminuíram para a cepa Choachí, os mesmos aumentaram para a cepa SC-58, variando respectivamente de 7,21 μm a 6,87 μm , e de 6,78 μm para 7,08 μm (tabela 2).

O comprimento total dos parasitas sofreu uma variação significativa, passando de 29,33 μm antes do início do cultivo para 24,53 μm no último dia de cultivo com 2.5 mg/mL de hemina.

Os parasitas da cepa Choachí cultivadas no meio contendo 5.0 mg/mL de hemina apresentaram uma redução significativa no comprimento celular de aproximadamente 13,20 μm . Com relação a cepa SC-58 os valores se mostraram significativamente diferentes variando respectivamente de 13,08 μm a 16,97 μm (Tabela 3).

Com relação ao diâmetro dos parasitas, observou-se um comportamento semelhante ao observado para o comprimento celular para a cepa Choachí, ou seja, os valores obtidos a partir dos parasitas antes de serem cultivados no meio com 5.0 mg/mL de hemina eram maiores que ao final do experimento. Da mesma forma que os valores obtidos para este parâmetro não variou significativamente para a cepa SC-58 (Tabela 3).

O comprimento do flagelo livre sofreu uma variação significativa, passando de 5,81 μm antes do início do cultivo para 7,09 μm no último dia de cultivo com 5.0 mg/mL de hemina. O mesmo pode-se dizer do observado para a cepa SC-58 (Tabela 3).

O comprimento total dos parasitas sofreu uma variação significativa, passando de 25,06 μm antes do início do cultivo para 20,29 μm no último dia de cultivo com 5.0 mg/mL de hemina.

Tabela 2– Demonstração dos valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das Cepas Choachí e SC-58, cultivadas em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo 2.5 mg/ml de hemina.

| | CHOACHÍ | | | | SC-58 | | | |
|----|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 |
| | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | ($\bar{X} \pm \text{DP}$) |
| CC | 22,12 \pm 6,17 ^a | 16,43 \pm 3,92 | 18,75 \pm 3,78 | 13,21 \pm 2,57 ^a | 15,63 \pm 4,09 | 17,25 \pm 4,02 | 19,44 \pm 4,73 | 15,97 \pm 3,04 |
| D | 2,12 \pm 0,72 ^a | 3,07 \pm 0,41 | 2,29 \pm 0,45 | 1,85 \pm 0,28 ^a | 2,36 \pm 0,40 | 3,29 \pm 0,64 | 2,79 ^a \pm 0,44 | 2,26 \pm 0,41 |
| F | 7,21 \pm 2,05 ^a | 7,71 \pm 1,83 | 7,10 \pm 1,35 | 6,87 \pm 1,53 ^a | 6,78 \pm 1,26 ^a | 7,24 \pm 3,12 | 7,73 \pm 1,41 | 7,08 \pm 1,75 ^a |
| K | 1,31 \pm 0,31 | 1,52 \pm 0,25 | 1,41 \pm 0,21 | 1,28 \pm 0,17 | 1,22 \pm 0,18 | 1,42 \pm 0,24 | 1,66 \pm 0,26 | 1,36 \pm 0,22 |
| N | 1,51 \pm 0,42 | 1,80 \pm 0,23 | 1,69 \pm 0,27 | 1,50 \pm 0,27 | 1,43 \pm 0,22 | 1,65 \pm 0,35 | 2,00 \pm 0,28 | 1,66 \pm 0,27 |
| C | 29,33 \pm 6,90 ^a | 24,14 \pm 4,90 | 25,85 \pm 4,13 | 20,08 \pm 4,10 ^a | 22,42 \pm 4,83 | 24,49 \pm 5,67 | 27,17 \pm 5,30 | 23,04 \pm 3,28 |

- \bar{X} = Média

- DP = Desvio Padrão

- Letras iguais são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 3 Demonstração dos valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das Cepas Choachí e SC-58, cultivadas em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo 5.0 mg/ml de hemina.

| | CHOACHÍ | | | | SC-58 | | | |
|----|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Dia 0 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 1 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 3 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 6 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 0 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 1 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 3 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) | Dia 6 ($\bar{X} \pm \text{DP}$) |
| CC | 19,25 \pm 5,12 ^a | 19,98 \pm 3,21 | 16,80 \pm 3,81 | 13,20 \pm 2,64 ^a | 13,08 \pm 3,45 ^a | 19,91 \pm 3,67 | 19,02 \pm 3,91 | 16,97 \pm 3,99 ^a |
| D | 2,47 \pm 0,47 ^a | 2,62 \pm 0,35 | 2,50 \pm 0,42 | 1,74 \pm 0,22 ^a | 2,36 \pm 0,40 ^a | 3,17 \pm 0,41 | 2,78 \pm 0,38 | 2,01 \pm 0,23 ^a |
| F | 5,81 \pm 1,45 ^a | 8,52 \pm 1,84 | 7,72 \pm 1,71 | 7,09 \pm 1,47 ^a | 6,78 \pm 1,26 ^a | 9,00 \pm 1,85 | 8,21 \pm 1,40 | 7,75 \pm 1,23 ^a |
| K | 1,30 \pm 0,19 | 1,25 \pm 0,18 | 1,50 \pm 0,27 | 1,13 \pm 0,10 | 1,22 \pm 0,18 | 1,37 \pm 0,17 | 1,58 \pm 0,27 | 1,27 \pm 0,14 |
| N | 1,51 \pm 0,19 | 1,53 \pm 0,20 | 1,77 \pm 0,26 | 1,25 \pm 0,16 | 1,43 \pm 0,22 | 1,70 \pm 0,33 | 1,89 \pm 0,32 | 1,45 \pm 0,17 |
| C | 25,06 \pm 5,70 ^a | 28,50 \pm 4,02 | 24,52 \pm 4,67 | 20,29 \pm 3,14 ^a | 22,42 \pm 4,83 | 28,91 \pm 4,50 | 27,22 \pm 4,14 | 24,72 \pm 4,48 |

- \bar{X} = Média

- DP = Desvio Padrão

- Letras iguais são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os parasitas da cepa Choachí cultivadas no meio contendo 10 mg/mL de hemina apresentaram uma redução significativa no comprimento celular de aproximadamente 13,03 μm . Com relação a cepa SC-58 os valores se mostraram significativamente diferentes variando respectivamente de 17,49 μm a 18,26 μm (Tabela 4).

Com relação ao diâmetro dos parasitas, observou-se um comportamento semelhante ao observado para o comprimento celular para a cepa Choachí, ou seja, os valores obtidos a partir dos parasitas antes de serem cultivados no meio com 10 mg/mL de hemina eram maiores que ao final do experimento. Da mesma forma que os valores obtidos para este parâmetro não variou significativamente para a cepa SC-58 (Tabela 4).

O comprimento do flagelo livre sofreu uma variação significativa, passando de 6,89 μm antes do início do cultivo para 7,06 μm no último dia de cultivo com 10 mg/mL de hemina. O mesmo pode-se dizer do observado para a cepa SC-58 (Tabela 4).

O comprimento total dos parasitas sofreu uma variação significativa, passando de 27,44 μm antes do início do cultivo para 20,06 μm no último dia de cultivo com 10 mg/mL de hemina.

Tabela 4 Demonstração dos valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das Cepas Choachí e SC-58, cultivadas em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo 10 mg/ml de hemina.

| | CHOACHÍ | | | | SC-58 | | | |
|----|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 |
| CC | 20,55 \pm 4,80 ^a | 20,09 \pm 3,26 | 15,97 \pm 3,04 | 13,03 \pm 2,71 ^a | 17,49 \pm 5,14 ^a | 19,77 \pm 3,72 | 18,48 \pm 2,98 | 18,26 \pm 5,03 ^a |
| D | 2,41 \pm 0,37 ^a | 2,30 \pm 0,48 | 1,66 \pm 0,27 | 1,88 \pm 0,20 ^a | 2,36 \pm 0,31 | 3,25 \pm 0,53 | 2,76 \pm 0,45 | 2,20 \pm 0,38 |
| F | 6,89 \pm 1,99 ^a | 8,25 \pm 2,03 | 7,08 \pm 1,75 | 7,06 \pm 1,47 ^a | 8,50 \pm 1,81 ^a | 8,62 \pm 1,80 | 7,98 \pm 1,51 | 9,16 \pm 2,04 ^a |
| K | 1,27 \pm 0,18 | 1,28 \pm 0,19 | 1,36 \pm 0,22 | 1,15 \pm 0,10 | 1,25 \pm 0,16 | 1,51 \pm 0,23 | 1,52 \pm 0,23 | 1,26 \pm 0,16 |
| N | 1,44 \pm 0,21 | 1,55 \pm 0,20 | 2,26 \pm 0,41 | 1,29 \pm 0,13 | 1,40 \pm 0,19 | 1,87 \pm 0,29 | 1,87 \pm 0,28 | 1,44 \pm 0,17 |
| C | 27,44 \pm 5,76 ^a | 28,34 \pm 4,27 | 23,04 \pm 3,28 | 20,06 \pm 3,12 ^a | 25,99 \pm 6,00 | 28,38 \pm 4,83 | 26,47 \pm 3,64 | 27,41 \pm 5,97 |

- \bar{X} = Média

- DP = Desvio Padrão

- Letras iguais são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os parasitas da cepa Choachí cultivadas no meio contendo 15 mg/mL de hemina apresentaram uma redução significativa no comprimento celular de aproximadamente 13,28 μm . Com relação a cepa SC-58 os valores se mostraram significativamente diferentes variando respectivamente de 18,04 μm a 17,51 μm (Tabela 5).

Com relação ao diâmetro dos parasitas, os valores obtidos antes de serem cultivados no meio com 15 mg/mL de hemina eram semelhantes ao final do experimento. Da mesma forma que os valores obtidos para este parâmetro variou significativamente para a cepa SC-58 (Tabela 5).

O comprimento do flagelo livre sofreu uma variação significativa, passando de 7,34 μm antes do início do cultivo para 6,93 μm no último dia de cultivo com 15mg/mL de hemina. Não se observou uma variação significativa para a cepa SC-58 (Tabela 5).

O comprimento total dos parasitas sofreu uma variação significativa, passando de 25,52 μm antes do início do cultivo para 20,20 μm no último dia de cultivo com 15 mg/mL de hemina.

Tabela 5 Demonstração dos valores médios, expressos em μm obtidos para os parâmetros comprimento celular (CC), diâmetro celular (D), flagelo livre (F), comprimento do cinetoplasto (K), diâmetro do núcleo (N) e comprimento total (C) das Cepas Choachí e SC-58, cultivadas em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo 15 mg/ml de hemina.

| | CHOACHÍ | | | | SC-58 | | | |
|----|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 | Dia 0 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 6 |
| CC | 18,18 \pm 4,82 ^a | 20,50 \pm 5,21 | 15,66 \pm 4,38 | 13,28 \pm 2,57 ^a | 18,04 \pm 4,39 ^a | 20,00 \pm 4,70 | 17,55 \pm 4,24 | 17,51 \pm 4,50 ^a |
| D | 1,82 \pm 0,27 | 2,60 \pm 0,65 | 2,24 \pm 0,32 | 1,83 \pm 0,22 | 2,70 \pm 0,51 ^a | 2,54 \pm 0,58 | 2,21 \pm 0,35 | 2,25 \pm 0,45 ^a |
| F | 7,34 \pm 1,94 ^a | 9,23 \pm 2,03 | 7,48 \pm 1,65 | 6,93 \pm 1,64 ^a | 9,20 \pm 2,23 | 8,71 \pm 1,90 | 8,12 \pm 1,72 | 9,13 \pm 1,38 |
| K | 1,12 \pm 0,12 | 1,46 \pm 0,30 | 1,37 \pm 0,21 | 1,15 \pm 0,11 | 1,29 \pm 0,18 | 1,46 \pm 0,32 | 1,26 \pm 0,18 | 1,35 \pm 0,22 |
| N | 1,28 \pm 0,20 | 1,88 \pm 0,43 | 1,66 \pm 0,26 | 1,30 \pm 0,17 | 1,50 \pm 0,23 | 1,73 \pm 0,32 | 2,21 \pm 0,35 | 1,54 \pm 0,26 |
| C | 25,52 \pm 5,81 ^a | 29,73 \pm 6,56 | 23,15 \pm 4,81 | 20,20 \pm 3,31 ^a | 27,24 \pm 5,36 | 28,70 \pm 5,52 | 25,68 \pm 5,25 | 26,64 \pm 5,22 |

- \bar{X} = Média

- DP = Desvio Padrão

- Letras iguais são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O *Trypanosoma rangeli* e o *Trypanosoma cruzi* são flagelados morfológicamente, biologicamente e bioquimicamente distintos, compartilham vetores do gênero *Rhodnius* e mamíferos reservatórios, principalmente marsupiais. Por isso a necessidade de sua correta identificação e diferenciação com o *T. cruzi* (D'ALESSANDRO, 1972).

Para este estudo foram utilizadas as cepas Choachí e SC-58 do *Trypanosoma rangeli* cultivados em meio LIT com a concentração de hemina padrão nos dias 1, 3 e 6 e após o inóculo, conforme tabelas 2, 3, 4 e 5, observou-se que em nenhuma das condições empregadas nesse estudo foram detectadas alterações significativas nos parâmetros tamanho do cinetoplasto e diâmetro do núcleo. Para a definição morfológica do cinetoplasto e núcleo as lamínas foram coradas com Giemsa. (D'ALESSANDRO, 1992).

Com os resultados obtidos no presente estudo pudemos analisar o estágio morfológico dos parasitas através da microscopia ótica e observamos: o núcleo, o cinetoplasto, o corpo celular alongado, o diâmetro e o flagelo livre. E através dessa observação vimos que a cepa Choachí teve redução significativa de tamanho nas concentrações de hemina: 2.5 mg/mL; 5.0 mg/mL; 10 mg/mL e 15 mg/mL. Lafont (1910) e Camargo (1999), chama a atenção para o fato de que a morfologia de tripanosomatídeos não é um caráter confiável para distinguir gêneros de tripanosomatídeos encontrados em plantas dos insetos.

É de conhecimento que as espécies do gênero *Rhodnius* são altamente suscetíveis a determinadas cepas de *T. rangeli*, poderíamos especular que o *Trypanosoma* como forma evolucionária, desenvolveu mecanismos para escapar de uma resposta imune do inseto, por outro lado o flagelado é capaz de degradar, inibir e resistir a diversos fatores antiparasitários na hemolinfa do inseto infectado.

Nossa intenção, a esse respeito, não é discutir profundamente a patogenicidade que o *T. rangeli* demonstra para o seu hospedeiro invertebrado, já que nossos estudos se limitam unicamente a observações morfológicas e morfométricas do *T. rangeli*.

Dados na literatura (D'Alessandro; Saravia, 1992) corroboram com os nossos resultados onde a avaliação dos parâmetros mensurados nos parasitas cultivados em meio LIT nas diferentes concentrações de hemina observou-se formas curtas, medias e alongadas dos parasitas medindo em média 26 µm, incluindo o flagelo livre, nas cepas Choachí e SC-58.

Na morfologia do *T. rangeli* podemos distinguir diferentes formas em seu hospedeiro vertebrado e invertebrado e por sua vez nos diferentes órgãos do inseto vetor. Na hemolinfa se encontram formas epimastigotas curtas, médias e largas, e tripomastigotas metacíclicas; também se observam formas em divisão longitudinal muito ativa, formas esferomastigotas e tripomastigotas; é freqüente encontrar a presença de numerosos hemócitos (CUBA, 1998). Nas glândulas salivares se encontra a maioria das formas tripomastigotas metacíclicas e no intestino formas largas de epimastigotas (AÑEZ, 1983).

Pessoa (1974) chama a atenção sobre a necessidade de uma correta identificação do tripanossomatídeo no caso de infecção mista, tendo em vista possível confusão com o *T. rangeli*.

Durante muitos anos vem utilizando-se os termos *T. rangeli*-like, tripanosomas semelhantes ao *T. rangeli* e também o tipo-*rangeli*, quando eram descritos os estudos basicamente morfológicos, flagelados em diversos hospedes vertebrados e em triatomíneos infectados naturalmente. D'Alessandro (1976) definiu claramente que para ser denominado um tripanosoma como o *T. rangeli*, se deve evolucionar na hemolinfa do triatomíneo, invadir suas glândulas salivares e ser transmitido pela picada no vertebrado suscetível. Todos estes são parâmetros biológicos considerados indispensáveis na identificação do parasito.

Devido a ocorrência simultânea de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* em vários países da América do Sul e América Central, estudos sobre a biologia do *Trypanosoma rangeli* são de maior importância (Guhl *et al.*, 1987; Hudson *et al.*, 1992). No contexto atual da capacitação dos recursos humanos e da infra-estrutura dos serviços de Saúde Pública os parâmetros de identificação morfológica e biológica, são de grande utilidade prática como elemento de identificação do *Trypanosoma rangeli*.

Os nossos resultados mostraram que através da análise morfológica e morfométrica a concentração de hemina presente no meio de cultura induz mudanças morfológicas nos parasitas cultivados no meio LIT.

Dessa forma, baseando-se no que foi apresentado até aqui, podemos afirmar que o *T. rangeli* constitui um modelo experimental de grande potência de exploração científica, em um completo campo do fenômeno da morfologia de um parasito protozoário digenético e nos estudos de imunidade celular de insetos.

6 CONCLUSÕES

A concentração de hemina presente no meio de cultura induz mudanças morfológicas nos protozoários cultivados em meio LIT.

A principal mudança foi observada no tamanho total do protozoário, que para todas as concentrações de hemina, causou uma redução estatisticamente significativa neste parâmetro.

Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros tamanho do cinetoplasto e diâmetro do núcleo nas cepas Choachí e SC-58, nas diferentes concentrações de hemina.

A cepa Choachí teve redução significativa de tamanho para todas as concentrações de hemina.

Referências

- AFCHAIN, D; LERAY, D; FRUIT, J; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J. Parasitology**, v.65, p. 507-514, 1979.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VI Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.77, n. 4, p. 405-415, 1983.
- ANTHONY, R. L; JOHNSON, C. M; SOUSA, O. E. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 969-973, 1979.
- CAMARGO, P. A. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 6, p.93-100, 1964.
- CAMARGO, E. P; KASTELEIN, P. and ROITMAN, I. Trypanosomatid parasites of plants (Phytomonas). **Parasitology Today**, v. 6, p. 22-25, 1990.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatids Parasites of plants and fruits. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1999.
- COURA, J. R; WILLCOX, H. P; ARBOLEDA NARANJO, M; FERNANDEZ, O; PAIVA, D. D. Chagas' disease in the Brazilian Amazon III. A cross sectional study. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** v. 37, p. 415-420, 1995.
- COURA, J.R; FERNANDEZ, O; ARBOLEDA NARANJO, M; BARRET, T. V; CARRARA, N; DEGRAVE, W; CAMPBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 278-279, 1996.
- CUBA CUBA, C. A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.
- D' ALESSANDRO, A. New experimental vectors of colombian *Trypanosoma rangeli*. **J. Med. Ent.**, v. 9, p. 187-195, 1972.
- D' ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R; EVANS, D. A. **Biology of the kinetoplastida**. London: Academic, 1976. v.1, p. 327-403
- D' ALESSANDRO, A; SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J.P.; BAKER, J.P. (ed.). **Parasitic protozoa**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 1-54.
- DEANE, L. M. Encontro de tripanosomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*, no Estado do Pará. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 10, p. 451-458, 1958a.

DEANE, L. M. Novo hospedeiro de tripanosomas do tipo *cruzi* e *rangeli* encontrados no Estado do Pará: o marsupial *Metachirops opossum opossum*. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 10, p. 531-541, 1958b.

De LEON, J. R. El *Trypanosoma rangeli* observado em seres humanos em Guatemala. **Publicaciones del Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de San Carlos de Guatemala**, n. 3, p. 32, 1949.

De LEON, J. R. Trypanosomiasis humana por el *Trypanosoma rangeli* en Guatemala. **Publicaciones del Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de San Carlos de Guatemala**. n. 8, p. 12, 1952.

GRISARD, E.C; STEINDEL, M; GUARNIERI, A. A; EGER-MANGRICH, I; CAMPBELL, D. A; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-209, 1999.

GRISARD, E. C; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: NEVES, Davis P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

GUHL, F; MARINKELLE, C. J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice Infected with *T. rangeli*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, p. 361, 1982.

GUHL, F; HUDSON, L; MARINKELLE, C; JARAMILLO, C.A; BRIDGE, D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection is a complication of Chagas disease. **Parasitology**, v. 94, p. 475-484, 1987.

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 228-314.

HONIBERG, B. M; BALAMUTH, W; BOVEE, E. C; CCORLISS, J. O; GODJICIS, M; HALL, R. P; KUDO, R. R; LEVINE, N. D. A revised classification of the structure and phylum protozoa. **J. Protozool.**, v. 11, p. 7-20, 1964.

HUDSON, L. *et al.* Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 96, p. 449-460, 1992.

LAFONT, A. Sur la presence d'un Leptomonas, parasite de la classe de Flagellés, dans le latex de trois *Euphorbiacées*. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v.4, p. 205-219, 1910.

LEVINE, N. D; CORLISS, J. O; COX, F. E. G; DEROUX, G; GRAIN, J; HONINBERG, B. M; LEEDALE., F; LOEBLICH, A. R; LOM, J; LYNN, D; MERINFELD, E. G; PAGE, F. C. A newly revised classification of protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, p.37-58, 1980.

LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938p.

MILES, M. A. *et al.* Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 6, p. 1251-1259, 1983.

MOLOO, S. K; GRAY, M. A. New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in Glossina. **Acta Tropica**, Basel, v. 4, p.167-172, 1989.

OSÓRIO, Y; TRAVI, B. L; PALMA, G. I; SARAIVA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitology**, v. 81, p. 687-693, 1995.

PESSOA, S. B; MARTINS, A. V. Trypanosomidae Gênero – *Trypanosoma*. *Trypanosoma (schizotripanun) cruzi* e moléstia de Chagas. In: PESSOA, S. B. **Parasitologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1974. p. 141-84.

ROSS, A; NOVOA – MONTERO, D. Comparability and reability of ELISA, Immunofluorescence and indirect hemmaglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **J. Infec. Diseases**, v. 168, p. 1581-1584, 1983.

SALDAÑA, A; OM, A; HENRYKSSON, J; SOUSA, O. E. Evaluacion de cuatro métodos inmunobioquímicos/moleculares em la identificación de cepas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. **Revista de Medicina de Panamá**, v.18, p. 41-52, 1993.

SALDAÑA, A; SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 363-366, 1996.

SALDAÑA, A; SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: crossreaction among their immunogenic components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 81-82, 1996a.

SALDAÑA, A; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 363-366, 1996b.

SALDAÑA, A. **Imunobiochemical significance of *Trypanosoma rangeli* in the study of *Trypanosoma cruzi***. Tese (Doutorado), The Karolinska International Research Training Program, Karolinska Institute, Estocolmo, Suécia, 1997.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop. Med. Parasit.**, v. 38, p. 323-327, 1987.

SOUSA, O. E; JOHNSON, C. M. Frequency and distribution of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the Republic of Panamá. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, n. 3, p. 405-410, 1971.

SOUTO, R. P; VARGAS, N; ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Experimental Parasitology**, v. 91, p. 306-314, 1999.

STEINDEL, M. *et al.* *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-79, 1991.

STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina.** 164f. 1993. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. 1993.

STEINDEL, M; DIAS NETO, E; CARVALHO PINTO, C. J; GRISARD, E. C; MENEZES, C. L. P; MURTA, S. M. F; SIMPSON, A. J. G; ROMANHA, A. J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J. Eukaryotic Microbiol.**, v. 41, p. 261-267, 1994.

SULLIVAN J.J; STAURER, F; BENAVIDES, R. L; TARLETON, R.L; EBERTHARD, M.L; LANDRY, S. Trypanosomes and microfilariae in feral owls and squirrel monkeys maintained in research colonies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, p. 254-259, 1993.

TEIXEIRA, S.M; Da ROCHA, W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet. Mol. Res.**, v. 2, n.1, p. 148-158, 2003.

TOBIE, E. J. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. **J. parasitology**, v. 50, n. 5, p. 593-598, 1964.

TOVAR, D; URDANETA – MORALES, S; TEJERO, F. *Trypanosoma*(*Herpetosoma*) *rangeli*, Tejera, 1920, study of the effects of the parasite on the vector. **Acta Cient. Venez.**, v. 40, p. 208-214, 1989.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, New York, v.18, p.124-193, 1966.

VARGAS, N. *et al.* Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, v. 96, p. 147-159, 2000.

VASQUEZ, J. E; KRUSNELL, J; ORN, SOUSA, O. E; HARRIS, R. A. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas Disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, p. 322-330, 1997.