

---

**MORFOMETRIA DE TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS**  
**DE *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**  
**(KINETOPLASTIDAE, TRYPANOSOMATIDAE)**

---

Luciamáre Perinetti Alves Martins, <sup>1</sup> Roberto Esteves Pires Castanho, <sup>1</sup> Alex Silva de Gusmão <sup>1</sup> e João Aristeu da Rosa <sup>2</sup>

RESUMO

Este estudo teve por objetivo produzir subsídios numéricos para auxiliar a caracterização das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* quanto às suas dimensões, em razão da dificuldade para classificá-las apenas por seu fenótipo morfológico observado na visualização microscópica. Foi realizado, então, um estudo experimental em 150 formas tripomastigotas, obtidas de cinco cepas de *T. cruzi* recentemente isoladas, aplicando-se um tratamento estatístico e matemático. Os resultados mostraram que existe forte correlação entre as variáveis comprimento (C) e largura (L), sendo possível definir intervalos para agrupá-las segundo o coeficiente C/L. Assim, as formas pequenas apresentaram C/L menor ou igual a 7,06, as médias apresentaram C/L maior que 7,06 e menor que 8,12 e as grandes apresentaram C/L maior ou igual a 8,12.

DESCRITORES: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas. Morfometria.

INTRODUÇÃO

Desde a descrição do protozoário *Trypanosoma cruzi* em 1909, por Carlos Chagas, as variações das características morfológicas da forma tripomastigota do parasito chamaram a atenção de vários pesquisadores (3, 5, 6, 16, 17). Assim, pesquisas foram realizadas com a intenção de diferenciar esse flagelado das outras espécies do gênero (3, 17).

A aplicação de métodos estatísticos com essa finalidade iniciou-se com trabalhos de Pearson (12, 13), que utilizou o teste qui-quadrado para demonstrar que

---

1 Faculdade de Medicina de Marília, Marília, SP, Brasil.

2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, Araraquara, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Prof<sup>o</sup> Luciamáre Perinetti Alves Martins. Disciplina de Parasitologia/FAMEMA. Av. Monte Carmelo 800, 17519-030 Marília, SP, Brasil. E-mail: luciapam@famema.br

Recebido para publicação em: 18/12/2007. Rcvisto em: 26/6/2008. Aceito em: 21/7/2008.

formas tripomastigotas morfológicamente diferentes pertenciam à mesma cepa. Em seguida, Hoare e Broom (8) utilizaram a diferença entre as médias aritméticas de duas distribuições de frequência, em relação ao erro padrão da diferença entre as médias e o qui-quadrado com nível de significância de 0,01, para comparação biométrica entre duas espécies de *Trypanosoma*. Concluíram que a aplicação desses métodos no comprimento do corpo foi satisfatória para diferenciar as espécies estudadas.

Em 1943, Dias e Freitas Filho (6), utilizando os mesmos testes estatísticos de Hoare e Broom (8), observaram que apenas as medidas do comprimento total não eram satisfatórias para caracterizar as formas tripomastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi*. Por isso, os pesquisadores aplicaram esses testes estatísticos sobre o cálculo do “índice nuclear médio”, encontrando resultados muito animadores para caracterizar morfológicamente o parasito.

Embora muitos trabalhos sobre as variações morfológicas do *T. cruzi* deixem claro que a morfometria constitui um importante método na caracterização biológica das cepas, ainda não foi estabelecido consenso sobre a relação do polimorfismo dos tripomastigotas sanguíneos com a parasitemia ou a patogenia. Isso se deve, provavelmente, à falta de padronização de equipamentos, técnicas utilizadas e formas de observação, como referido por Ferrioli Filho et al. (7). Conseqüentemente, ficam apenas as observações pessoais dos pesquisadores que as analisaram.

Portanto, a intenção deste estudo experimental é fornecer subsídios numéricos, por meio da aplicação de métodos estatísticos e matemáticos em dois parâmetros morfométricos — comprimento e largura —, para o estudo morfológico das formas tripomastigotas sanguíneas e a caracterização biológica de cepas de *T. cruzi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Foram estudados tripomastigotas sanguíneos de cinco cepas de *T. cruzi* recentemente isoladas de triatomíneos silvestres, *Triatoma rubrovaria*, do estado do Rio Grande do Sul, assim denominadas: QJ1, QJ3, QM1, QM2 e QB1 (11).

### Análise morfométrica

Para cada cepa, lotes de três camundongos *Swiss* foram previamente infectados e mantidos em biotério, conforme as resoluções do COBEA (15). Assim, para a confecção das lâminas, estabeleceu-se o 15º dia pós-infecção, ou seja, o início do pico da parasitemia, segundo estudos de Martins (11). Para cada cepa foram confeccionadas cinco lâminas de esfregaço e de gota espessa, coradas pelos métodos de Giemsa, segundo Rosenfeld e Giemsa, respectivamente, as quais foram observadas em microscópio óptico Leica Leitz DMRXE, com objetiva de imersão

(100 x) e ocular 10x. Neste microscópio estava acoplada uma filmadora Leica DC 100, pela qual foi realizada a captura das formas. A mensuração foi realizada em micrômetros por um analisador de imagem computadorizado Leica Qwin, utilizando o software Leica Lida (Image Database and Archive System).

### Cálculo da amostra

Para calcular o tamanho da amostra, realizou-se um estudo piloto com 30 formas tripomastigotas (seis formas de cada cepa), admitindo-se um erro relativo de até 4% diante da média da relação C/L, com grau de confiança de 95%. A partir desses dados, da média e desvio padrão de C/L obtidos no estudo piloto, a amostra mínima para a realização deste trabalho foi calculada em 146 formas. Desse modo, foram capturadas aleatoriamente 150 formas.

### Parâmetros mensurados

De cada uma das 150 formas tripomastigotas, foram mensurados o comprimento (C) e a largura do corpo (L), criando-se uma variável C/L. Para aceitar a hipótese de normalidade da variável C/L, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks, obtendo-se  $p > 0,10$ . Essas formas foram, então, ordenadas segundo a variável C/L e, em seguida, divididas em três grupos, cada grupo reuniu um terço das formas analisadas, ou seja, 50 formas. Assim, o primeiro terço compreendeu as formas pequenas; o segundo terço, as formas médias e o terceiro terço, as formas grandes.

### Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram analisados pelos seguintes métodos: análise de regressão, teste qui-quadrado, teste de Shapiro-Walkis, correlação de Pearson e análise descritiva. Por este último foram estudados aspectos como: média, desvio padrão, percentis, mínimo e máximo. Os Softwares utilizados foram Minitab 13 e SPSS 12.

## RESULTADOS

Os valores relativos a média, desvio padrão, mínimo e máximo, utilizados para a realização da estatística descritiva das 150 formas tripomastigotas de *T. cruzi* estudadas, podem ser observados na Tabela 1.

Ao utilizar a correlação de Pearson, pode-se observar que, entre as variáveis largura, comprimento e C/L, existe uma correlação linear de Pearson razoável, cujos valores estão expressos na Tabela 2.

A Tabela 2 demonstra que existe uma razoável correlação linear de Pearson inversa entre as variáveis largura e C/L.

**Tabela 1.** Valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo das variáveis largura, comprimento e C/L em 150 formas tripomastigotas de *T. cruzi* mensuradas

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Largura(μm)	1,76	0,28	1,17	2,76
Compr(μm) *	13,20	1,66	9,25	17,38
C/L	7,65	1,22	4,69	11,58

\* comprimento do corpo

**Tabela 2.** Coeficiente da correlação de Pearson entre as variáveis largura, comprimento e C/L de 150 formas tripomastigotas

Variáveis	Correlação de Pearson
Largura vs Comprimento	0,359
Largura vs C/L	-0,680
Comprimento vs C/L	0,412

Assim, com base nessa análise descritiva, foram classificadas como *pequenas* as formas tripomastigotas que apresentaram coeficiente C/L compreendido dentro do primeiro terço, ou seja, abaixo do percentil 33, com  $C/L \leq 7,06$ . As formas *médias* foram aquelas compreendidas dentro do segundo terço, entre os percentis 33 e 66, apresentando o coeficiente C/L no seguinte intervalo:  $7,06 < C/L < 8,12$ . As formas *grandes* estão compreendidas dentro do terceiro terço, com percentil acima de 66, e apresentaram o coeficiente  $C/L \geq 8,12$ , conforme demonstra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de média, desvio-padrão (DP), mínimo e máximo das 150 formas tripomastigotas, classificadas como pequenas (P), médias (M) e grandes (G), de acordo com o coeficiente C/L

	Largura (μm)			Comprimento (μm)			C/L		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G
Média	1,99	1,71	1,57	12,51	13,06	14,03	6,34	7,63	8,99
DP	0,27	0,19	0,21	1,39	1,51	1,71	0,58	0,29	0,71
Mínimo	1,50	1,22	1,17	9,97	9,25	9,98	4,69	7,07	8,12
Máximo	2,76	2,08	2,02	15,59	15,65	17,38	7,06	8,06	11,58

DP = Desvio-Padrão, P= pequena, M= média, G= grande

A correlação de Pearson entre as variáveis largura e comprimento está demonstrada na Tabela 4, analisada dentro da classificação proposta para as 150 formas tripomastigotas de *T. cruzi* estudadas.

**Tabela 4.** Resultado do coeficiente da correlação de Pearson, Equação da Reta de Regressão de Largura *versus* Comprimento e Coeficiente Angular aplicada nas formas classificadas como pequenas, médias e grandes

Classificação	Corr Pearson	Equação	Coef. Angular
Pequena	0,669	Compr = 5,64 + 3,46 Largura	3,46
Média	0,944	Compr = 0,41 + 7,39 Largura	7,39
Grande	0,845	Compr = 3,22 + 6,89 Largura	6,89

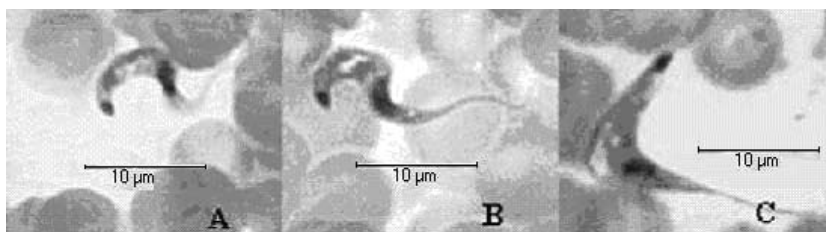
O resultado da análise estatística aplicada nas 150 formas tripomastigotas pode ser observado na Tabela 5. A aplicação do teste qui-quadrado mostra que as cinco cepas não têm as mesmas características morfológicas ( $\chi^2 = 19$ ;  $p = 0,015$ ).

**Tabela 5.** Classificação das 150 formas tripomastigotas em pequenas, médias e grandes, isoladas das cinco cepas de *T. cruzi* segundo o coeficiente C/L

Cepa	Classificação			Total
	Pequena	Média	Grande	
QJ1	10	8	12	30
QJ3	7	13	10	30
QM1	4	10	16	30
QM2	16	7	7	30
QB1	13	12	5	30
Total	50	50	50	150

$\chi^2 = 19$ ,  $p = 0,015$

A Figura 1 mostra três formas tripomastigotas (A, B e C) que possuem larguras aproximadamente iguais (A= 1,99 $\mu$ m; B= 1,98 $\mu$ m; C= 2,01 $\mu$ m), mas variam no comprimento do corpo (A= 11,04 $\mu$ m; B= 14,99 $\mu$ m; C= 17,01 $\mu$ m), sendo classificadas como pequenas, médias e grandes, respectivamente, segundo o coeficiente C/L (A= 5,54, B= 7,57; C= 8,46).



**Figura 1.** Formas tripomastigotas classificadas como pequenas (A), médias (B) e grandes (C), segundo o coeficiente C/L, mensuradas em objetiva de imersão (100X) e coradas pelo método de Giemsa, segundo Rosenfeld.

## DISCUSSÃO

Embora vários autores (1, 2, 3, 5, 6, 7) tenham utilizado o aspecto morfológico observado nas diferentes cepas de *T. cruzi* como mais um elemento para a sua caracterização, não foram estabelecidos valores numéricos que determinem intervalos para classificar as formas tripomastigotas sanguíneas.

A aplicação de um tratamento estatístico e matemático em 150 formas tripomastigotas que haviam sido estudadas por Martins, em 2005(11), mostrou que existe relação entre as variáveis largura e comprimento do corpo, sendo possível a criação de uma variável C/L, que permite corrigir eventuais distorções na mensuração das formas tripomastigotas e classificá-las, segundo o coeficiente C/L, em pequenas, médias e grandes.

O estudo estatístico dessas 150 formas tripomastigotas revelou ser fraca a correlação de Pearson entre as variáveis largura e comprimento. No entanto, quando essas variáveis são comparadas com as classificações propostas, encontra-se uma forte correlação linear de Pearson (Tabela 4). Essa constatação mostra que a classificação em pequena, média e grande, com base no coeficiente C/L, tem um caráter distintivo mais adequado e prático do que comparar a largura e o comprimento separadamente.

Analisando a classificação e os achados da Análise de Regressão (Tabela 4), tendo como parâmetro o coeficiente angular das Retas Ajustadas da Análise de Regressão, observa-se que, ao estudar as formas pequenas, médias e grandes, o comprimento aumentou de forma mais significativa do que a largura, pois os coeficientes angulares são maiores que 1. Ou seja, as formas pequenas têm, comparativamente, um comprimento menor e uma largura maior do que as formas grandes, sendo este o eixo norteador para a classificação a que se propõe este estudo.

Martins, em 2005 (11), ao observar formas tripomastigotas de cinco cepas de *T. cruzi* recentemente isoladas, notou que aquelas que apresentavam larguras semelhantes, mas com variação no comprimento do corpo, induziam dúvidas na classificação em larga, intermediária e delgada. Essa constatação pode ser comprovada na Figura 1, na qual as três formas tripomastigotas possuem praticamente a mesma largura, ou seja, A= 1,99 $\mu$ m; B= 1,98 $\mu$ m; C= 2,01 $\mu$ m, mas de acordo com o coeficiente C/L são classificadas em pequenas (A), médias (B) e grandes (C), em virtude do comprimento do corpo.

A análise microscópica das cepas QJ1, QJ3, QM1, QM2 e QB1, estudadas por Martins em 2005 (11), não mostrou um mesmo padrão morfológico, o que foi confirmado pelo estudo estatístico. Foram encontradas cepas QM1 e QJ1 com predomínio de formas grandes; QJ3, com predomínio de médias; QB1 mostrou formas médias e pequenas e em QM2 houve predomínio de formas pequenas, apesar de todas terem sido isoladas de uma mesma localidade do estado do Rio Grande do Sul. Neste trabalho não foram encontradas cepas com predomínio de

formas extremamente largas, como as observadas por Brener e Chiari, em 1963 (5), e Schlemper Jr. et al., em 1986 (14), quando estudaram cepas da região sul do Brasil, isoladas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, respectivamente.

Os estudos de Belda Neto (4) e Martinez (10) não relacionaram os dados biométricos dos tripomastigotas sanguíneos com a patogenia de diversas cepas de *T. cruzi* isoladas de casos humanos e de triatomíneos silvestres, respectivamente, da mesma forma que não foi possível relacionar os resultados deste trabalho com o de Martins (11), que realizou estudo histopatológico com as mesmas cepas usadas na referida pesquisa. Segundo Martins (11), as cinco cepas mostraram-se patogênicas em animais de laboratório, revelando processo inflamatório em fígado, músculo cardíaco e esquelético durante a fase aguda e também em cólon na fase crônica (11).

Para Macedo et al. (9), a diversidade morfológica das formas sanguíneas são fenômenos epigenéticos, o que corrobora a publicação de Schlemper Jr. et al. (14), segundo a qual a morfologia é uma característica intrínseca do parasito.

Portanto, o coeficiente C/L revela-se um promissor parâmetro distintivo das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, podendo ser utilizado como método na caracterização biológica de cepas do parasito.

## ABSTRACT

Morphological study about *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) bloodstream trypomastigotes

The objective of this work was to set up numerical parameters to help in the characterization of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes based on their dimensions, considering the difficulty to characterize *T. cruzi* tripomastigotes by its morphological phenotype on microscopic visualization. Therefore, a statistic analysis was performed on the length and width of 150 tripomastigote forms of five *T. cruzi* strains recently isolated. The results showed a strong correlation between length (C) and width (L) variables and three different groups were defined according to the coefficient C/L. Thus the smallest forms exhibited C/L less than or equal to 7.06; medium forms presented a C/L interval between 7.06 and 8.12 and the largest forms showed a C/L equal to or higher than 8.12.

KEY WORDS: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotes. Morphological study.

## AGRADECIMENTOS

Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Pesquisa financiada pela FUNDUNESP

## REFERÊNCIAS

1. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (contribuição ao estudo geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev Patol Trop* 3: 65-121, 1974.
2. Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop* 18 (supl): 39-46, 1985.
3. Barretto MP. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 7: 305-315, 1965.
4. Belda Neto FM. Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Araraquara [Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia e Odontologia/UNESP], 1973.
5. Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 220-224, 1963.
6. Dias E, Freitas Filho L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 38: 427-436, 1943.
7. Ferrioli Filho F, Barreto MP, Carvalheiro JR. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi* isoladas de casos humanos da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2: 1-8, 1968.
8. Hoare CA, Broom JC. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. *Trans Royal Society Trop Med Hygiene* 5: 517-534, 1938.
9. Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* 5 march, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004118h.htm>.
10. Martinez I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae) coletados em ambiente silvestre. Araraquara [Tese de Doutorado em Parasitologia/UNESP], 2004.
11. Martins LPA. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a partir de triatomíneos silvestres do Estado do Rio Grande do Sul. Araraquara [Tese de Doutorado em Parasitologia/UNESP], 2005.
12. Pearson K. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples from the same population. *Biometrika* 1: 250-254, 1911.
13. Pearson K. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples from the same population, with special reference to recent work on the identity of *Trypanosoma* strains. *Biometrika* 10: 85-143, 1914.
14. Schlemper Jr BR, Ishida MM, Steindel M, Gargioni R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 191-198, 1986.
15. Sogayar R. *Ética na experimentação animal: Consciência & Ação*. FEPAP. Botucatu, 2006.
16. Silva LHP. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1: 99-118, 1959.
17. Sousa MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (supl I): 205-210, 1999.