

## CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO *TRYPANOSOMA* *CRUZI* EM MEIO LÍQUIDO

ÉDIA DE SENA LUSTOSA \*\*

---

### RESUMO

Diante da variação de comportamento do *Trypanosoma cruzi*, nos diferentes meios de cultura, o autor propõe rever os trabalhos realizados sobre o crescimento e diferenciação desse "Trypanosomatidae", nos meios líquidos complexos e nos semi-sintéticos. Ficou evidenciado nesta pesquisa que a influência dos fatores extrínsecos: pH, composição do meio, temperatura, idade das cepas etc., são além dos fatores intrínsecos, ainda desconhecidos ou insuficientemente estudados, os responsáveis pelo crescimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi*.

---

O *T. cruzi* é, entre os tripanosomos, um dos mais fáceis de ser cultivado em uma série de meios difásicos, semi-sólidos ou líquidos, que contêm os fatores de crescimento exigidos por essa espécie: hemina, ácido fólico e ácido esteárico.

Os meios que proporcionam maior crescimento incluem na sua

composição sangue total, ou soro e hemácia, ou gema de ovo. Há meios, entretanto, que possuem extrato de fígado, ou de carne, ou hidrolisados de proteína, além daqueles fatores essenciais.

Os meios semi-sólidos e tipos difásicos, devidos à sua complexidade e propriedades físicas, dificultam o estudo das exigências nutricionais do flagelado e a cinética de seu crescimento "in vitro".

Segundo Fernandes & Castellani (1966), os meios líquidos têm a vantagem de permitir um estudo mais acurado do crescimento cinético, o que, em última análise, é uma condição de suma importância para o sucesso na obtenção de um meio completamente definido. Os meios líquidos podem ser complexos ou composição química parcialmente definida (semi-sintéticos).

### I — MEIOS COMPLEXOS:

a) O meio "LIT" (liver infusion tryptose), idealizado por Yaeger e descrito por Camargo (1964) e Fernandes & Castellani

---

Trabalho do Curso de Especialização em Protozoologia.

Goiânia, de dezembro de 1975.

Instituto de Patologia Tropical da UFGO.

\*\* Aluna.

(1966), posteriormente utilizado por vários outros autores, é constituído de NaCl — KCl — Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> — Glicose — "Triptose" "Liver Infusion" — Soro de bovino 10% — solução de hemoglobina 2% e água destilada. Este meio apresenta a vantagem de fornecer flagelados para qualquer tipo de estudo. Tem sido usado para cultivo em massa. As vantagens estão relacionadas principalmente com a natureza complexa do infuso de fígado e triptose.

b) O meio de "WARREN", é meio líquido autoclavável e descrito pelo próprio Warren (1960), que lhe deu seu nome. É constituído de "Brain Heart Infusion" — sangue de carneiro desfibrinado — água destilada. Este meio, como o LIT, tem sido usado para cultivo em massa e estudos morfológicos.

c) O meio "HIL", descrito por Castellani, Ribeiro & Fernandes (1967), é constituído dos elementos básicos do meio LIT, mais hidrolisado de lactalbumina e infuso de coração de cão, este último substituindo o infuso de fígado, bem como a passagem do pH 7-2 para pH 6-7.

Encontrou-se neste meio crescimento de flagelado igual ao dos meios "LIT" e "WARREN", mas a diferenciação de epimastigotos — tripomastigotos foi muito maior que a constatada nesses. Não se sabe porque o infuso de coração de cão é melhor do que o infuso de fígado. Entretanto, podemos afirmar que os fatores estimulantes e inibidores estão presentes

nos dois meios, mas em quantidades diferentes.

d) O meio "LAS" (Lactoalbumin Serum) é um meio incompleto. Camargo (1964), o seu idealizador, procurando criá-lo, substituiu a triptose e o infuso de fígado do meio "LIT" pelo hidrolisado de lactalbumina. A mistura foi filtrada através do filtro de Seitz. Este meio comporta menor crescimento e a diferenciação é precoce.

## II — MEIOS LÍQUIDOS SEMI-SINTÉTICOS:

O *T. cruzi*, embora menos que outros tripanosomas de mamíferos, é muito exigente e não foi ainda cultivado em meio de composição química definida.

Little & Subbaraw (1945) e Sampath & Little (1949) cultivaram-no em um filtrado, proveniente de uma mistura de peptona, ácido Casamino, os fatores usuais de crescimento e sangue coagulado de coelho.

Little & Oleson (1951) melhoraram esta mistura, substituindo a peptona e o ácido Casamino por aminoácidos, vitaminas, glicose e os compostos: adenina, uracil, ureia, purinas, pirimidinas etc. O *T. cruzi* foi subcultivado neste meio por longo período de tempo.

Citri & Grossowicz (1954) idealizaram um meio parcialmente definido, contendo hemina, fração purificada de soro-albumina e suco de tomate. O suco de tomate foi substituído mais tarde por fatores de crescimento conhecidos: vitaminas, RNA, ácido cítrico e creatinina. Verificaram,

também, que este meio contém, como único composto indefinido, o hidrolisado de caseína, no qual se verifica um crescimento comparável ao meio preparado por Little & Oleson (1951) durante 1.5 ano. Mas Boné & Parent (1963) não obtiveram crescimento satisfatório com este meio.

Boné & Parent (1963) assinalaram que o *T. cruzi* não se adaptou ao meio de infuso de fígado triptose, a menos que fosse adicionado ao meio soro fresco de bovino ou lecitina da gema do ovo, isto porque na composição química de lecitina há estearato, que é fator essencial para o crescimento dos flagelados. Segundo os autores, o ácido esteárico substitui o soro, mas Fernandes e Castellani (1966) afirmaram que o ácido esteárico não poderia substituir o soro no meio LIT. Isso provavelmente porque devem ter usado raça diferente de tripanosomo. Boné & Parent (1963) substituíram o extrato de fígado por tiamina e ácido fólico, ficando o composto não definido só a triptose, e observaram que não houve diminuição do grau de crescimento. Novamente Fernandes & Castellani (1966) não confirmaram estes achados.

Lambrecht (1966) estudou o crescimento do *T. cruzi*, utilizando o meio semi-sintético de Boné & Parent (1963), e introduziu nestas experiências a medida da densidade ótica para avaliar o crescimento das culturas.

Montes (1970) estudou o crescimento de quatro cepas de *T. cruzi* nos meios semi-sintéticos de Citri & Grossowicz (1955), Boné

& Parent (1963), Little & Subbaraw (1945) e Little & Oleson (1951). Ele mostrou que no meio de Boné & Parent houve crescimento de todas as cepas. Foi este meio indicado por ele como o mais adequado para os estudos que visem à obtenção de um meio definido. Diferenças entre as cepas nos meios Citri & Grossowicz e Boné & Parent apontaram diferenças nas exigências nutricionais.

Logo após o cultivo do *T. cruzi*, foi observado que as formas epimastigotas (com membrana ondulante anterior) dão origem aos tripomastigotos metacíclicos e que estes são incapazes de multiplicar-se. Tem-se observado, comumente, um aumento de metacíclicos nas culturas velhas, mas os fatores que controlam a morfogênese não poderiam ser convenientemente estudados nos meios difásicos usuais. Com os trabalhos realizados por Camargo (1964), Fernandes & Colegas. (1966, 1967, 1969), introduzindo meios líquidos esterilizáveis por filtração, técnicas quantitativas de avaliação do crescimento e meios especiais para diferenciação mostraram toda uma série de eventos fisiológicos que muito contribuíram para o conhecimento da biologia do *T. cruzi*.

Camargo (1964), Fernandes & Castellani (1965 e 1966) e Chiari, E. (1971 e 1974), baseados em uma série de ensaios, constataram que no meio LIT há um crescimento mais rápido dos flagelados, permitindo, ainda, o uso do aparelho eletrônico "Coul-

ter Eletronic Counter”, para determinar o número total de organismos presentes no meio LIT. Culturas com densidade de população de flagelados de 3 a  $20 \times 10^6$ /ml mostram crescimento exponencial em 4 dias, seguindo-se uma fase estacionária no início da qual começa o processo de diferenciação.

Fernandes & Castellani (1966) observaram que, a partir da concentração de  $6 \times 10^7$ /ml, a agitação em intervalos regulares aumentou o crescimento em 10%. Assinalaram, também, que um período de “lag” sempre foi observado quando os inóculos são retirados de culturas na fase estacionária, e que a temperatura ideal nas culturas para o *T. cruzi* é de 28°C.

Camargo (1964) observou que o número de metacíclicos diminui durante a fase exponencial, como resultado de uma multiplicação intensiva de epimastigotos, mas que, ao final da fase de crescimento exponencial, os metacíclicos aumentam rapidamente como um resultado de diferenciação dos epimastigotos a tripomastigotos, procedendo como nas culturas velhas. Nas culturas mantidas em crescimento exponencial e com repiques diários, os epimastigotos podem multiplicar-se indefinidamente, não ocorrendo sua transformação para tripomastigotos metacíclicos. A transferência de culturas no início da diferenciação para novo meio complexo LIT interrompe o processo. Isso não acontece quando a transferência é feita para meio novo incompleto “LAS”, onde a diferen-

ciação prossegue sem interrupção. Essa observação sugere a idéia de que a diferenciação favorecida pela fase estacionária pode depender do esgotamento de um ou mais fatores do meio ou do “pool” interno dos epimastigotos indispensável para que a diferenciação ocorra.

Segundo Fernandes, Castellani & Kimura (1969), a diferenciação do *T. cruzi* em cultura começa no fim do crescimento exponencial, quando, devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, o pH do meio atinge o seu valor mais baixo aumentando novamente a partir desse ponto. Controlando o pH inicial de certo meio, os autores conseguiram estimular ou reprimir a diferenciação das culturas, enquanto crescimento em ambos os meios foi semelhante. Adicionando-se ácido acético e ácido pirúvico a um meio livre de glicose, obtém-se um pH ligeiramente ácido, onde a diferenciação é acelerada, sugerindo participação do metabolismo cíclico dos ácidos tricarbóxicos na diferenciação.

Fernandes & Castellani (1966) mostraram que no meio LIT as concentrações ideais de soro de bovino e de infuso de fígado são, respectivamente, de 10% e 5%, e que os flagelados em crescimento exponencial são muito maiores que os da fase estacionária. Estes achados foram confirmados posteriormente por outros autores.

Castellani, Ribeiro & Fernandes (1976) substituíram o infuso de fígado de boi, usualmente empregado no meio LIT, pelo infuso de coração de cão, numa con-

centração de 20%, substituindo, também, a triptose do meio por lactoalbumina. Com isso demonstraram serem o infuso de coração de cão e a lactoalbumina fatores estimulantes de diferenciação no meio HIL. Chiari (1971), utilizando o meio HIL, verificou que a concentração de 30% de infuso de coração de cão foi a que se mostrou mais eficiente para estabelecer diferenciação. Aqueles e este autor mostraram, também, que no meio HIL, um pH 6.7, com uma pré-incubação das culturas, à temperatura de 21°C, durante 48 horas, e a posterior incubação a 28°C, são fatores que estimulam a diferenciação epimastigotos — tripomastigotos em 75%, dentro de 5 dias. A mudança do pH de 7.2 para 6.7 parece essencial na intensificação do processo de diferenciação, de vez que a substituição do infuso de fígado de bovino por infuso de coração de cão no pH 7.2 não aumentou a metaciclogênese, pareceu a Chiari, durante as várias experiências realizadas, que as alterações das taxas de metaciclogênese estariam mais na dependência de determinadas condições das amostras usadas do que nas eventuais variações dos componentes complexos do meio LIT. E prosseguindo as experiências, ele observou que no 7º dia, em algumas culturas, as taxas de diferenciação atingiram o dobro das obtidas no meio LIT. No entanto, no 11º dia, as taxas de tripomastigotos metacíclicos eram mais ou menos as mesmas nos dois meios. Em outras culturas, entretanto, foi observado que as

percentagens mais elevadas de tripomastigotos metacíclicos em meio HIL apresentaram uma diferenciação que variou do dobro ao quádruplo da alcançada no meio LIT, até o final das experiências.

Fernandes & Castellani (1966), usando o meio LIT, mostraram que os flagelados na fase “log” são maiores e têm um conteúdo de RNA e proteínas mais elevado do que os da fase estacionária. Nesta fase os flagelados sintetizam proteínas e ácidos nucleicos muito mais lentamente e utilizam menos oxigênio.

Fernandes & Castellani (1966), ra (1969) estudaram a síntese de proteínas e ácidos nucleicos pela incorporação de substâncias marcadas tais como: 14C-leucina na proteína, 3H-Uridina no RNA, e 3H-timidina no DNA. Observaram que no meio HIL, em pH 7.2, os flagelados apresentam crescimento, mas não boa diferenciação, constatando, ainda, que as mais altas incorporações dos compostos acima citados deram-se no final do crescimento exponencial, diminuindo durante a fase estacionária. Entretanto, quando o *T. cruzi* cresceu no meio HIL, em pH 6.7, que favorece a diferenciação, os autores observaram que, durante o crescimento exponencial, as sínteses de proteína, de RNA e de DNA apresentavam padrões semelhantes em ambos os meios. Verificaram, ainda, que no meio HIL os flagelados passaram por novo ciclo de síntese de proteína, de RNA e de DNA, que seguiu paralelo à curva de diferenciação.

Esta explosão de síntese parece, pelo menos para o DNA, ser provocada, predominantemente, pelos tripanossomos metacíclicos e não pelos epimastigotos.

Nos estudos acima mencionados, somente a cepa Y foi usada. Chiari (1971 e 1974) comparou o grau de diferenciação das cepas Y e MR mantidas "in vitro" por diferentes períodos, após o isolamento de animais de laboratório infectados experimentalmente. As características gerais de crescimento foram confirmadas: diferentes cepas isoladas têm curva de crescimento semelhante. Entretanto, as variações que dizem respeito à diferenciação foram aparentes. A cepa Y, mantida em LIT por 3 anos, teve 50-60% de tripanossomos metacíclicos na fase estacionária, enquanto outras culturas Y mantidas em LIT por 1,5 e 7 anos, respectivamente, tiveram, quando muito, 15-20% de metacíclicos. Por outro lado, a cultura PF da Cepa Y (Menezes 1968), mantida em meio de Ágar-Sangue por 17 anos. (destes um ano no LIT), apresentaram uma proporção extremamente baixa de metacíclicos, (a5%). Culturas MR, mantidas por 2 a 6,5 anos em LIT, mostraram, geralmente, maior grau de diferenciação do que a cepa Y, culturas **essas que foram caracterizadas em 2 grupos: o primeiro dando origem a cerca de 60-65% de tripomastigotos metacíclicos e o segundo, a 30-45%.**

Chiari (1974), continuando o estudo das cepas Y e MR, mantidas "in vitro" por diferentes períodos de tempo (2-18, 5 anos),

em vários meios (LIT, HIL e Ágar-Sangue difásico), verificou que o grau de crescimento não muda significativamente com o tempo, comprovando, assim, os seus achados anteriores (1971). O grau de diferenciação foi mais alto nas culturas mantidas "in vitro" por um período mais curto, e foi maior no HIL que LIT, e maior na cepa MR do que na Y. Mostrou, finalmente, que as cepas Y77 e MR44, após uma passagem através de camundongos, recuperaram sua usual capacidade de formar uma alta percentagem de tripanossomos metacíclicos. Não se deu o mesmo em relação à cultura PFII que, após uma passagem por camundongos, manteve seu baixo grau de diferenciação.

Do exposto, o autor conclui que algumas características "inerentes" ao parasita participam na "diferenciação", bem como determinados fatores extrínsecos (idade e composição do meio de cultura), que, provavelmente, estimulam os processos morfogenéticos, e que estão, por outro lado, sob controle de mecanismos de seus repressores, e, ainda, que a manutenção das cepas "in vitro" pode ter um efeito seletivo nos fatores "inerentes".

#### EFEITOS DE DROGAS NO CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO E SÍNTESE DE PROTEÍNA E ÁCIDOS NUCLEICOS DE FORMAS DE CULTURA

Fernando e Castellani (1958 e 1959) demonstraram que os parasitas apresentam uma capacidade limitada para sintetizar purinas e

pirimidinas. Na maioria dos meios comumente empregados, esses compostos são certamente fornecidos pelo infuso de fígado ou de músculos. Os mesmos autores (1966 e 1969) fizeram várias tentativas no sentido de paralisar o desenvolvimento das formas de cultura do *T. cruzi* com inibidores de síntese de proteína e ácido nucleicos, com o objetivo de impedir a morfogênese normal e obter, desta maneira, populações de flagelados incapazes de diferenciar, mas a cepa conservando a sua antigenicidade característica. Os autores referidos (1958) e Rey & Fernandes (1962) observaram que as formas de cultura do *T. cruzi* são incapazes de sintetizar nucleotídeos de purinas e pirimidinas, com consequente utilização de bases exógenas, o que levou Castellani & Fernandes (1965), Fernandes & Castellani (1968) e Fernandes, Halsman & Castellani (1966) a tentarem inibir a incorporação das bases nitrogenadas nos nucleotídeos; e ácidos nucleicos com purinas e pirimidinas análogas. Rey & Fernandes (1962), Fernandes & Castellani (1968) e Fernandes, Halsman & Castellani (1966) conseguiram inibir a incorporação do uracil ou uridina nos nucleotídeos de pirimidina e ácidos nucleicos, utilizando o 5 fluracil (FU) e 5 fluracil desoxiribase (FU DR).

Fernandes & Castellani (1959 e 1968) bloquearam a incorporação de adenina em nucleotídeos de purina e ácidos nucleicos, usando, para isso, aminonucleosídeo de stilomicina. Já em 1965 e 1968 os mesmos autores nota-

ram que a rápida inibição da síntese do DNA por drogas provoca um crescimento desorganizado. As células aumentam de tamanho e a população cresce lentamente. Os citados pesquisadores (1968) e Fernandes, Halsman & Castellani (1966) inibiram a síntese do DNA, proteína e RNA com a mitomicina C e como resultado apareceu um crescimento desajustado, evidenciado pelo cinectoplasto com duplicação do DNA das organelas. A purimicina inibiu fortemente a síntese da proteína. A actinomicina, extensamente empregada nas culturas do *T. cruzi*, inibe fortemente a síntese de RNA e em maior concentração inibe, também, a síntese de proteína e DNA. Ficou demonstrado, ainda, que a multiplicação é bloqueada devido à não incorporação de timidina do DNA, e que o *T. cruzi* perde a infectividade para as formas de culturas de tecidos e animais, mas, aparentemente, ele não perde a antigenicidade. Estes efeitos não foram reversíveis. Não se restabeleceu a síntese normal quando a droga foi removida e o parasita colocado em meio novo.

Lehmann (1970), ao localizar desidrogenases em formas de culturas, achou que duas culturas contaminadas por *Cândida* tinham uma enzima "padrão", diferente das da mesma cepa, de culturas não contaminadas. Antes do contato com a *Cândida* ambas as cepas mostraram somente uma desidrogenase, ou desidrogenase isocítrica, ou desidrogenase láctica. Mas, dez a qua-

torze dias após o contato das cepas com a Cândida, as cepas apresentam duas enzimas. Como a Cândida possui a enzima "padrão" e o *T. cruzi* não a possui, isso sugere que transferência genética ocorrera entre Cândida e o *T. cruzi*.

#### CULTIVO DE AMASTIGOTOS EM MEIO LIVRE DE CÉLULAS

Trager (1970), discutindo as dificuldades para se obter o desenvolvimento em meio livre de células, das formas de Trypanosomatidae como as encontradas no hospedeiro vertebrado, revisou algumas condições ambientais, nas quais havia o parasita iniciado a diferenciação para as formas peculiares de amastigotas e tripomastigotas, usualmente presentes em hospedeiros mamíferos.

Chagas (1909) e Noble (1955) assinalaram que nas culturas de *T. cruzi* são encontradas, esporadicamente, formas de amastigotos isolados ou aglutinados em grandes massas.

Adler (1958) observou que, quando *T. cruzi* crescia em um meio contendo anti-soro específico, preparado em coelho, grandes colônias de amastigotas pareciam originar-se por divisão binária.

Silva (1959) verificou que formas amastigotas ocorrem em sangue infectado, mantido em temperatura ambiente.

Trejos, Godoy, Greenblatt & Cedillas (1963) também constataram essas formas amastigotas nos fluidos de cultura de tecidos infectados.

Brener & Chiari (1965) mostraram, em culturas novas de três cepas de *T. cruzi*, recentemente isoladas de formas sanguíneas, que os trimastigotos desenvolviam-se regularmente em amastigotos, os quais, gradualmente, mudavam-se para epimastigotos. Os autores aventam a possibilidade de que as formas largas e curtas de tripomastigotos sanguíneos são propensas a se transformarem em amastigotos do que as formas delgadas.

Pan (1968) cultivou o *T. cruzi* periódica e predominantemente como leishmaniformes, em meio livre de células. Usando o meio TPH (triptose, sais, soro de cavalo, sangue de coelho e fluido de cultura de tecido de Ender) e, aumentando a temperatura para 35, 5°C, iniciou com uma cultura contendo 98% de epimastigotos e, após 15 repiques, obteve 90% de formas amastigotas. A temperatura de 24, 5°C, a maioria das formas de culturas continuam a crescer no meio TPH como epimastigotos, mostrando assim que a temperatura foi o fator primordial na morfogênese da predominância de amastigotos. O referido autor (1971), trabalhando com um meio mais simples (meio de cultura de tecido modificado 199, sangue de coelho hemolisado, plasma de galinha e extrato de embrião de galinha), obteve mais de 90% de amastigotos em qualquer temperatura. Um novo meio, sem o extrato de embrião de galinha, mais ainda contendo plasma de galinha, permitiu o cultivo periódico de leishmaniformes do mesmo modo, sem

restrição da temperatura (24-36°C).

Warren (1958) e Warren & Borsos (1959) julgam que o soro de galinha exerce um importante papel na elucidação do desenvolvimento de amastigotos, em culturas livres de células. O soro de galinha provavelmente ajuda a eliminar os epimastigotos remanescentes, aparentemente porque ele contém um fator lítico anti-epimastigoto.

Hutner, Baker & Frank (1972) acham, como fora observado anteriormente, que os amastigotos estão aparentemente mais ajustados para sobreviver em temperaturas mais altas do que os epimastigotos, e que se assemelham aos amastigotos de *Leishmania*, os quais estão igualmente mais bem equipados para sobreviver a 37°C do que os promastigotos. Talvez os estágios móveis tenham também uma maior exigência de energia e, devido a uma alta temperatura, a capacidade biossintética diminua.

Baker & Price (1973) observaram que o desenvolvimento de uma linha da cepa Sonia do *T. cruzi*, mantida "in vitro", era quase inteiramente como amastigotos aglutinados. O modo de desenvolvimento do parasita em meio líquido foi o mesmo nas temperaturas de 25°C, 28°, 31.° e 34°C. Três semanas após a inoculação, os parasitas eram quase todos amastigotos, mas, subsequentemente os epimastigotos foram as primeiras formas a aparecer, e, por último, os tripomastigotos, que se tornaram predominantes. Culturas mantidas a

37°C não se desenvolveram e sobreviveram somente durante 1-2 semanas.

#### CONCLUSÃO

Ao dar início às conclusões finais deste estudo, realizado através da literatura sobre a biologia do *T. cruzi*, queremos deixar aqui consignado um voto de louvor ao Prof. Zigman Brener que, no seu exaustivo trabalho "Biology of Trypanosoma Cruzi", reuniu tudo quanto de sério e objetivo já se escreveu a respeito do protozoário descoberto por Carlos Chagas.

Embora o grande esforço despendido por inúmeros cientistas, verificamos que muito pouco se tem feito, por exemplo, para definir os compostos complexos, usados nos meios de cultura, não se conseguindo, em decorrência, estabelecer, com segurança, as exigências nutricionais do parasita. É de ser lembrado que os trabalhos de Boné & Parent trouxeram uma contribuição importante como subsídio para o futuro conhecimento da nutrição do *T. cruzi*. De tudo se vê que os conhecimentos da biologia do *T. cruzi* em meio de cultura não permitam, ainda, afirmações conclusivas, tanto sobre a nutrição, como a respeito do crescimento ou de sua diferenciação. Todavia, pelos dados já obtidos e estudos realizados, evidencia-se que, além de fatores extrínsecos, tais como PH, composição do meio, temperatura, idade da cepa etc., fatores intrínsecos, ainda desconhecidos, ou mal estudados, estão, também, implicados.

## SUMMARY

GROWTH AND DIFFERENTIATION OF THE *T. cruzi* IN LIQUID MEDIUM

In front of the variation of the *T. Cruzi*'s behaviour in the different culture, mediums, the author proposes to review the works realized about the growth and differentiation this "Trypanosomatidae" in the complex liquid mediums and in the semi-synthetical. Stayed evidenced in this research the influence of the extrinsic factors: pH, medium's composition, temperature, strains' age etc., are beyond of the intrinsic factors still unknown or insufficiently studied, the responsables by the growth and the differentiation of the *T. Cruzi*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, S. 1958. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 52: 282-301.
- BONÉ, G. J., PARENT, G. 1963. *J. Gen. Microbiol.* 31: 261-66.
- BRENER, Z., CHIARI, E. 1965. *J. Parasitol.* 51: 922-26.
- BRENER, Z. 1973. *Annual Review of Microbiology* vol. 27
- BAKER, J. R. & PRICE, J. 1973. *Int. J. Parasit.* vol. 3, n.º 4, 549-51.
- CAMARGO, E. P. 1964. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6: 93-100.
- CASTELLANI, O., FERNANDES, J. F. 1965. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 7: 215-82.
- CASTELLANI, O., RIBEIRO, L. V., FERNANDES, J. F. 1967. *J. Protozool.* 14: 447-51.
- CHAGAS, C. 1909. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- CHIARI, E. 1971. *Crescimento, diferenciação e infectividade de formas de cultura do Trypanosoma cruzi mantidas em laboratório por diferentes períodos.* Thesis. Univ. Fed. Minas Gerais. 72 pp.
- CHIARI, E. 1974. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* — vol. 16, n.º 2, 81-7.
- CITRI, N. GROSSOWICZ, N. 1954. *Nature* 173: 1100-1.
- CITRI, N. GROSSOWICZ, N. 1955. *J. Gen. Microbiol.* 13: 273-78.
- FERNANDES, J. F., CASTELLANI, O. 1958. *Exp. Parasitol.* 7: 224-33.
- IBID 1959 — 8: 480-85.
- IBID 1966 — 18: 195-202.
- FERNANDES, J. F., CASTELLANI, O. 1968. *Proc. Int. Pharmacol. Meeting.* 3rd 1: 93-104.
- FERNANDES, J. F., CASTELLANI, O., KIMURA, E. 1969. *Genet. Suppl.* 61: 213-26.
- FERNANDES, J. F., HALSMAN, M., CASTELLANI, O. 1966. *Exp. Parasitol.* 18: 203-10.
- HUTNER, S. H., BAKER, H., FRANK, O., COX, D. 1972. *Biology of Nutrition*, ed R. N. Fiennes, 85-117. Oxford: Pergamon.
- LAMBRECHT, F. L. 1966. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8: 249-54.
- LEHMANN, D. L. 1970. *Ann. Trop. Parasitol.* 64: 331-34.
- LITTLE, P. A., SUBBAROW, Y. 1945. *J. Bacteriol.* 50: 57-69.
- LITTLE, P. A., OLESON, J. J. 1951.
- MENEZES, H. 1968. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 10: 1-4.
- MONTES, G. B. C. 1970. *Estudo comparativo do crescimento de amostras de Trypanosoma cruzi.* Thesis Univ. Fed. Rio de Janeiro. 48 pp.
- NAKAMURA, M. 1967. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61: 792-94.
- NOBLE, E. R. 1955. *QUART. Rev. Biol.* 30: 1-28.
- PAN, C. T. 1968. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17: 823-32.
- PAN, C. T. 1971. *J. Protozool.* 18: 556-60.
- REY, L., FERNANDES, J. F. 1962. *Exp. Parasitol.* 12: 55-60.
- REY, L. 1973 — *Parasitologia.* Rio de Janeiro, Ed. Guanabara 1973.
- SAMPATH, A., LITTLE, P. 1949. *J. BACTERIOL.* — 57: 265.
- SILVA, L. H. P. 1959. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1: 89-118.
- PESSOA, S. B. — *Parasitologia médica.* Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1972.
- TRAGER, W. 1970. *J. Parasitol.* 56: 564-66.
- TREJOS, A., GODOY, G. A., Greenblatt, G., CEDILLOS, R. 1963. *Exp. Parasitol.* 13: 211-18.
- WARREN, L. G. 1958. *Exp. Parasitol.* 7: 82-91.
- WARREN, L. G. 1960. *J. Parasitol.* 46: 529-39.
- WARREN, L. G., BORSOS, T. 1959. *J. Immunol.* 82: 585-90.