

## OBSERVAÇÕES SÔBRE O CICLO EVOLUTIVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Luiz H. Pereira da SILVA (1)

### RESUMO

O autor procura esclarecer alguns pontos controvertidos do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, referentes ao significado do polimorfismo e ao determinismo evolutivo do parasita nas fases intra e extracelular do ciclo no vertebrado.

Realizando observações "in vitro" em sangue citratado de camundongos experimentalmente infectados com três cêpas diferentes de *T. cruzi* (Y, L e C), bem como no aparelho digestivo de triatomíneos, observou diferenças de comportamento entre os tripanosomas sanguícolas largos e os delgados em relação ao seu determinismo.

Obteve o ciclo completo do parasita a partir apenas de formas sanguícolas largas isoladas por micromanipulação e verificou a manutenção das características genéticas da morfologia da cêpa estudada, com o aparecimento de formas delgadas, intermediárias e largas no sangue periférico do camundongo inoculado apenas com largas.

Estuda o polimorfismo das formas sanguícolas do parasita, relacionando-o com o polimorfismo das leishmânias intracelulares observadas em cultivo de tecido. Em cultivo de tecido estuda, ainda, o processo de desenvolvimento dos tripanosomas a partir das leishmânias, confirmando a existência de um duplo processo de gênese dos tripanosomas no vertebrado.

### INTRODUÇÃO

Os trabalhos de CHAGAS<sup>3</sup>, HARTMANN<sup>16</sup>, VIANNA<sup>34</sup> e BRUMPT<sup>1</sup> estabeleceram em linhas gerais o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Certos aspectos desse ciclo permaneceram, entretanto, controvertidos até hoje, e o crescente número de observações contrariando pontos de vista clássicos tornou necessária desde há algum tempo uma revisão do problema.

Os pontos mais discutidos do ciclo do parasita referem-se à gênese e ao determinismo das formas em tripanosoma no vertebrado, ao significado do dimorfismo, ou melhor, do polimorfismo das formas sanguícolas, à origem das formas metacíclicas e à existência ou não de ciclo esquizogônico e

de processo sexuado na fase evolutiva nos triatomíneos.

De acôrdo com DELANÖE & DELANÖE<sup>8</sup>, as formas de tripanosoma originam-se no vertebrado a partir das leishmânias por um processo de alongamento, com crescimento do flagelo no sentido longitudinal e migração do cinetoplasto para a extremidade posterior do parasita, havendo uma fase intermediária de critídia. MAYER & ROCHA LIMA<sup>20</sup> descreveram, entretanto, outro mecanismo de gênese dos tripanosomas, a partir das leishmânias, por um processo de "desenrolamento": inicialmente o cinetoplasto se arredonda, migrando para a periferia, o flagelo se desenvolve contornando o corpo arredondado do elemento leishmaniforme, verificando-se depois vacuolização da região entre o cinetoplasto e o núcleo com posterior ruptura dessa região, formando-se uma incisura em V ou U e "desenrolando-se" então o tri-

Fac. Med. da Univ. São Paulo — Inst. Med. Trop. — Dep. de Parasitologia (Diretor: Prof. A. D. F. Amaral).

(1) Assistente.

O esclarecimento do determinismo genético das diversas fases do ciclo do parasita está, portanto, a nosso ver, na dependência de duas conquistas preliminares: 1) a de um meio de cultura sintético, correspondente aos meios difásicos atuais, no qual possam ser controlados os fatores determinantes das diversas transformações que ocorrem na luz do intestino dos triatomíneos; 2) no aperfeiçoamento dos métodos de cultivo de tecido infectado pelo *T. cruzi*, de modo a permitir a manutenção do mesmo com meios nutritivos também sintéticos e a exploração do metabolismo do parasita.

Esses objetivos preliminares não têm apenas um interesse direto para o esclarecimento do ciclo evolutivo do flagelado, mas um interesse biológico muito mais geral, qual seja o de permitir o estudo dos fenômenos de metamorfose e reprodução de protozoários. E, além do interesse puramente biológico, tem enorme alcance prático. O conhecimento do metabolismo do *T. cruzi* permitirá orientação segura na pesquisa de antimetabólitos eficazes, aliás já registrados por CASTELLANI & FERNANDES<sup>2</sup>, YONEDA & col.<sup>37</sup> e SILVA & col.<sup>38</sup>, podendo levar a melhores resultados na quimioterapia da doença de Chagas do que a pesquisa empírica de medicamentos ativos contra o *T. cruzi*, que até hoje não conduziu a resultados úteis.

\*

No presente trabalho reunimos algumas informações que obtivemos das observações que vimos realizando há alguns anos, sobre o ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

Abordamos, dentre os vários aspectos controvertidos do ciclo do parasita, um que nos despertou particular interesse: o problema do polimorfismo do *T. cruzi* no vertebrado. Procuramos estudar diferenças de comportamento biológico entre as formas de tripanosoma, relacionando o polimorfismo dos elementos sanguíneos com a morfologia das formas intracelulares e com o processo de gênese dos tripanosomas em cultivo de tecido.

Acreditamos que nossas observações possam ser úteis aos que se interessam pela questão, por focalizar certos aspectos da evolução do parasita e chamar a atenção para as técnicas que julgamos necessário desen-

volver para aprofundar o conhecimento do problema.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### *Estudo das formas sanguíneas do Trypanosoma cruzi*

O estudo das formas sanguíneas do *T. cruzi* foi por nós realizado com três cepas de origem humana. A cepa Y (SILVA & NUSSENZWEIG<sup>32</sup>), a cepa L e cepa C, todas isoladas por xenodiagnóstico de casos agudos da doença de Chagas, a primeira em 1950 e as outras em 1952. Desde então as mesmas vêm sendo mantidas em camundongos brancos de cerca de 1 mês de idade, por meio de repiques sucessivos cada 8 a 14 dias.

Para observação da evolução "in vitro" das formas sanguíneas, puncionamos o coração dos camundongos infectados com seringa de 1 ml, contendo 0,2 a 0,3 ml de solução de citrato de sódio a 3,8%; a mistura sangue-citrato era colocada em tubo de ensaio e deixada em temperatura ambiente ou em geladeira a 6°C.

Para a observação da evolução em triatomíneos, utilizamos ninfas do 5º estágio ou adultos do *Rhodnius prolixus*, criados em laboratório. Fazíamos os insetos sugarem camundongos altamente infectados e, após tempo determinado, procedíamos à dissecação de seu aparelho digestivo pela técnica descrita por DIAS<sup>9</sup>.

As amostras de sangue colhidas foram em todos os casos submetidas a exame a fresco, em microscópio de fase, com cerca de 800 aumentos, e após fixação pelo álcool metílico e coloração pelo May-Grünwald-Giemsa segundo a técnica de COTRIM & RAMALHO<sup>6</sup>.

Algumas experiências foram feitas no sentido de isolar formas delgadas e largas por micromanipulação. Para isso separávamos primeiramente as formas sanguíneas das hemácias e leucócitos, por centrifugação fracionada (MUNIZ & FREITAS<sup>24</sup>), obtendo suspensões muito ricas desses elementos que eram colocados em pequenas gotículas em câmara de óleo (FONBRUNE<sup>14</sup>) e depois isolados e injetados com microseringa na cavidade peritoneal de camundongos recém-nascidos, após ligeiro pique com tesoura,

obstruindo-se imediatamente o orifício, feita a inoculação, com uma gota de colódio.

### *Observações em cultivo de tecido*

A maior parte dessas observações foi feita em cultivo pelo processo clássico de CARREL, em gôta pendente, de fragmentos de miocárdio ou cérebro de embrião de galinha infectados pelo *T. cruzi*, de acôrdo com as técnicas de ROMAÑA & MEYER<sup>31</sup> e MEYER & OLIVEIRA<sup>22</sup>.

Utilizamos também duas cêpas de *T. cruzi*, a cêpa L, por nós adaptada ao cultivo de tecido diretamente a partir de formas sanguícolas de camundongos infectados, e uma cêpa gentilmente fornecida pela Srta. Hertha Meyer em fragmentos de embrião de *Gallus*, isolada a partir de cultura em N.N. e desde agosto de 1957 mantida em cultivo de tecido.

As observações "in vivo" do cultivo foram realizadas em microscópio de fase com 800 aumentos. Posteriormente as culturas eram fixadas "in totum" em Bouin e coradas pelo Giemsa.

Fizemos algumas tentativas de manutenção do *T. cruzi* em "HeLa cells" e em células de miocárdio de macaco, ambas as cêpas destas células fornecidas pelo Dr. Renato Piza Carvalho. A manutenção dessas células em nosso laboratório foi feita de acôrdo com as técnicas habituais, utilizando-se para a "HeLa" meio com 20% de sôro humano, 10% de solução de hidrolisado de lactalbumina a 5% e 70% de solução de Hanks; e para a célula de coração de macaco meio com a mesma constituição, substituindo porém o sôro humano por sôro de vitelo. A contaminação das culturas com o *T. cruzi* foi feita semeando-as ainda recém-preparadas com suspensão muito rica em formas sanguícolas lavadas e ressuspensas em solução de Hanks.

## RESULTADOS

### *Morfologia das formas sanguícolas*

As três formas de tripanosomas sanguícolas descritas ordinariamente foram por nós observadas no sangue periférico de camundongos jovens infectados. Julgamos que nas

preparações coradas o que mais caracteriza as formas delgadas é a posição relativamente afastada do cinetoplasto da extremidade posterior, o aspecto sinuoso do corpo do parasita, o flagelo livre curto e o núcleo difuso, representado por grânulos dispostos em faixa ocupando grande parte da região média do citoplasma e continuando-se muitas vêzes por uma série de grânulos, em geral dispostos em série linear até próximo à extremidade anterior do parasita (Fig. 1). Já nas formas largas o cinetoplasto é bastante próximo da extremidade posterior, o núcleo é ovóide e mais denso e o flagelo livre mais longo (Fig. 2). As formas intermediárias têm caracteres intermediários (Fig. 3).

Encontramos com relativa freqüência formas largas pequenas, medindo desde 13  $\mu$  de comprimento total e entre estas e as formas largas maiores que medem cerca de 20 a 22  $\mu$ , observamos tôda uma gama de variação. Nessas formas largas pequenas (Fig. 4) o que nos chamou a atenção foram a dimensão relativamente grande do núcleo, de aspecto mais difuso, em relação ao citoplasma e a forma em C fechado que geralmente apresentam. Sua freqüência aumenta nos surtos de ascensão da parasitemia.

A distinção dessas formas pode ser feita facilmente a fresco em microscópio de fase pelas dimensões e tipos de movimento. Foi aliás o método que utilizamos para contagens diferenciais. As formas delgadas apresentam um movimento direcional rápido deslocando-se com grande velocidade no campo microscópico. A agitação intensa do flagelo dá a impressão de um movimento vibratório do parasita, sendo a extremidade posterior rígida, pela situação mais afastada do cinetoplasto. As formas largas apresentam movimentos de agitação e contorção que atingem todo o comprimento do parasita mas êstes delocam-se pouco no campo microscópico, sem movimento direcional, a não ser quando a espessura do preparado é muito pequena, movendo-se então entre as hemácias em ondulações lentas.

As três cêpas de *Trypanosoma cruzi* com que trabalhamos, mantidas em camundongos, apresentam aspectos diferentes no que diz respeito à morfologia das formas sanguícolas. Numa delas, a cêpa Y, as formas delgadas são muito freqüentes no início da in-



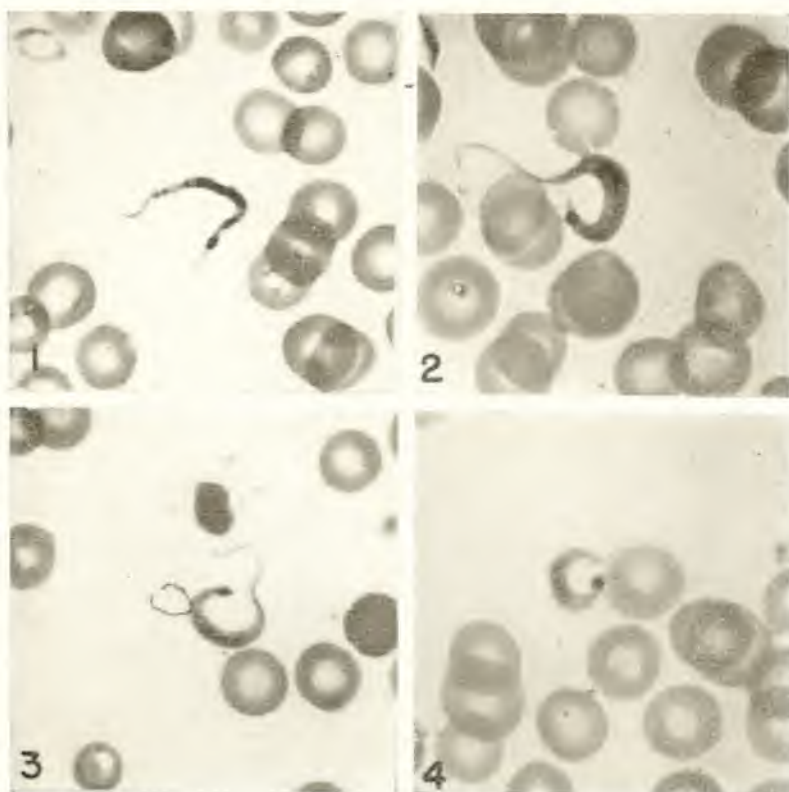


Fig. 1 — *Trypanosoma sanguicola* delgado. Sangue de camundongo infectado por *T. cruzi* — cêpa Y (x 1500).

Fig. 2 — *Trypanosoma sanguicola* largo. Sangue de camundongo infectado por *T. cruzi* — cêpa L (x 2000).

Fig. 3 — *Trypanosoma sanguicola* intermediário. Sangue de camundongo infectado pelo *T. cruzi* — cêpa Y (x 1500).

Fig. 4 — *Trypanosoma sanguicola* largo pequeno. Sangue de camundongo infectado pelo *T. cruzi* — cêpa L (x 2000).

fecção, predominando sôbre as formas intermediárias e largas, permanecendo em níveis elevados até depois do 10º dia a partir da inoculação, caindo a seguir gradativamente a níveis baixos mas sendo sempre encontradas, enquanto as formas largas, de início raras, vão aumentando em número no fim da infecção (Quadros I e II). Interessante é verificar que as formas intermediárias se apresentam também em níveis elevados enquanto as formas finas são abundantes caindo o seu número conjuntamente com o das formas delgadas.

Já nas cêpas L e C, as formas delgadas só surgem no início da infecção, em baixo número, ao lado de formas intermediárias mais abundantes, que permanecem mais tem-

po presentes no sangue. As formas largas predominam desde o início e depois de algum tempo são praticamente as únicas encontradas no sangue circulante (Quadros III e IV).

#### *Infecção em camundongo a partir de formas isoladas por micromanipulação*

Como foi visto acima, nas cêpas L e C, a partir de certa fase da infecção, a predominância de formas largas no sangue é quase absoluta. Torna-se fácil, portanto, o isolamento de formas largas porque o número de formas intermediárias, ou sôbre as quais se tem dúvida, é pequeno. Fizemos várias tentativas de inoculação de formas largas iso-

QUADRO I

Evolução da infecção de camundongos inoculados com *T. cruzi* (cêpa Y), quanto à proporção das diferentes formas sanguícolas — Repique 63YB

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de camundongos examinados	Nº de tripanosomas contados	Porcentagem de tripanosomas		
			finos	intermediários	largos
5	3	101	89	8	3
6	3	300	46,5	17	6,5
7	3	347	69	30	1
8	3	316	70	27	3
9	3	289	47	46	7
10	3	316	22	75	3
11	3	319	15	81	4
12	2	200	14	78	8

QUADRO II

Evolução da infecção de camundongos inoculados com *T. cruzi* (cêpa Y), quanto à proporção das diferentes formas sanguícolas — Repique 132YB

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de camundongos examinados	Nº de tripanosomas contados	Porcentagem de tripanosomas		
			finos	intermediários	largos
14	3	300	1	5	94
16	3	300	1	4	95
18	3	200	1	4	95
20	2	200	1	2,5	96,5

QUADRO III

Evolução da infecção de camundongos inoculados com *T. cruzi* (cêpa L), quanto à proporção das diferentes formas sanguícolas — Repique 70L

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de camundongos examinados	Nº de tripanosomas contados	Porcentagem de tripanosomas		
			finos	intermediários	largos
4	3	9	10	30	60
5	3	10	—	40	60
7	3	66	5	25	70
8	3	138	3	30	67
9	3	134	1	28	71
11	3	228	0,5	10	89,5
12	3	227	0,5	9	90,5
14	1	102	—	10	90
15	1	100	—	4	96

QUADRO IV

Evolução da infecção de camundongos inoculados com *T. cruzi* (cêpa C), quanto à proporção das diferentes formas sanguícolas — Repique 45C

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de camundongos examinados	Nº de tripanosomas contados	Percentagem de tripanosomas		
			finos	intermediários	largos
6	3	99	3	14	83
7	3	309	—	11	89
8	3	321	1	20	79
9	3	314	0,5	6,5	93
10	3	307	0,5	4,5	95
11	3	300	—	3	97
12	2	245	—	4	96
13	2	200	—	0,5	99,5
14	2	175	—	—	100
15	1	100	—	2	98
16	1	100	—	—	100

ladas com o micromanipulador de FONBRUNE e inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos recém-nascidos, mas só tivemos sucesso numa ocasião em que isolamos e inoculamos 180 tripanosomas seguramente largos. A infecção sanguínea no camundongo inoculado dêsse modo manifestou-se após período pré-patente de 12 dias e desenvolveu-se de acôrdo com o que se pode ver no Quadro V. Foram encontradas formas intermediárias e mesmo formas delgadas nos 17º e 21º dias da infecção. No 31º dia o camundongo foi sacrificado, o sangue colhido por punção cardíaca e inoculado em mais 3 ca-

mundongos de cêrca de 1 mês. A infecção desenvolveu-se com facilidade e a contagem diferencial das formas sanguícolas acha-se expressa no Quadro VI. Se compararmos os Quadros IV e VI, o primeiro representando a distribuição normal na cêpa C e o segundo representando a distribuição nas infecções obtidas a partir apenas de formas largas, veremos que são sensivelmente semelhantes, mostrando que foram mantidas as características genéticas da cêpa e que as formas delgadas podem se originar indiretamente das formas largas após ciclo tecidual.

QUADRO V

Evolução da infecção de camundongo inoculado com 180 formas largas de *T. cruzi* (cêpa C), isoladas por micromanipulação (1ª passagem)

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de tripanosomas contados	Percentagem de tripanosomas		
		finos	intermediários	largos
12	4	—	—	100
13	10	—	30	70
14	50	—	6	94
15	100	—	8	92
17	87	1,5	3,5	95
18	68	—	2	98
19	63	—	5	95
20	100	—	3	97
21	100	2	3	95

QUADRO VI

Evolução da infecção de camundongos inoculados com *T. cruzi* (cêpa C), quanto à proporção das diferentes formas sanguícolas — Camundongos infectados a partir de formas largas isoladas por micromanipulação (2ª passagem)

Nº de dias a partir da inoculação	Nº de camundongos examinados	Nº de tripanosomas contados	Porcentagem de tripanosomas		
			finos	intermediários	largos
6	3	108	—	12	88
7	3	196	0,5	8,5	93
8	3	265	2	20	78
9	3	250	—	2	98
10	3	257	—	5	95
11	2	200	—	1,5	98,5
12	2	200	—	1,5	98,5
13	2	200	—	2	98
14	2	200	—	2,5	97,5
15	2	200	—	2	98
16	1	100	—	1,5	98,5

O mesmo sucesso não tivemos com as formas delgadas. O isolamento de formas delgadas apresenta em nosso material maior dificuldade porque a predominância absoluta das mesmas só se faz no início da infecção da cêpa Y, quando a parasitemia é relativamente escassa, sendo então difícil reunir por isolamento individual no micromanipulador número suficiente de elementos para conseguir a infecção. Por outro lado, a existência de formas intermediárias dificulta a seleção, exigindo grande cuidado, o que prolonga a operação e pode afetar a vitalidade dos tripanosomas. Conseguimos assim inocular no máximo 63 formas delgadas na cavidade peritoneal de camundongos, sem que estes tivessem contraído infecção.

*Obtenção do ciclo completo a partir de formas largas*

Para verificar a possibilidade de se conseguir o ciclo completo no vertebrado e nos triatomíneos a partir das formas largas sanguícolas isoladas, realizamos a seguinte experiência:

Tomamos 2 grupos de 3 ninfas de *Rhodnius prolixus* de 5º estágio. Fizemos o primeiro grupo alimentar-se no camundongo que havia adquirido infecção a partir da inoculação de formas largas da cêpa C, isoladas

por micromanipulação. O segundo grupo de triatomíneos alimentou-se em um camundongo com cêpa C normal, que apresentava parasitemia de nível equivalente. Após 17 dias de manutenção dos insetos em estufa a 28°C inoculamos em camundongo o conteúdo intestinal dos mesmos diluído em salina contendo penicilina aquosa na concentração de 1000 U.O./ml.

Dois camundongos inoculados com conteúdo intestinal do primeiro grupo de triatomíneos adquiriram a infecção mas não puderam ser observados muitos dias, pois morreram precocemente, provavelmente por infecção bacteriana. Entretanto conseguimos verificar, após período pré-patente de 6 dias, no sangue dos animais inoculados, a presença de formas delgadas, intermediárias e largas, demonstrando-se a possibilidade de obtenção do ciclo completo do parasita a partir das formas sanguícolas largas.

Os camundongos inoculados com o conteúdo intestinal do segundo grupo de triatomíneos contraíram a infecção que pôde ser acompanhada até o 21º dia a partir da inoculação. Foi curioso então observar que as formas delgadas se apresentaram em proporção relativamente elevada no início da infecção, atingindo mesmo 55% do total no 9º dia, contrastando nitidamente com o normalmente observado na cêpa. Depois do



12º dia a distribuição das formas sanguíneas tornou-se igual à habitualmente observada, assim permanecendo até o fim da infecção por morte dos camundongos.

#### *Determinismo evolutivo das formas sanguíneas*

A. — *Evolução das formas largas "in vitro" em sangue citratado.* — Foram feitas três experiências com a cêpa L e uma com a cêpa Y, observando-se periodicamente a fresco e em preparações coradas, de 0 até 94 horas. Nas três experiências com a cêpa L as formas largas no sangue predominavam de forma absoluta, enquanto na experiência com a cêpa Y representavam 64% do total. Numa das experiências, parte do material foi mantido a 6°C em geladeira. De resto o material foi mantido em temperatura ambiente do laboratório.

Observamos com constância a evolução das formas largas para elementos critidiformes e leishmaniformes. Essa evolução pode ser acompanhada a fresco e caracteriza-se, como já foi assinalado por CHAGAS, BRUMPT, DIAS e ELKELES pelo alargamento da porção anterior, migração do cinetoplasto para posição justa-nuclear ou anterior e encurtamento do flagelo livre. O flagelo aparentemente se espessa nesse processo de encurtamento. A extremidade posterior do parasita se arredonda enquanto a anterior permanece afilada. A movimentação dos flagelados vai diminuindo e, quando a transformação para elemento critidiforme se completa, o movimento é lento, fazendo-se à custa da membrana ondulante e do curto flagelo livre, desaparecendo praticamente as contrações do corpo do parasita. Existe grande tendência à aglomeração das formas, quer entre si, quer a hemácias ou aglomerados de plaquetas.

Estas transformações se iniciam precocemente; observações com 6 horas mostram já as formas largas com movimentos mais lentos e tendência à aglomeração. Nas preparações coradas vemos que com 16 horas a maioria dos tripanosomas já evoluiu para elementos critidiformes, embora o cinetoplasto permaneça arredondado como o dos tripanosomas. Nas preparações com 48 horas na maioria dos elementos nota-se a transformação do cinetoplasto que toma a forma

de bastonete semelhante ao das critídias (Fig. 5).

As pequenas formas largas parecem ter a mesma capacidade evolutiva que as formas grandes. Pudemos observar nelas as mesmas fases de evolução resultando elementos critidiformes e leishmaniformes também menores.

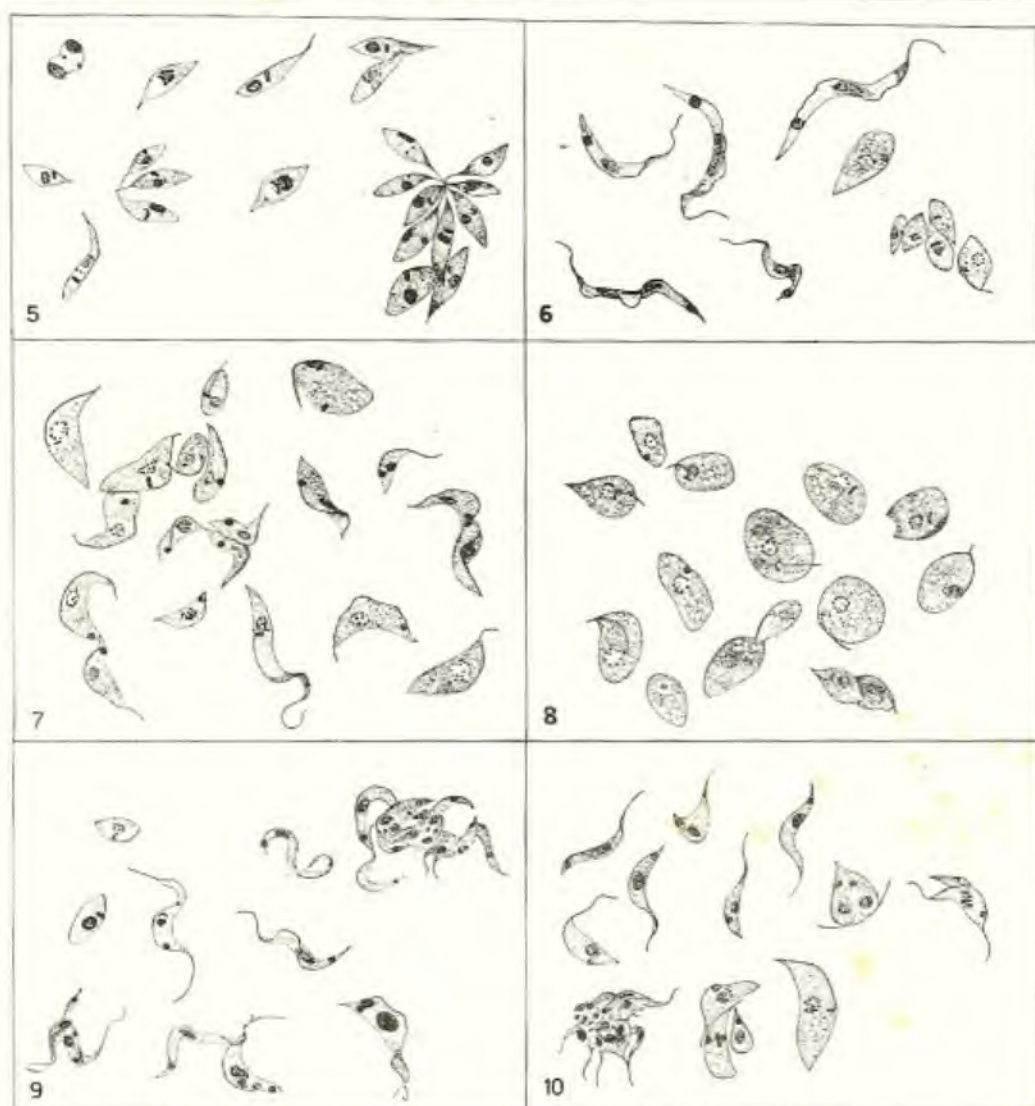
Observamos algumas vezes nas preparações coradas, desde 16 horas, elementos arredondados que parecem ter evoluído diretamente de tripanosoma para leishmânia por enrolamento do flagelo em torno do parasita. Em material mantido em geladeira a 6°C observamos com muito mais frequência essas formas, inclusive "in vivo".

Também foi observado um terceiro processo de evolução das formas largas, semelhante ao verificado por MUNIZ & FREITAS<sup>24</sup> sem migração do cinetoplasto, por alargamento do corpo, deslocamento do núcleo para a região anterior, desaparecimento da membrana ondulante, tornando-se o flagelo um apêndice prêsso à massa do citoplasma. Tal tipo de evolução foi observado apenas quando o sangue infectado era mantido a 6°C.

B. — *Evolução das formas delgadas "in vitro" em sangue citratado.* — Foram realizadas 4 experiências com a cêpa Y, fazendo-se do mesmo modo observações a fresco e em preparações coradas, de 0 a 96 horas depois da colheita.

Não observamos a evolução das formas delgadas no sentido da descrita para as formas largas. Nas observações a fresco verificamos que ao menos a maioria delas permanece com boa motilidade, sem alterações morfológicas, conservando boa vitalidade nos 2 ou 3 primeiros dias e depois perdendo-a gradativamente. A partir do 4º dia notamos algumas vezes aglomeração das mesmas. Antes desse tempo não encontramos formas delgadas unidas, ao contrário do que ocorre com as largas que precocemente se aglutinam. Até o 4º dia foram observadas formas delgadas com morfologia praticamente inalterada (Fig. 6) e sem sinal de transformação para forma larga no que diz respeito à posição do cinetoplasto, largura do citoplasma e estrutura do núcleo. Nesse tempo a evolução das formas largas para elementos critidiformes e leishmaniformes já se com-





- Fig. 5 — Formas evolutivas do *T. cruzi* — cepa L. — em sangue citratado "in vitro" após 48 horas de permanência em temperatura ambiente. (Desenho em câmara clara x 1000).
- Fig. 6 — Formas de tripanosomas delgadas do *T. cruzi* — cepa Y — após 4 dias de permanência em temperatura ambiente no sangue citratado "in vitro". (Desenho em câmara clara x 1000).
- Fig. 7 — Formas evolutivas do *T. cruzi* — cepa L. — com 24 horas de permanência no estômago do triatomíneo. Elementos critidiformes com cinetoplasto redondo ou em barra, tripanosomas ainda não evoluídos e elementos leishmaniformes flagelados. (Desenho em câmara clara x 1000).
- Fig. 8 — Formas evolutivas do *T. cruzi* — cepa L. — com 48 horas de permanência no estômago do triatomíneo. Ausência de tripanosomas; critídias e elementos leishmaniformes com e sem flagelo livre abundantes. (Desenho em câmara clara x 1000).
- Fig. 9 — Formas evolutivas do *T. cruzi* — cepa Y — com 48 horas de permanência no estômago do triatomíneo. Predominam ainda as formas delgadas com morfologia conservada, notando tendência à aglutinação. (Desenho em câmara clara x 1000).
- Fig. 10 — Idêntica à anterior, com 72 horas. Permanência, ainda, de maioria de elementos com morfologia de tripanosomas, aglutinados muitos deles, de dimensões reduzidas em relação às formas sangüíneas iniciais. Critídias já constituídas. (Desenho em câmara clara x 1000).

pletou. Em material mantido em geladeira, quando então a hemólise era evitada, observou-se a permanência de formas finas com boa vitalidade até 7 dias, sem alterações morfológicas.

Nas observações a fresco e nas preparações coradas, pudemos observar que no mesmo material em que as formas delgadas permaneciam inalteradas as formas largas sofriram as mesmas transformações descritas no item anterior.

C. — *A evolução das formas largas no estômago do triatomíneo* foi a mesma observada "in vitro". As observações a fresco com 6 horas mostraram já uma diminuição da motilidade dos tripanosomas e após 16 horas muitos deles apresentavam alterações para elementos critidiformes. Com 24 horas os tripanosomas eram ainda encontrados em pequeno número, mas eram muito raros com 48 horas. A migração do cinetoplasto e os outros fenômenos descritos puderam ser verificados muito bem em preparações coradas. Também a forma do cinetoplasto em bastonete se tornou freqüente nos elementos após 48 horas de permanência no estômago. A transformação de elementos critidiformes para elementos leishmaniformes com ou sem flagelo livre foi observada principalmente dentro de 48 a 72 horas. Entretanto, já com 48 horas, observamos no duodeno de alguns insetos abundantes formas de critídias em divisão, de morfologia semelhante às das formas encontradas no estômago e oriundas diretamente dos tripanosomas sanguícolas (Figs. 7 e 8).

A transformação direta de tripanosomas em elementos leishmaniformes por enrolamento do flagelo em torno do parasita foi também verificada no estômago dos triatomíneos a partir de 16 horas de permanência.

Em outras observações, verificamos que após 5 e mesmo 7 dias da alimentação infectante, encontram-se no estômago dos triatomíneos elementos critidiformes e leishmaniformes semelhantes aos descritos no material com 72 horas de permanência, sem sinais de divisão.

D. — *Evolução das formas delgadas nos triatomíneos*. — Foram realizadas três experiências e feitas observações com 16 a 96

horas. Duas experiências foram efetuadas com a cêpa Y e uma com a L.

Se a evolução das formas largas "in vitro" foi praticamente a mesma observada nos triatomíneos, o mesmo não podemos dizer em relação às formas delgadas, pois embora tenha havido certo paralelismo, êste foi menos pronunciado. Realmente tivemos dificuldade em interpretar muitas formas encontradas.

Pelo exame a fresco observamos formas delgadas bem conservadas até 24 horas de permanência, quando já não observamos formas largas do tipo sanguícola, as quais estavam tôdas evoluindo para elementos critidiformes. As preparações coradas com 24 e 48 horas mostraram formas delgadas bem conservadas, ao lado de maior abundância de tripanosomas mais curtos e mais grossos que podem ter sido derivados das formas delgadas (Fig. 9). Êsses pequenos tripanosomas constituíram a maioria das formas livres ou aglomeradas, nas observações com 48, 72 e 96 horas, com exceção naturalmente das que apresentavam evolução característica das formas sanguícolas largas. Não conseguimos verificar se estas formas são capazes de continuar sua evolução. Temos a impressão de que a maior parte delas se aglomera e degenera depois de 72 a 96 horas.

Nas observações com 48 e 72 horas, além da aglomeração de vários elementos, verificamos o emparelhamento desses pequenos tripanosomas com aparente fusão de seu citoplasma (Figs. 9 e 10).

Embora ficássemos com várias dúvidas quanto à evolução das formas delgadas três fatos foram mais claros:

1. O número de formas que evoluíram para elementos critidiformes no material contendo formas delgadas e largas foi, nas experiências, proporcional à quantidade de formas largas existentes inicialmente.

2. O número de formas que mantiveram a morfologia de tripanosoma até 96 horas de observação foi também proporcional à quantidade de formas delgadas existentes inicialmente.

3. As formas delgadas apresentaram-se com morfologia igual à observada no sangue até 48 horas depois de permanecerem no estômago dos triatomíneos.

*Morfologia e evolução dos elementos parasitários em cultivo de tecido*

A. — *Morfologia das formas extracelulares*. — Transferindo fragmentos de tecido de embrião de *Gallus* parasitado pelo *T. cruzi* para novo meio nutritivo, observa-se depois de algumas horas o surgimento de tripanosomas oriundos de células parasitadas recém-rompidas. Este processo pode ser seguido algumas vezes, sob o microscópio, a partir da fase intracelular em que os tripanosomas apresentam movimentos enérgicos no interior da célula, rompendo-a depois e ganhando o meio extracelular.

Nessas observações pudemos verificar que as formas extracelulares do *T. cruzi* se apresentam desde o início com o seu polimorfismo característico quanto às formas, delgadas, intermediárias e largas, e quanto às dimensões, encontrando-se tripanosomas pequenos, médios e grandes.

Nas duas cêpas com que trabalhamos em cultivo de tecido, a proporção das três formas variou consideravelmente de cultura para cultura.

Além das formas em tripanosoma é relativamente freqüente o encontro de elementos critidiformes, principalmente na proximidade de células rompidas recentemente. Observam-se também elementos arredondados, dotados de flagelo livre com forte movimento de rotação, e elementos leishmaniformes imóveis, arredondados ou fusiformes.

A técnica de cultivo de tecido embrionário de *Gallus*, em gôta pendente, não se presta muito para observação prolongada dos tripanosomas porque êstes são muito sensíveis às alterações que se operam depois de certo tempo no meio nutritivo, as quais determinam sua rápida transformação em elementos leishmaniformes no próprio meio extracelular.

Observamos a fresco a penetração de tripanosomas das três formas no interior de células do cultivo. As formas finas freqüentemente entram na célula, movem-se no seu interior com grande vitalidade e depois tornam a sair. Observamos formas delgadas e intermediárias sofrerem o processo inicial de transformação até a fase de elemento critidiforme, mas não conseguimos acompanhar além desse ponto o processo evolutivo. Quanto às formas largas, embora tivéssemos ob-

servado sua penetração no interior de células, não conseguimos acompanhar a sua evolução intracelular.

Observamos também que em certas ocasiões é muito freqüente a penetração de tripanosomas nas células do cultivo. Outras vezes, embora haja grande riqueza de flagelados extracelulares, essa penetração é difícil de ser observada. Não conseguimos, entretanto, relacionar a freqüência desse fenômeno com as condições nutritivas do cultivo.

Nas preparações coradas os elementos intercelulares arredondados com ou sem flagelos acima referidos, mostram ser elementos leishmaniformes em vários graus de transformação para tripanosoma pelo processo de desenrolamento. Notamos as mesmas fases, que serão descritas abaixo, de desenvolvimento dos tripanosomas. Sua presença no meio intercelular se deve provavelmente à ruptura precoce de algumas células parasitadas.

B. — *Morfologia das formas intracelulares*. — Fora os aspectos já bem conhecidos da morfologia das leishmânias, o que nos chamou a atenção foi a presença de dois aspectos distintos das mesmas: elementos arredondados e elementos fusiformes.

Não houve constância na proporção de formas arredondadas e fusiformes nas duas cêpas com que trabalhamos, mas verificamos que em cada célula parasitada se encontrava um ou outro tipo de elemento, mas não os dois (Fig. 12). Em ambas as cêpas, de modo geral, as fusiformes foram mais freqüentes, variando muito de dimensões como se pode ver na figura 13. A possibilidade de visualização da morfologia dos elementos intracelulares a fresco em microscopia de fase afasta a hipótese de se tratar de artefato de técnica. Não acreditamos também que a forma fusiforme se deva à compressão entre os elementos parasitários porque encontramos células com poucos parasitas que apresentam esta morfologia.

A observação de elementos critidiformes a fresco, ou em preparações coradas (Fig. 14), é também freqüente em células abarrotadas de parasitas que iniciam o seu processo de transformação para tripanosomas. As diversas fases evolutivas de elementos leishmaniformes até tripanosomas passando



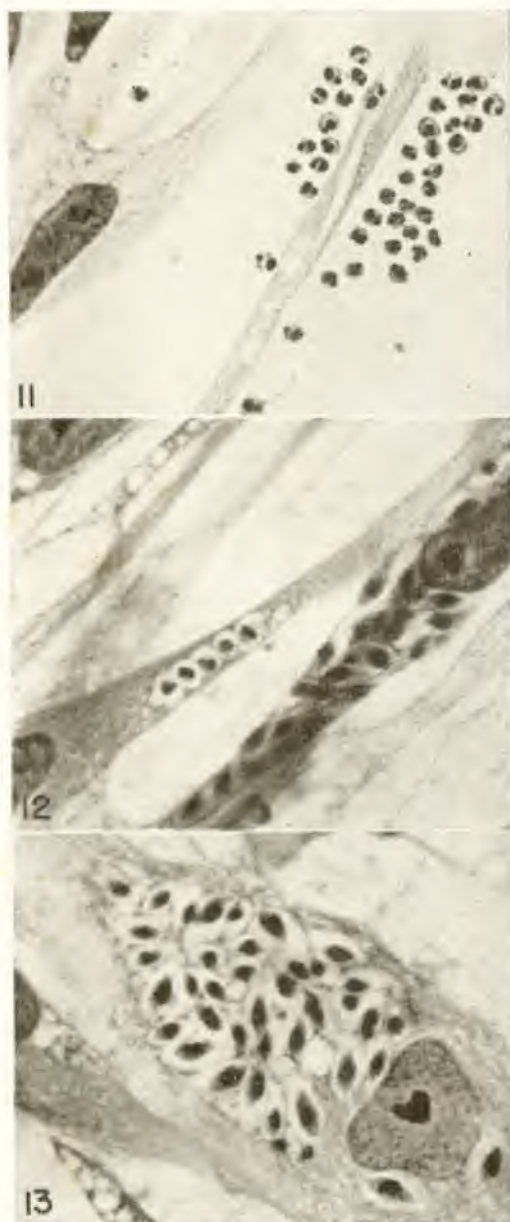


Fig. 11 — Microfotografia de cultura de tecido embrionário de Gallus infectado com *T. cruzi* mostrando leishmânias já no meio intercelular, algumas apresentando sinais de evolução para tripanosoma por "desenrolamento" (x 1200).

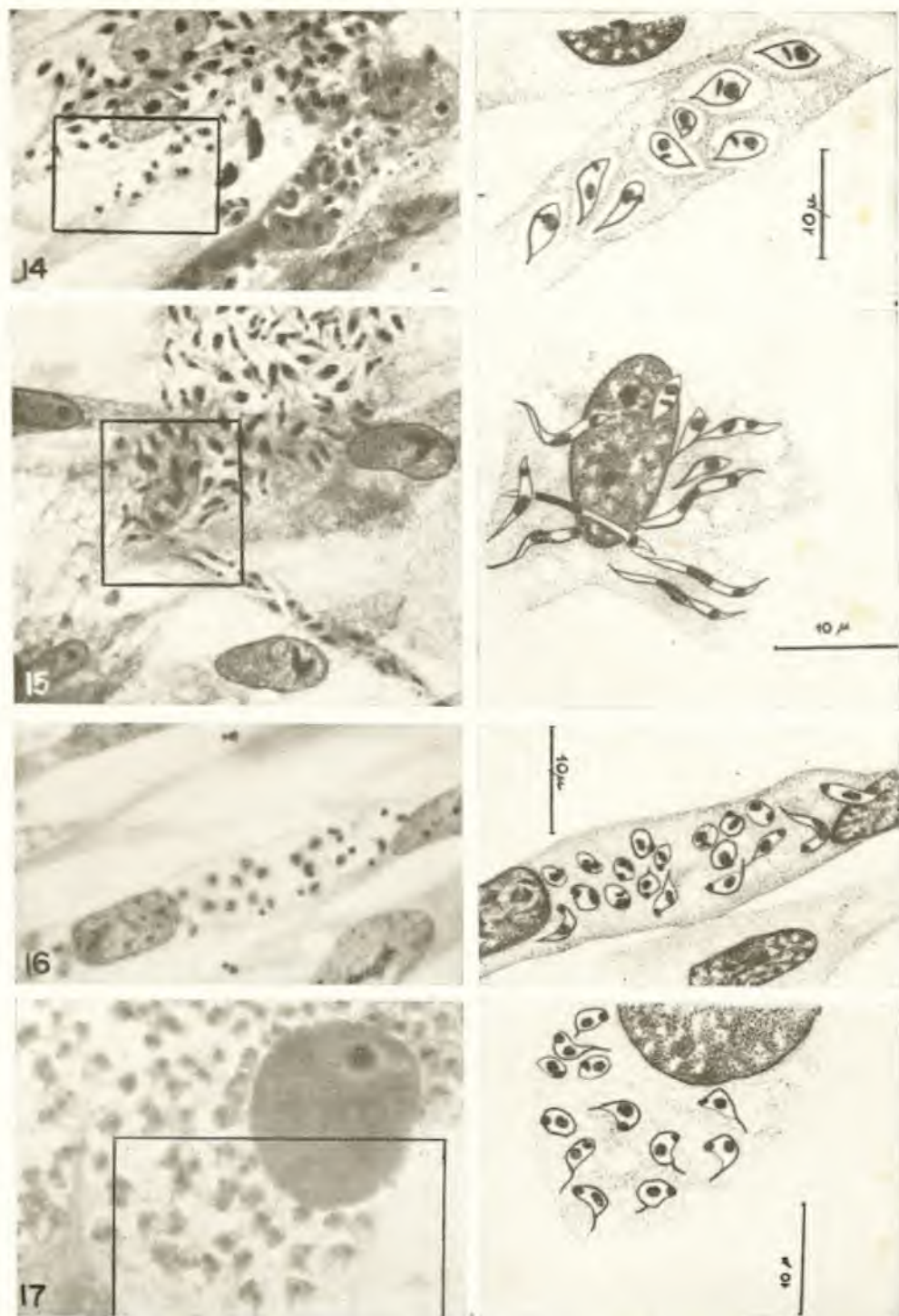
Fig. 12 — Duas células vizinhas no cultivo. Uma apresentando leishmânias fusiformes. Outra apresentando leishmânias arredondadas (x 1200).

Fig. 13 — Célula de cultivo de tecido parasitada por leishmânia do *T. cruzi* do tipo fusiforme, apresentando grandes variações de dimensões (x 1200).

pela fase de elementos critidiformes pode ser seguida a fresco em microscopia de fase e em preparações coradas (Figs. 14 e 15). O cinetoplasto inicia a sua migração para a extremidade posterior do parasita ainda com o seu aspecto de bastonete, típico das leishmânias e critídias, arredondando-se gradativamente quando atinge a extremidade posterior. Como se pode ver nessas figuras, existe uma fase intermediária de tripanosoma largo nesta seqüência evolutiva de leishmânia-critídia-tripanosoma, parecendo que a permanência mais prolongada no interior da célula determina a continuação do processo até tripanosoma delgado (Fig. 15). O tripanosoma mais largo por não ter sofrido alongamento completo pode naturalmente ganhar o meio extracelular pela ruptura precoce da célula, mas êle difere da forma sanguícola larga típica pela situação do cinetoplasto que nesta é subterminal, enquanto que naquele é afastado da extremidade posterior. Esta diferente situação do cinetoplasto, mesmo quando não possível de ser observada a fresco, e freqüentemente o é, determina uma motilidade diferente do flagelado, facilitando o seu reconhecimento a fresco. O cinetoplasto subterminal garante a extensão do flagelo em todo o comprimento do parasita, podendo-se observar bem o movimento da membrana ondulante e as contorções do tripanosoma em todo o seu comprimento como se observa na forma larga sanguícola. Já quando o cinetoplasto é afastado da extremidade posterior, esta tem certa rigidez e o movimento de contorção do parasita, bem como o de sua membrana ondulante, só é observado da região média para a extremidade anterior. Os tripanosomas delgados também apresentam esta rigidez da extremidade posterior, determinada pela posição do cinetoplasto.

Além desse tipo de evolução de leishmânia-critídia-tripanosoma, que observamos em relação às leishmânias fusiformes, encontramos formas de evolução direta de leishmânia para tripanosoma por desenrolamento. Foram observadas em relação a leishmânias de contornos arredondados, parecendo, pelas preparações coradas, dar-se a evolução com a seguinte seqüência: o cinetoplasto do elemento leishmaniforme se arredonda, situa-se junto da membrana do parasita, o flagelo cresce contornando o elemento arredondado.





- Fig. 14 — Microfotografia de célula parasitada mostrando na região assinalada formas evolutivas de leishmânia para tripanosoma por alongamento, notando-se fase intermediária de crítdia. Ao lado, desenho em câmara clara da região assinalada.
- Fig. 15 — Como na anterior, apenas em fase mais avançada, notando-se raras leishmânias, algumas crítdias e maioria de tripanosomas, alguns deles com morfologia característica das formas delgadas. Ao lado, desenho em câmara clara da região assinalada.
- Fig. 16 — Várias fases de "desenvolvimento" de leishmânias para tripanosomas, no interior de fibroblasto de cultivo de tecido embrionário de Gallus. Ao lado, desenho em câmara clara.
- Fig. 17 — Idem, em cultivo de células de coração de macaco em meio líquido. Ao lado, desenho em câmara clara.

O núcleo alonga-se, o citoplasma na região próxima ao cinetoplasto se vacuoliza e depois se rompe, desenrolando-se o parasita (Figs. 11, 16 e 17).

Em face anterior ao desenrolamento, notam-se elementos arredondados com flagelo contornando toda a extensão do parasita e com uma porção livre longa. Por esse processo o cinetoplasto se situa bem próximo à extremidade posterior desde que se diferencia o tripanosoma, o volume nuclear é bastante grande em relação ao do citoplasma e o tripanosoma formado é largo, o flagelo livre bastante longo desde o início, caracteres em tudo semelhantes aos das pequenas formas sanguícolas descritas mais atrás. Nunca encontramos no interior de células formas largas grandes do tipo da que encontramos em circulação no sangue de camundongos infectados. As observações a fresco que conseguimos realizar desse tipo de evolução leishmânia-tripanosoma foram menos completas que para o tipo de evolução anterior. Observamos apenas, após ruptura de células parasitadas, a libertação de tripanosomas largos e de certo número de elementos arredondados, com flagelo livre longo, dotados de vivo movimento de rotação e com grandes contorções, dando a impressão de um processo de desenrolamento.

#### COMENTARIOS

Nossas observações vêm confirmar a existência de duplo processo de gênese dos tripanosomas no vertebrado descrito por MAYER & ROCHA LIMA<sup>20</sup> e aceito por WOOD<sup>5</sup> e ROMAÑA<sup>30</sup>. O processo de "desenrolamento", de acordo com a nomenclatura de MAYER & ROCHA LIMA, "progressão indireta" (WOOD) ou "progressão orbicular" (ROMAÑA), só foi observado a partir de leishmânias de aspecto arredondado, enquanto o processo de evolução por alongamento com passagem pela forma de críidia aceito pela maior parte dos autores, foi observado em relação às leishmânias fusiformes. Não pudemos excluir que ocorram fenômenos opostos, ou que as leishmânias arredondadas se transformem em fusiformes, ou vice-versa. A evolução por alongamento como foi observada em cultivo de tecido pode dar origem às formas delgadas e inter-

mediárias idênticas às sanguícolas, mas pode dar, em fase intermediária do processo, como já observaram MEYER & OLIVEIRA<sup>22</sup> tripanosomas largos que entretanto consideramos diferentes dos tripanosomas sanguícolas largos típicos, pela posição do cinetoplasto e outros aspectos morfológicos. Por outro lado, a evolução por desenrolamento em nossas preparações de cultivo de tecido dava origem a tripanosomas largos, semelhantes às formas sanguícolas largas pequenas. Estas, nas infecções experimentais em camundongo pelas cepas *L* e *C*, são frequentes no sangue periférico, principalmente em surtos de aumento de parasitemia, o que falaria em favor de sua recente saída de células.

Nossos dados de cultura de tecido sugerem, portanto, que o desenrolamento origine pequenos tripanosomas largos enquanto o alongamento determina a formação de tripanosomas delgados ou intermediários. Não conseguimos, entretanto, esclarecer qualquer razão que pudesse determinar um ou outro tipo de evolução. Não é provável que essa dualidade seja a expressão de fenômenos de sexualidade mesmo porque em nossas experiências com micromanipulação foi possível obter em camundongos formas delgadas e intermediárias a partir da inoculação apenas de formas largas, o que demonstra existir durante o ciclo do vertebrado algum momento em que haja interconversão das formas quer na fase de leishmânia, quer na fase de tripanosoma.

Não aceitamos também que o dimorfismo possa ser explicado apenas pela juventude das formas delgadas. Nossas observações em cultivo de tecido mostram que se podem originar no interior das células formas delgadas, intermediárias e largas. Os três tipos, logo após abandonarem as células, já apresentam o movimento característico das respectivas formas sanguícolas. Por outro lado, nossas observações comparativas da morfologia das formas sanguícolas, em infecções experimentais em camundongo nas cepas *Y*, *L* e *C*, mostram que, enquanto na primeira as formas delgadas são realmente abundantes no início da infecção, diminuindo com o evoluir da mesma, já nas outras duas cepas as formas largas predominam de muito desde o início da infecção, surgindo em grande número logo no primeiro ciclo tecidual, o



que demonstra existirem formas jovens circulantes largas desde o início.

Outros fatores aventados para explicar o dimorfismo, tais como fatores imunitários (PIZZI<sup>27</sup>) e o tipo de células em que se desenvolvem os flagelados (MEYER & OLIVEIRA, WOOD), realmente não podem ser afastados. Como se sabe o tropismo tecidual das diferentes cepas de *T. cruzi* pode variar, sendo a cepa Y, por exemplo, reticulotrópica (RÊGO<sup>28</sup>), enquanto outras são músculo-trópicas, neuro-trópicas, etc. Esse diferente tropismo, condicionando diferentes ambientes celulares para o ciclo tecidual, poderia explicar a variação de morfologia de uma cepa para outra, mas ter-se-ia de invocar também a influência de fatores imunitários, como sugeriu PIZZI, para explicar a variação na mesma cepa no decurso da infecção.

Se os fatores imunitários agiriam sobre os tripanosomas extracelulares ou durante a própria fase intracelular não se pode saber, sendo importante, a nosso ver, estudos a respeito.

Fato curioso em nossas observações foi que, embora a inoculação de formas largas da cepa C tivesse determinado infecções em que a morfologia dos elementos sanguíneos não diferia das infecções com a cepa original, já quando fizemos uma passagem em "barbeiro" da mesma cepa, a proporção de formas delgadas no início da infecção foi muito maior que a normalmente observada quando se mantém a infecção por meio de repique sucessivo em camundongo.

O problema do dimorfismo das formas sanguíneas do *T. cruzi* está, pois, ainda por esclarecer, não se podendo rejeitar com segurança nenhuma das idéias até hoje aventadas para explicá-lo. Nossas observações sobre o determinismo das formas sanguíneas em sangue infectado "in vitro" e em triatomíneos vêm acrescentar, às diferenças morfológicas já descritas, outra de natureza biológica, qual seja um comportamento diverso no que diz respeito à capacidade de evoluir para elementos critidiformes ou leishmaniiformes. As formas largas de duas cepas mostraram grande facilidade de evoluir nesse sentido enquanto em relação às formas delgadas não chegamos a observar essa evolução. Tal comportamento diferente poderia correr por conta do não "amadurecimento" das formas delgadas. Entretanto, como já

foi discutido acima, outros fatos falam contra a interpretação das formas delgadas simplesmente pela sua juventude e, além disso, verificamos a sua capacidade de invadir as células e transformar-se em elemento critidiforme, o que mostra ser a forma delgada

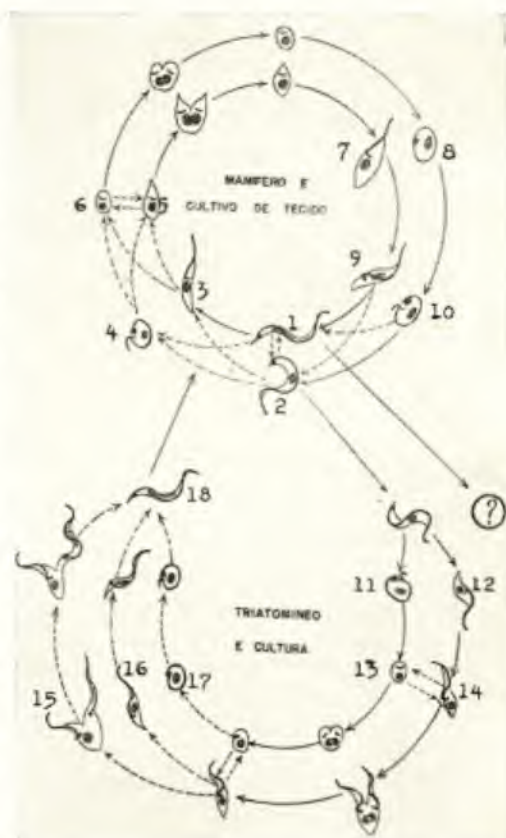


Fig. 18 — Esquema do ciclo evolutivo do *T. cruzi*. Em linhas cheias as vias evolutivas, descritas em vários trabalhos, e observadas pelo autor. Em linha interrompida, vias descritas em outros trabalhos mas não observadas pelo autor e de interpretação ainda não bem estabelecida. 1. *Trypanosoma* sanguíneo delgado; 2. *Trypanosoma* sanguíneo largo; 3. Elemento critidiforme intracelular; 4. Forma de "enrolamento" do tripanosoma; 5. *Leishmânia fusiforme*; 6. *Leishmânia arredondada*; 7-9. Formas evolutivas para tripanosoma por "alongamento"; 8-10. Formas evolutivas para tripanosoma por "desenrolamento"; 11. Forma evolutiva para leishmânia por "enrolamento"; 12. Forma evolutiva para critídia por migração do cinetoplasto; 13. *Leishmânia*; 14. Critídia; 15. Gênese do tripanosoma metacíclico por divisão assimétrica de critídia; 16. Idem, por migração do cinetoplasto de critídia; 17. Idem, por "desenrolamento".

capaz de evoluir no meio intracelular. Por outro lado, formas largas que consideramos jovens, quais sejam os pequenos tripanosomas largos que surgem nos surtos de parasitemia, mostram-se igualmente capazes de evoluir nos triatomíneos ou "in vitro", seguindo o mesmo processo evolutivo das formas largas grandes.

Fato que se deve ter sempre em mente ao abordar êsse problema é o da existência do dimorfismo também em tripanosomas outros que não o *T. cruzi*, como os do grupo *brucei-evansi*, que se reproduzem na corrente circulatória sob a forma de tripanosoma. Êsse fato, que tem merecido também as mais diversas interpretações, de certo modo nos mostra que estamos em presença de um fenômeno mais geral e que não pode ser abordado unicamente em função das particularidades do ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

#### SUMMARY

##### *Studies in the life cycle of "Trypanosoma cruzi"*.

In ordem to clarify some aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, especially the origin and determinism of the trypanosome form in the vertebrate host, some experiments were performed "in vitro" with infected blood of mice, as well as in the digestive tract of triatomid-bugs and in tissue culture.

A different behaviour of the broad and slender forms of trypanosomes was observed in citrated blood of mice experimentally infected when the blood was maintained "in vitro" at room temperature (about 20°C).

The broad forms, after a few hours, begin to change in one of the following ways:

1) The posterior part of the trypanosome becomes more broad, the kinetoplast migrates to a juxta-nuclear position and the free flagellum shortens. A diffuse vacuolization of the cytoplasm is often observed, or else a great vacuole just behind the kinetoplast. After 16 hours great numbers of crithidiform organisms were seen, and after 48 hours practically all broad trypanosomes underwent such transformations.

2) On the other hand, some broad trypanosomes were observed that change directly into round leishmaniform organisms within

a few hours. This was much more frequent when the infected blood was kept in the ice-box at 6°C. The slender forms, on the contrary, maintained their morphological characters as well as their typical movements during 4 or 5 days, and after that agglomerate and degenerate without undergoing further evolution.

In the digestive tract of triatomid-bugs the broad forms followed the same evolution observed "in vitro" in citrated blood. The slender forms were observed with unchanged morphology and movements at least until 48 hours after the ingestion of infected blood. Most of the trypanosomes agglomerate and degenerate after 72 hours, but a direct evolution to leishmaniform organisms could not be excluded.

In tissue culture the development of the trypanosome form was studied in the interior of the cells and the observations confirmed the existence of a double transformation process of leishmaniae into trypanosomes.

In the direct one, the leishmania stays oval-shaped while the flagellum grows around the body of the parasite. After that the parasite "unrolls" and elongates originating the trypanosome form. This type of development gives origin to broad and short trypanosomes, similar to the parasites frequently observed in the blood of infected mice during the periods of ascension of parasitemia.

In the other process the leishmania elongates while the kinetoplast migrates to the posterior part of the parasite. Thus there is a crithidia phase in the interior of the cell during this progression, until the parasite acquires the typical trypanosome form. This development was observed only with fusiform leishmaniae, while the direct one was seen in round-shaped elements.

The analysis of the morphology of the blood forms of *Trypanosoma cruzi* in experimentally infected mice with 3 different strains of the parasite maintained through many years by successive inoculation shows that in one of them (*Y* strain) the slender forms were very frequent in the beginning of the infection and stayed at a high level for some time. The broad forms, very rare at the beginning, increase only in number after 10 or more days; after 2 or more weeks they predominate and finally constitute



almost the totality of the blood trypanosomes. In the other two strains (*C* and *L*) the slender forms were very rare, the broad ones predominating almost absolutely since the beginning of the infection. The presence of short and broad trypanosomes, of about 12 to 15 micra of length, was frequently noted in the periods of ascension of parasitemia. Those little trypanosomes could be, according to the author, young forms just out from the cells.

These observations confirm also the existence of a double process of development of leishmania into trypanosome.

Using the micromanipulator it was possible to isolate 180 broad forms of blood trypanosomes from infected mice and inoculate them in a new-born mouse. The infection developed and after a few days slender, intermediate and broad trypanosomes appeared in the blood of the mouse, which does not confirm the sexual origin of the polymorphism of blood trypanosomes.

The quantitative analysis of relative frequency of slender, intermediate and broad trypanosomes in the peripheral blood shows that the isolation and inoculation of broad forms only did not change the normal characters of the strain.

Nevertheless, when a passage through triatomid-bugs was performed, the frequency of the slender forms increased markedly.

#### AGRADECIMENTOS

Deixamos consignados aqui nossos agradecimentos à Srta. Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica da Universidade do Brasil, e ao Dr. Renato Piza de Carvalho, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da U.S.P.

#### REFERÊNCIAS

- 1 — BRUMPT, E. — Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Bull. Soc. path. éxot. 5:360-367, 1912.
- 2 — CASTELLANI, O. & FERNANDES, J. F. — Efeito de análogos de purinas sobre a biosíntese de nucleotídios por *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Resumo das Comunicações à X Reunião Anual da S.B.P.C., São Paulo, 6-12 de julho de 1958.
- 3 — CHAGAS, C. — Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218, 1909.
- 4 — CHAGAS, C. — Quelques aspects évolutifs du *Trypanosoma cruzi* dans l'insect transmetteur. Compt. rend. Soc. biol. 97:829-832, 1927.
- 5 — CITRI, N. & GROSSOWICZ, N. — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi* and some other Haemoflagellates. J. Gen. Microbiol. 13:273-278, 1955.
- 6 — COTRIM, J. X. & RAMALHO, A. C. R. — Nova técnica de coloração de protozoários pelos derivados do Romanovsky. Folia clin. et biol. 23:161-166, 1955.
- 7 — CULBERTSON, J. T. & KESSLER, W. R. — Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 28:155-158, 1942.
- 8 — DELANOE, M. & DELANOE, P. — A propos du *Schizotrypanum cruzi*. Bull. Soc. path. exot. 5:599-602, 1912.
- 9 — DIAS, E. — Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 28:1-110, 1934.
- 10 — ELKELES, G. — Investigaciones sobre la evolución del *Trypanosoma cruzi*. Objeciones contra el concepto actual, y fundamentos para un nuevo concepto sobre la evolución del trypanosoma. Rev. Soc. argent. biol. 16:763-776, 1940.
- 11 — ELKELES, G. — Investigaciones sobre la biología del *Trypanosoma cruzi*. IIIª comunicación. El proceso de retrogresión de la forma trypanosómica. Rev. Soc. argent. biol. 18:315-320, 1942.
- 12 — ELKELES, G. — Experimental studies and critical considerations regarding the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. 25:141-143, 1945.
- 13 — ELKELES, G. — On the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 37:379-386, 1951.
- 14 — FONBRUNE, P. — Technique de micromanipulation. Paris, Masson, 1949.
- 15 — GALLIARD, H. — Recherches sur le cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi* Chagas à propos de l'infestation péritoneale exclusive chez la souris. Ann. parasitol. hum. et comp. 27:63-85, 1952.
- 16 — HARTMANN, M. — Notiz ueber eine weitere Art der Schizogonie bei *Schizotrypanum cruzi* (Chagas). Arch. Protistenk. 20:361-363, 1910.
- 17 — HAUSCHKA, T. S. — Sex of host as a factor in Chagas' disease. J. Parasitol. 33:399, 1947.

- 18 — JARPA, A.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R. & ATTAS, A. V. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VII. Cortisona y fosfato de pentaquina. Bol. enferm. parasit. chilenas 6:25-27, 1951.
- 19 — KOFOID, C. A.; WOOD, F. C. & McNEIL, E. — The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle. Univ. California Publ., Zool. 41:23-24, 1935.
- 20 — MAYER, M. & ROCHA LIMA, H. — Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Säugetieren. Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 16(Beiheft 3):90-94, 1912.
- 21 — MAZZOTTI, L. — Effects of inoculating small and large numbers of *Trypanosoma cruzi* into mice. Amer. J. Hyg. 31:86-91, 1940.
- 22 — MEYER, H. & OLIVEIRA, M. X. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. Parasitology 39:91-94, 1948.
- 23 — MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Estudo sobre o determinismo da transformação das formas sanguíneas do *Schizotrypanum cruzi* em crífidias. Rev. brasil. Med. 2:995-998, 1945.
- 24 — MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Realização "in vitro" do ciclo do *Schizotrypanum cruzi* no vertebrado, em meios de caldo líquido peritonial. Rev. brasil. biol. 6:467-484, 1946.
- 25 — NEGhme, A.; BADINEZ, O.; JARPA, A.; THIERMANN, E.; AGOSIN, M. & CHRISTEN, R. — Acción de la cortisona sobre la trypanosomiasis chagásica experimental del ratón suprarrenoprivo y total. Bol. enferm. parasit. chilenas 7:4-6, 1952.
- 26 — NOBLE, E. J. — The morphology and life cycles of trypanosomes. Quart. Rev. Biol. 30:1-28, 1955.
- 27 — PIZZI, T. — Sobre el problema de las formas delgadas de *Trypanosoma cruzi*. Bol. enferm. parasit. chilenas 8:26-30, 1953.
- 28 — PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGhme, A. — Influencia de la constitución genética de la laucha en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Biologica n°s 8/11:43-53, 1949.
- 29 — REGO, S. F. M. — Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, no sangue circulante do camundongo branco (*Mus musculus*). Folia clin. et biol. 26:17-46, 1956.
- 30 — ROMANA, C. — Acerca del ciclo evolutivo del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909, en sus faces tisular y hemática. An. Inst. med. reg. 4:155-171, 1955.
- 31 — ROMANA, C. & MEYER, H. — Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecido de embrião de galinha. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37:19-27, 1942.
- 32 — SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cêpa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. et biol. 20:191-208, 1953.
- 33 — SILVA, L. H. P.; PEREIRA, J. P. M. & FERNANDES, J. F. — Ação do aminonucleosídeo da Estilomicina sobre a infecção experimental de camundongos por *Trypanosoma cruzi*. Resumo das Comunicações à X Reunião Anual da S.B.P.C., São Paulo, 6-12 de julho de 1958.
- 34 — VIANNA, G. — Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas" (esquistotripanoze humana ou tiroidite parazitária). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3:276-294, 1911.
- 35 — WOOD, S. F. — Development of Arizona *Trypanosoma cruzi* in mouse muscle. Amer. J. Trop. Med. 31:1-8, 1951.
- 36 — WOOD, S. F. — Hematologic differentiation of the intramuscular developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 2:1015-1033, 1953.
- 37 — YONEDA, S.; SILVA, L. H. P. & FERNANDES, J. F. — Biossíntese de compostos purínicos pelo *Trypanosoma cruzi* em cultura de tecido. Resumo das Comunicações à X Reunião Anual da S.B.P.C., São Paulo, 6-12 de julho de 1958.

Recebido para publicação em 10 de abril de 1959.