

## NOTAS SOBRE A CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO *T. HASTATUS* (TRYPANOSOMA "CRUZI-LIKE" DO MORCEGO PHYLLOSTOMUS HASTATUS HASTATUS AO *T. CRUZI*).

William Barbosa \*, Ana Cândido Czerewuta \*\*, Osvaldira Seabra de Oliveira \*\*

---

### RESUMO

Os autores descrevem o comportamento do *Trypanosoma "cruzi-like"* isolado de morcegos *Phyllostomus hastatus hastatus* da Caverna de Fercal, em Brasília, Brasil. Referem-se ao seu aspecto morfológico, que não lhes permitiu distingui-lo do *T. cruzi*, às suas características de morfogênese e comportamento em culturas acelulares em que verificaram o crescimento, predominantemente, com 97% de epimastigotas na cultura em LIT, aparecimento de tripomastigotas e alguns amastigotas em culturas velhas; e a presença de tripo e amastigotas em percentuais elevados, tal qual do *T. cruzi*, na presença de estimuladores como soro fetal bovino, soro de aves, extrato de triatomíneos e alguns antibióticos. Constatam sua absoluta perda de infectividade para animais de laboratório, mesmo quando depletados artificialmente. Verificam seu comportamento em macrófagos de peritônio do camundongo — semelhante às cepas pouco virulentas do *T. cruzi*. Documentam amplamente sua comunidade antigênica para com o *T. cruzi* através do uso do parasita como antígeno solúvel e particulado em reações sorológicas para Doença de Chagas e proteção de camundongos à infecção pelo *T. cruzi*; finalmente, detectam anticorpos idênticos de *T. cruzi* e *T. hastatus* usando como antígeno glico-proteínas de superfície do *T. hastatus* obtidos de epimastigotas através de extração da suspensão aquosa pela mistura álcool-metilcloroformada em passagens sucessivas, precipitada pelo álcool etílico, constante de uma banda única de precipitação na dupla difusão em gel.

Comparam estes achados com os da literatura e concluem que o *T. hastatus* dos microquiropteros brasileiros correspondem ao *T. cruzi*, sendo uma de suas cepas, que naturalmente, na natureza, perderam sua infectividade, mantendo todos os outros atributos do *T. (S) cruzi*, CHAGAS, 1909.

---

UNITERMOS: *T. cruzi*. *T. "cruzi-like"*, cepa *hastatus*. Identificação biológica, caracterização.

---

\* Prof. Titular do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Responsável pela Unidade de Investigação Gaspar Viana.

\*\* Profa. Assistente do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Pesquisadora da Unidade de Investigação Gaspar Viana.

## INTRODUÇÃO

A distinção entre cepas do *T. cruzi* que a princípio foi buscada, visando agrupá-las pelos caracteres biológicos, praticamente, ligado ao comportamento do parasita e sua interação com o hospedeiro, idéia da qual surgiu a primeira conceitualização de tipos de *T. cruzi* elaborada por ANDRADE em 1974, pelo estudo baseado na virulência e patogenicidade, no tropismo tissular e morfologia do parasita no sangue periférico (1), vem ultimamente se enriquecendo com sofisticada metodologia, numa desesperada tentativa de se encontrar um critério definitivo e absoluto de caracterizar as cepas, tais como: a composição antigênica do parasita (2, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 24, 25, 26, 41, 49, 58, 60, 61, 62, 63, 65, 71, 72, 73, 74, 75, 78), principalmente, estudo de anticorpos monoclonais marcadores bioquímicos como os padrões isoenzimáticos-zimodemas (6, 52, 53, 54, 68 e 76) e caracterização do DNA do cinetoplasto (42, 44, 45, 56, 57 e 70, análise pelo esquisodema, "Probe" do DNA, e pela análise da interação parasita/lectina (14, 43, 47, 48, 55 e 59).

Todas estas técnicas se dirigem no sentido de tipificar, regionalmente, as cepas parasitas e correlacioná-las com as diversas formas clínicas da Doença de Chagas ocorrentes em cada local.

As observações têm mostrado que a "performance" dos diferentes tipos de cepas, classificadas biologicamente tem encontrado uma perfeita correlação com os padrões enzimáticos encontrados e comprovada variação antigênica (3, 45).

A variação intra-específica do *T. cruzi*, já há muito verificada, foi demonstrada em 1977 por BRENER, estudando duas populações de formas distintas (25).

BRENER também, recentemente, sugeriu que se poderia considerar as cepas Y e CL como populações polares ou protótipos, podendo ser usadas como paradigmas para cepas de diferentes áreas com diferentes formas clínicas.

Em uma mesma região, em função de cepas, se tem observado variação de zimodema com padrões enzimáticos diferentes (54) e mesmo do esquisodema, MOREL e cols., e DVORAC e cols. observaram comportamentos diferentes de cepas de camundongos isogênicos, em dois clones diferentes de *T. cruzi* observadas de uma mesma fonte (67).

O próprio emprego de anticorpos monoclonais para selecionar cepas tem mostrado dificuldade, uma vez que populações da mesma cepa apresentam clones com diferentes reatividades e a presença de anticorpos monoclonais reagindo com outros parasitas, tais como *Leishmania spp.*

Todos estes dados valorizam, de certo modo, a distinção entre as cepas, baseados nos aspectos biomorfológicos relacionados ao comportamento do parasita. Aspectos estes difíceis de analisar quando se pretende identificar e caracterizar cepas ditas "*cruzi-like*" de quirópteros, com as cepas de *T. cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* ocorre com muita frequência, em uma série enorme de vertebrados, inclusive em quirópteros. Neste último grupo, além de sua indubitável presença, esquisotripanos, morfologicamente indistinguíveis do *T. cruzi*, inclusive pelos índices de mensuração, têm sido descritos em microquirópteros de vários países da América Central e do Sul e no Brasil, pelo menos nos Estados do Pará, Amazonas, Ceará, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, São Paulo e Guana-

bara (12, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 50 e 77).

A principal diferença apontada entre o *T. cruzi* e os chamados *Trypanosomas "cruzi-like"* é a perda da infectividade para animais susceptíveis e a evidente falta de relação entre o parasita e os triatomíneos vetores habituais, ausentes nos nichos onde são encontrados, afora isto, tem sido argumentado também uma possível diferença da composição antigênica (35, 36, 38, 39, 40, 50 e 66).

Algumas destas espécies de tripanosomatídeos, foram reconhecidos e validados, seja por terem sido descritos antes da descrição do próprio *T. cruzi*, como o *T. vespertillionis*, BATTAGLIA, 1904, também descrito como *T. micolleorum*, SERGENT & SERGENT, 1905, no Velho Mundo; seja por ter sido descrito em data muito próxima à descrição do *T. cruzi* como o *T. (Schizotrypanum) phyllostomae* CARTAYA, 1910, (o primeiro tripanosoma de morcego *Carollia perspicillata* descrito na América, em Cuba, e que embora considerado como espécie distinta é infectante para outros mamíferos e pode ser considerado como um sinônimo perfeito do *T. cruzi*. Em 1941, DIAS & PIFANO redescreveram o *T. Phyllostomae*, isolado do *Phyllostomus hastatus* na Venezuela. DIAS, em 1936, denominou o *T. vespertillionis* ocorrentes no Velho Mundo como *Vespertillionis vespertillionis* e no Novo Mundo como *Vespertillionis cruzi* (22, 27, 34 e 50).

O próprio *T. Schizotrypanum cruzi*, CHAGAS, 1909, tem sido isolado de *Artibeus lituratus* da Colômbia, (MARINKELLI, 1966) e Panamá (SOUZA, 1972), do *Carollia perspicillata*; no Brasil (DIAS e cols. 1941), Colômbia (MARINKELLI, 1966) e Panamá (SOUZA, 1972); e de

outras espécies de morcegos nestes mesmos países (50).

Afora estas espécies, um grande contingente de *Trypanosomas* do tipo *cruzi*, isolados de morcegos no Brasil o são de *Phyllostomus hastatus hastatus*, constituindo a cepa *hastatus*, que, juntamente, com a cepa *epitesicus* da Argentina foram considerados por HOARE como *Trypanosoma de incerta sedis*, provavelmente, superponível ao *T. cruzi* (46 e 69).

Na presunção da impossibilidade de diferenciar o *T. vespertillionis-like* do *T. cruzi-like*, MARINKELLI sugere incluí-los em uma única espécie, que segundo as regras taxonômicas passariam a ser chamadas *T. vespertillionis*, pois foi descrito anteriormente (50).

Mais recentemente, BAKER e cols., 1978, em seu trabalho sobre caracterização bioquímica de algumas espécies de *Trypanosoma Schizotrypanum* de morcegos (microchiroptera), baseados na presunção de que estoques (cepas) estudadas por outros autores mostraram ser diferentes do *T. cruzi*, pela reduzida infectividade, perda da associação natural com o triatomíneo e sua composição antigênica, além do questionável valor das mínimas diferenças observadas pela determinação da densidade flutuante do DNA do núcleo e cinetoplasto, e padrões eletrolíticos de seis enzimas propõem que os tripanosomas do subgênero *Schizotrypanum* ocorrentes, naturalmente, em *Microchiroptera* e diferindo do *T. cruzi*, "*sensu stricto*", pelos parâmetros acima descritos fossem tratados como uma sub-espécie distinta, *T. cruzi* MARINKELLI ssp. nov. O *T. cruzi* "*sensu stricto*" levanta o nome da sub-espécie *T. cruzi cruzi*, CHAGAS, 1909 (16).

Neste trabalho, baseado em estudos anteriores sobre o *Trypanosoma "cruzi-like"*, cepa *hastatus*, do *Phyllostomus hastatus hastatus*, cujos resultados parciais, já foram apresentados em várias reuniões científicas, relativas aos aspectos de comportamento biológico em cultura, estudo da infectividade, comunidade antigênica - capacidade de detecção de anticorpos, testes de proteção de animais à infecção pelo *T. cruzi* patogênico, e através da provável comprovação da identidade antigênica entre o *T. cruzi* e o *T. hastatus*, pretendemos, confirmando a suposição de HOARE, caracterizar a cepa *hastatus* como *T. cruzi*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O *Trypanosoma hastatus* foi isolado do *Phyllostomus hastatus hastatus*, capturado na Caverna de Fercal, em Brasília, DF.

Foi submetido aos seguintes estudos:

**ESTUDO MORFOLÓGICO** — Realizado com tripanosomas do sangue do morcego, naturalmente infectado, e formas de cultura obtidas em condições naturais à temperatura variável de 24 a 27° C, em LIT, BARACHINI & DUCREY e sob ação de temperatura mais elevada de 28 a 37° C em meio LIT e este meio associado a vários estimuladores da morfogênese como sangue de aves, soro fetal bovino, extrato de barbeiro, extrato de flebotomíneos e antibióticos (17).

**INFECTIVIDADE PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO** — Várias tentativas foram realizadas por inoculação de formas epimastigotas de cultivo, no início e ao fi-

nal de sua fase de crescimento exponencial, com formas tripomastigotas e amastigotas obtidas em meios acelulares com ajuda de estimuladores; nestes experimentos foram usados camundongos de várias linhagens, "outbred" e "imbred", cobaias, hamsters, ratos, macacos, cães, gatos e morcegos.

Os animais foram usados íntegros ou depletados pelo uso de drogas imunossupressoras ou alguns irradiados. Tentativas também foram feitas visando disseminar o tripano somatídeo fazendo infecção concomitantemente, com o TG 180 por via intraperitoneal.

Tentou-se também a infecção de macrófagos com formas epi e tripomastigotas de cultura de camundongos obtidos da cavidade peritoneal (28).

**ESTUDO DA COMUNIDADE ANTIGÊNICA** — A comunidade antigênica com o *T. cruzi* foi estudada, inicialmente, diretamente pelas técnicas de imunodifusão em gel de agar, usando soro hiper-imune, preparado em coelhos, ora com o antígeno de *T. hastatus*, ora com o antígeno do *T. cruzi* e também com soros de infecção natural, pelo *T. cruzi*, de pacientes chagásicos (20).

Posteriormente, empregou-se o *T. hastatus* experimentalmente e logo de rotina em reações sorológicas como fixação de complemento, precipitação em gel e imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos em pacientes chagásicos (20 e 64).

**ESTUDO DA IMUNIDADE** — Provas de proteção em camundongos foram realizadas usando-se o *T. hastatus* em inoculações semanais, em dose baixa,  $1 \times 10^3$  por diversas rotas e desafio com cepa Y, bastante virulenta, precocemente (18).

#### PROVAS DE IDENTIDADE ANTIGÊNICA.

Essas provas foram baseadas usando-se glicoproteínas de superfície do *T. hastatus* obtida por extração metil-cloroformada sucessiva, de suspensão aquosa de epimastigotas, precipitada pelo álcool etílico, segundo técnica proposta por OROSCO e cols. (64) que foram postas a reagir pela técnica de dupla difusão em gel, concomitantemente contra soro imune de *T. cruzi*, *T. hastatus* e de *Leishmania* sp.

#### RESULTADOS

Os resultados referentes a estas observações encontram-se por inteiro, em trabalhos que completam este número desta publicação (17, 18, 20, 28 e 64) e em prévia publicação sobre o *T. hastatus* em Goiás (19).

Esses resultados podem ser assim resumidos:

**QUANTO AO ESTUDO MORFOLÓGICO** — Tripanosomas obtidos inicialmente de dois morcegos M1/73 e M10/73 que apresentaram raras formas sangüícolas, impediram um estudo adequado da forma tripomastigota de sangue, a forma estudada se mostrou longa, com cinetoplasto terminal e tamanho indistingüível do *T. cruzi*. As formas tripomastigotas de cultura obtidas de M10/73 mostraram índice nuclear pequeno nas primeiras culturas, depois, os repiques mais novos mostraram índices nucleares compatíveis com o *T. cruzi*. As formas leishmaniídes foram experimentalmente obtidas em percentual por vezes elevados, em culturas velhas e precocemente em quantidades de até

100% pelo uso de sangue de galinha acrescentada ao meio LIT tripomastigotas e amastigotas foram também obtidos quando se acrescentou ao meio cloridato de tetraciclina ou amoxicilina, ou extrato de barbeiro mais soro fetal bovino, meios sintéticos para culturas de células como o 199 ou RPMI tiveram o mesmo efeito, todos na dependência de elevação da temperatura de incubação até 35° C.

A infectividade para animais de laboratório foram sempre negativas mesmo em sub-inóculos repetidos e naqueles animais artificialmente, imunologicamente deprimidos.

Quanto aos testes de comunidade antigênica com o *T. cruzi* podemos observar que houve uma absoluta documentação de sua existência vez que foi possível preparar imunesoros tanto de *T. cruzi*, quanto de *hastatus* que mostraram reações cruzadas na imunodifusão (figura 1); usar antígeno solúvel na reação de fixação de complemento e empregou tanto a forma epimastigota como amastigota obtidas em culturas acelulares de maneira igual e resultados superponíveis aos observados com *T. cruzi* nas reações de HI

Fig. 1 — Observamos falsas múltiplas reações entre *T. cruzi* e *T. hastatus* em dupla difusão, em um falso teste de identidade. Antígenos produzidos total (por congelamento e descongelamento)



do *T. cruzi* e no norte do País com *C. pilosa*, foi recentemente observado na natureza: em nova espécie de triatomíneo da tribo *Cavernicolini* USINGER, 1944, encontrado no Estado do Amazonas, Brasil — *Cavernicola lenti*, n. sp. a segunda espécie do gênero descrita até agora — encontrada em uma árvore viva, oca, em íntima relação com microquirópteros *Phyllostomus e longatus* GEOFFREI, ambos parasitados por *Trypanosoma "cruzi-like"*, não patogênicos para camundongos. (21).

Em virtude desses achados, concluímos que o *T. hastatus* nada mais é do que a cepa do *T. cruzi* que perdeu sua patogenicidade, naturalmente, na natureza, provavelmente por um processo mutagênico e pode por si só ser incluído como o tipo IV de *T. cruzi*, cuja característica básica é a sua não infectividade, preservando, "mutatis mutandis", todas as outras características biológicas do *T. (S) cruzi*, CHAGAS, 1909.

## SUMMARY

### Characterization and identification notes of *T. Hastatus*, *T. Cruzi-Like* from *Phyllostomus Hastatus* *Hastatus* bats to *T. Cruzi*

The authors describe the behavior of the *Trypanosoma cruzi-like* isolated from FERCAL Cave, bats *Phyllostomus hastatus*, in Brasilia, Brazil

They observed that its morphologic aspect, morphogenic characteristics, its behavior in uncultured media, the answers using stimulating factors there similar to *T. cruzi* on's. They noted its absoluteness infectiously loose for laboratory animals, even when artificially depleted.

The behavior in mice peritoneum macrophages were also studied, but either of them made difference from strain little virulent of *T. cruzi*.

They established positively its antigenic community with *T. cruzi* by cross reaction in serologic tests, by its capacity to induce protection, for mice against challenge with virulent strain of *T. cruzi*; and recently by determination of presence of identical single band in the reaction of double diffusion in agar gel with the use of antigen surface glycoprotein of *T. hastatus*, suggestive of the antigenic identity between *T. hastatus* and *T. cruzi*, it follows that this trypanosomas belonging to the same species; that lost its infectiously naturally, but kept all of the others attributions of the *T. (S) cruzi*, CHAGAS, 1909.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 — ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas de "*Trypanosoma cruzi*" isoladas no Recôncavo Baiano. (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Revista de Patologia Tropical*, 3:65-121, 1974.
- 02 — ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D. & BARRAL NETTO, M. — Análise antigênica de diferentes cepas do "*Trypanosoma cruzi*". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 23: 245-250, 1981.
- 03 — ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. — Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do "*Trypanosoma cruzi*". *Gazeta Médica da Bahia*, 70: 32-42, 1970.
- 04 — ANDRADE, V. — Estudo imunopatológico de camundongos de seis diferentes linhagens isogênicas à infecção por três

tipos de cepas do "*Trypanosoma cruzi*". These, Salvador, Bahia, Brasil, 1984.

- 05 — ANDRADE, V.; ANDRADE, S.G.; BARRAL NETTO, M.; PONTES, A.L. & CASTRO, R. — Avaliação do comportamento de diferentes cepas do "*Trypanosoma cruzi*" na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 18(3): 143-154, 1985.
- 06 — ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & ANDRADE, S.G. — Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of "*T. cruzi*". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 77: 796-799, 1983.
- 07 — AFCHAIN, D.; CAPRON, A. & PRATA, A. — Les anticorps précipitants dans la trypanosomiase américaine humaine. *Gaz. Med. Bahia*, 70: 141-147, 1970.
- 08 — AFCHAIN, D.; FRUIT, J.; YARZABAL, L. & CAPRON, A. — Purification of a specific antigen of "*Trypanosoma cruzi*", from the culture forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(3): 478-482, 1978.
- 09 — AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; CAPRON, A. & JADIN, J. — Analyse antigénique comparée, par immunoelectrophorèse, des formes de culture de "*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Trypanosoma (Trypanosoma) brucei* et *Leishmania donovani*". *Consequences taxonomiques et diagnostiques. Parasitologica*, 9: 213-220, 1973.
- 10 — AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. & CAPRON, A. — Comparative antigenic analysis of "*Trypanosoma stercoaria*". *Practical consequences. Proc. 3rd. Int. Congr. Parasitol.*, Munchen, 216-217, 1974.
- 11 — AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. & CAPRON, A. — Antigenic make-up of "*Trypanosoma cruzi*" culture forms. Identification of a specific component. *J. Parasitol.*, 63: 507-514, 1979.
- 12 — ALENCAR, J.E.; BARROS, N.N.; PICCOLINI, R.S.; MOREIRA PINHO, V.A. & TOMÉ, G.S. — Estudo sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. V. Quirópteros infectados com "*Trypanosoma*" tipo "*cruzi*". *Separata* n. 3991.
- 13 — ALVES, M.J.M. & COLLI, W. — Glyco proteins from "*Trypanosoma cruzi*". Partial purification by gel chromatography. *FEBS letters*, 52: 188-190, 1976.
- 14 — ARAÚJO, F.G.; HANDMAN, E. & REMINGTON, J.S. — Binding of lectins to the cell surface of "*Trypanosoma cruzi*". *Journal of Protozoology*, 27: 397-400, 1980.
- 15 — ARAÚJO, F.G. & REMINGTON, J.S. — Characterization of stages and strains of "*Trypanosoma cruzi*" by analysis of cell membrane components. *The Journal of Immunology*, 127: 855-859, 1981.
- 16 — BAKER, J.R.; MILLES, M.A.; GODFREY, D.G. & BARRET, T.V. — Biochemical characterization of some species of "*Trypanosoma (Schizotrypanum)*" from bats. (*Microchiroptera*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(3): 483-491, 1978.
- 17 — BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C.; OLIVEIRA, O.S. DE; OLIVEIRA, R.L. DE & MACHADO, F.M. — "*T. hastatus*" — *Trypanosoma* de morcegos "*Phyllostomus hastatus hastatus*". Estudo sobre fatores que condicionam "in vitro" modificação da sua forma. *Rev. Pat. Trop.*, 13(3), 1984.
- 18 — BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C. & SOUZA, J.M. de — Nota preliminar sobre a proteção induzida pelo "*T. hastatus (Trypanosoma cruzi-like)*" do morcego "*P. hastatus hastatus*" em ca

- mundongos inoculados com cepa Y do "T. cruzi". Rev. Pat. Trop., 13(3), 1984.
- 19 - BARBOSA, W.; MARTINS, S. P. & OLIVEIRA, R. L. - Nota preliminar sobre "Trypanosoma" variedade "hastatus" isolado de "Phyllostomus hastatus" Caverna de Federal - DF. - Brasil, Rev. Pat. Trop., 2: 367, 1973.
- 20 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, O. S. de & CZEREWUTA, A. C. - O uso do "T. hastatus" como antígeno nas reações sorológicas para doença de Chagas. Rev. Pat. Trop., 13(3); 1984.
- 21 - BARRET, T. V. & ARIAS, J. R. - A new triatomine host of "Trypanosoma" from the central Amazon of Brazil: *Cavernicola lenti* n. sp. "(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80(1): 91-96, 1985.
- 22 - BATTAGLIA, M. - Alcune ricerche sopra due Trypanosomi ("Tryp. vespertilionis, Tryp. lewisi)". Ann. Med. Nav., 10: 517, 1904.
- 23 - BICE, D. E. & ZELEDON, R. - Immunoelectrophoretic comparison of "Trypanosoma vespertilionis" and "Trypanosoma cruzi". Rev. Biol. Trop., 19 (1-2): 149-152, 1971.
- 24 - BONGERTZ, V. & DVORAK, J.A. - "Trypanosoma cruzi": Antigenic analysis of cloned stocks. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 32: 716-722, 1983.
- 25 - BRENER, Z. - Intraespecific variation in "Trypanosoma cruzi": Two types of parasite populations presenting distinct features. PAHO, "Sci. Publication", 347: 11-21, 1977.
- 26 - BRENER, Z.; CHIARI, E. & ALVARENGA, N. J. - Observation on "T. cruzi" strains maintained over on 8 year period in experimentally inoculated mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 16: 32-38, 1974.
- 27 - CARTAYA, J. T. - Nueva filaria Y otros parasitos en la sangre de murciélago "Artibeus perspicillatus". Sanidad & Benef. Habana, 3: 503, 1910.
- 28 - CZEREWUTA, A.C.; BARBOSA, W. & OLIVEIRA, O.S. de - Estudo da interação "T. hastatus" macrófagos de camundongos e tentativa de infecção de evolutivas do parasita. Rev. Pat. Trop., 13(3): 1984.
- 29 - DEANE, L. M. - Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica. I - Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 3: 15-28, 1961.
- 30 - DEANE, L. M. - Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica. III. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres, dos arredores de Belém, Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 6: 225-232, 1964.
- 31 - DEANE, L. M. - Animal reservoirs of "Trypanosoma cruzi" in Brazil. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop., 16: 27-48, 1964.
- 32 - DIAS, E. - Revisão geral dos hemoflagelados de chiropteros. Estudos experimental do "Schizotrypanum de Phyllostomus hastatus"; identidade com "Schizotrypanum cruzi". O grupo "Vespertilionis". 9a. Reunión de la sociedad Argentina Patología Regional (Mendoza), Argentina, of. 1: 10-88, 1935.
- 33 - DIAS, E. - Sobre um "Schizotrypanum" dos morcegos "Lonchoglossa ecaudata" e "Carallia perspicillata" do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 35: 399-409, 1940.
- 34 - DIAS, E. & PIFANO, C. F. - Sobre um "Schizotrypanum" do morcego "Phyllostomus elongatum" da Venezuela. Rev. Bras. Biol., 2: 95, 1942.
- 35 - DIAS, E. & FREITAS FILHO, L. - Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero "Schizotrypanum". I. Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 38-427, 1943.
- 36 - DIAS, E.; LARANJA, F.S. & NÓBREGA, G. - Doenças de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 43: 495-582, 1946.
- 37 - DIAS, E.; MELLO, G. B.; COSTA, O.; DAMASCENO, R. & AZEVEDO, M. - Investigações sobre esquistotripanose de morcegos no estado do Pará. Encontro do barbeiro "Cavernicola pilosa" como transmissor. Rev. Bras. Biol., 2: 103-110, 1942.
- 38 - DIAS, E. & PIFANO, F. - Estudo experimental de um "Sizotrypanum" do morcego "Hemid perspicillatum" da Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 36: 79-98, 1941.
- 39 - DIAS-UNGRIA, C. & ZEUSS, M. - Transmisión del "Trypanosoma evansi y Trypanosoma cruzi" a partir de heces de animales infectados por via bucal. Rev. Vet. Venezuelana, 30: 187-198, 1972.
- 40 - DIAS, E. - Trypanosomes in bat and marmot. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 31: 260, 1937.
- 41 - FRUIT, J.; AFCHAIN, A. & CAPRON, A. - "Trypanosoma cruzi": location of a specific antigen and the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. Experimental Parasitology, 45: 183-189, 1978.
- 42 - GONÇALVES, A.M.; CHIARI, E.; DEANE, M.P.; CARNEIRO, M. Romanha, A. J. & MOREL, C. - Schizodeme characterization of natural and artificial populations of "Trypanosoma cruzi" as a tool in the study of Chagas' disease. In: BA Newton Editor. "Application of Biochemical and Molecular Biology Techniques to Problems of Parasite and Vector Identification" Proceedings of an International Symposium WHO Geneva, 1982.
- 43 - GONZÁLES CAPPA, S. M.; KATZIN, M.; AÑASCO, N. & LAJMANOVICH, S. - Comparative studies of infectivity and surface carbohydrates of several strains of "Trypanosoma cruzi". Medicina (Buenos Aires), 41: 549-555, 1981.
- 44 - GONÇALVES, A.M.; NEHME, N. S. & MOREL, C.M. - Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel C.M. (ed) Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual 2nd edition, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, p. 95-109, 1984.
- 45 - GONZALEZ, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M.E.; NOGUEIRA, N. & LIZARDI, P.M. - Minichromosomal repetitive DNA in "Trypanosoma cruzi": its use in a high-sensitive parasite detection assay. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81: 3356-3360, 1984.
- 46 - HOARE, C.A. - The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1972.
- 47 - KATZIN, A. M. & COLLI, W. - Lectin receptors in "Trypanosoma cruzi": an N-acetyl-Dglucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. Bioch. Biophys. Acta. 727: 403-411, 1983.
- 48 - KATZIN, A. M.; LAJMANOVICH, S. & GONZÁLES CAPPA, S. M. - Receptores para lectinas en la superficie del estadio tripomastigote de "Trypanosoma cruzi" Medicina (Buenos Aires) 40 (Supl. 1) 85-90, 1980.

- 49 - KLOETZEL, J. & CAMARGO, M. - Immunological of "Trypanosoma cruzi". Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 18: 142-145, 1976.
- 50 - MARINKELLE, C.J. - Biology of the "trypanosomes" of bats. Pág. 175-216, In: LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A., Eds. Biology of the Kinetoplastida, Volume I. Academic Press, London and New York, 1976.
- 51 - MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different "Trypanosoma cruzi" strains. Journal of Parasitology, 64: 475-482, 1978.
- 52 - MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; PÓVOA, M. M., SOUZA, A.A. de; PRATA, A. & MACEDO, V. - Do radically dissimilar "Trypanosoma cruzi" strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian of Chagas' disease? The Lancet, June 20, 1338-1340, 1981.
- 53 - MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A. & PÓVOA, M. - Further enzymic characters of "Trypanosoma cruzi" and their evaluation for strain identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74: 221, 1980.
- 54 - MILES, M.A.; TOYE, P.J.; SARAH, C. O. & GODFREY, D.G. - The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of "Trypanosoma cruzi", circulating independently in a rural area of Brazil. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 71(3): 217-225, 1977.
- 55 - MIRANDA-SANTOS, I. K. F. & PEREIRA, M.E.A. - Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 33: 839-844, 1984.
- 56 - MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J. & SIMPSON, L. - Strains and clones of "Trypanosoma cruzi" can be characterized by pattern restriction endonuclease products of Kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 6810-6814, 1980.
- 57 - MOREL, C. & SIMPSON, L. - Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprints of Kinetoplast DNA minicircles. American Journal of Tropical Med. Hyg., 29: (suppl) 1070-1074, 1980.
- 58 - MORGADO, M.G.; HOEGAEDERDEN, M. V. & CASTRO FILHO, B.G. - Antigenos "particulares" a cepas do "Trypanosoma cruzi": demonstração por imunoelectroforese bidimensional. Mem. Inst., Oswaldo Cruz, 77: 57-59, 1982.
- 59 - MUHLPFORDT, H.; EBERT, F.; SCHOTTELIUS, J.; CEDILLOS, R.; VELASCO, J. & MOSCA, W. - Comparative characterization of Venezuelan "Trypanosoma cruzi" stocks by electron microscopy, isoelectrofocusing and lectin typing. Tropenmedizin und Parasitologie, 35: 11-14, 1984.
- 60 - NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; TYDINGS, J.D.; UNKE-LESS, J. & COHN, Z. - "Trypanosoma cruzi": Surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med., 153: 629-639, 1981.
- 61 - NOGUEIRA, N.; UNKELESS, J. & COHN, Z. - Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of "Trypanosoma cruzi". Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 1259-1263, 1982.
- 62 - NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. - Differences in antigenic constitution of strains of "Trypanosoma cruzi". Ex. Parasit., 14: 221, 1963.
- 63 - NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. - Further studies on the antigenic constitution of strains of "Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi" experimental. Parasitology, 18: 224-230, 1966.
- 64 - OLIVEIRA, O.S. de; BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A.C. & MENDONÇA, J. R. de - Uso comparativo de amastigotas "T. cruzi" e "T. hastatus" cultivados a 35°C em meios sem células na RIFI para Doença de Chagas. Rev. Pat. Trop., 13(3): 1984.
- 65 - OROZCO, O.; AFCHAIN, D.; DISSOUS, C.; RODRIGUEZ, C.; OVLAQUE, G.; LEMERSE, J. L.; LOYENS, M. & CAPRON, A. - Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for "Trypanosoma cruzi". Am. J. Trop. Med. Hyg., 33(4): 560-568, 1984.
- 66 - PIFANO, F. & DIAS, E. - Investigações sobre o "Schizotrypanum" do morcego "Phyllostomus hastatus". Rev. Brasil. Biol., 2: 99-102, 1942.
- 67 - POSTAN, M.; DVORAK, J. A. & McDANIEL, J. P. - Studies of "Trypanosoma cruzi" clones in bred mice. I - A comparison of the course of the infection of C3H/HEN - mice with two clones isolated from a common source. American Journal of Trop. Med. Hyg., 32: 497-506, 1983.
- 68 - ROMANHA, A.J. - Heterogeneidade isoenzimática em "Trypanosoma cruzi". Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.
- 69 - ROMANA, C. & TORANZOS, L. B. - "Schizotrypanum" de murciélagos del género "Eptesicus". An. Inst. Med. Reg., Tucumán, 2: 41, 1947.
- 70 - SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. C.; CARRASCO, A.E.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; ISOLA, E.L.D. & STOPPANI, A. O. M. - Raped evolution of Kinetoplast DNA minicircle subpopulation in "Trypanosoma cruzi". Molecular and Biochemical Parasitology, 11: 169-178, 1984.
- 71 - SCHARFSTEIN, J.; RODRIGUES, M. M., ALVES, C.A.; SOUZA, W.; PREVATO, J.O. & PREVIATO, L.M. "Trypanosoma cruzi": description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. The Journal Immunology, 131(2): 972-976, 1983.
- 72 - SNARY, D. - "Trypanosoma cruzi": antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. Exp. Parasitol., 49: 69, 1980.
- 73 - SNARY, D. - Cell surface glycoproteins of "Trypanosoma cruzi": Protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 126-129, 1983.
- 74 - SNARY, D.; FERGUSON, M.A.J.; SCOTT, M.T. & ALLEN, A.K. - Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: Use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol., 3: 343-356, 1981.
- 75 - SNARY, D. & HUDSON, L. - "Trypanosoma cruzi": cell surface proteins: identification of one major glycoprotein - FEBS lett., 100: 166, 1979.
- 76 - TIBAYRENC, M. & MILES, M. A. - A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of "Trypanosoma cruzi". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 76-83, 1983.
- 77 - ZELEDON, R. & VIETO, P. I. Hallazgo de "Schizotrypanum verperillomits" (Battaglia, 1904) en la sangre de murciélagos de Costa Rica. Rev. Med. Trop., 5: 123-128, 1947.

78 - ZINGALES, B.; ABUIN, G.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. & COLLI, W. - Surface antigens of and clones of "Trypa-

nosoma cruzi" isolated from human. *Acta Tropical*, 41: 5-16, 1984.