

## PARASITEMIA CONSTANTE DURANTE 24 HORAS CONSECUTIVAS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*\*

Ítalo A. Sherlock

*Observou-se a parasitemia horária do Trypanosoma cruzi através de hemoscopias e de xenodiagnósticos horários, em camundongos na fase aguda da infecção e em cobaias e camundongos na fase crônica. O número de T. cruzi no sangue e o número de triatomíneos positivos por xenodiagnósticos foi freqüente e variável mas não foi cíclico durante as 24 horas do dia. A qualquer hora, tanto na fase aguda como na crônica, o T. cruzi pôde ser detectado através hemoscopias e xenos. Não foi constatado um ritmo circadiano para o T. cruzi.*

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia horária. Ritmo circadiano. Xenodiagnóstico.

O ritmo circadiano e as modificações cíclicas nos níveis de parasitemias, expressam uma verdadeira seleção natural para assegurar o contato máximo entre o parasita e o vetor.

Talvez, como foi demonstrado para algumas espécies de tripanossomas, inclusive para o *Trypanosoma minasense*<sup>4, 5</sup>, pudesse haver um ritmo nictemeral do *Trypanosoma cruzi* que, através da hemoscopia ou do xenodiagnóstico, facilitasse a detecção do flagelado em certos períodos do dia. Por outro lado, talvez permitisse correlacionar, através de suas atividades nos ecossistemas naturais, certas espécies de mamíferos que são encontradas naturalmente infectadas pelo *T. cruzi* com seus vetores e daí esclarecer seus papéis na epidemiologia da doença de Chagas.

As poucas observações realizadas sobre a parasitemia horária e sobre a positividade horária do xenodiagnóstico para o *T. cruzi* durante as 24 horas do dia, trazem poucos esclarecimentos para o fato<sup>1 12 14 16</sup>. Por esse motivo, realizamos experiências utilizando camundongos e cobaias em diferentes fases da infecção, durante as 24 horas do dia, na tentativa de demonstrar uma ritmicidade dos índices de parasitemia para o *T. cruzi*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Animais inoculados*

Foram realizados dois tipos de experiências. Um primeiro tipo com 7 camundongos brancos com

pesos aproximados, identificados por ordem alfabética de A a G, em fase aguda da infecção, cerca de 10 dias após a inoculação, quando a parasitemia era elevada. Hemoscopias e xenodiagnósticos horários simultâneos com *Rhodnius neglectus* foram feitos somente nos camundongos ABC. Os camundongos D E F G submeteram-se apenas a hemoscopias horárias. Esse primeiro experimento durou 72 horas consecutivas de três dias, utilizando-se os camundongos com períodos de repouso intercalados, conforme o esquema que adiante apresentamos.

Um segundo tipo de experiência, foi feito com 3 cobaias e 10 camundongos, quando tinham 90 dias de inoculados e a hemoscopia mostrava escassos tripanossomas circulantes. Este experimento foi realizado com todos os animais durante 24 horas consecutivas e neles foram feitos simultaneamente hemoscopias e xenodiagnósticos com ninfas em 1º estágio de *Panstrongylus megistus*. Os animais inoculados tinham aproximadamente o mesmo peso corporal, respectivamente nos grupos de roedores e cobaias.

#### *Cepa de Trypanosoma cruzi*

A cepa de tripanossoma usada nos dois tipos de experiência e que tinham as características morfológicas e biológicas do *T. cruzi*, foi isolada de uma cobaia encontrada naturalmente infectada, numa residência da área de São Felipe, Bahia. Cerca de 70.000 tripanossomas contados pelo método de Brener<sup>5</sup>, foram inoculados por via intraperitoneal nos animais sadios. A confirmação das infecções foi feita através do encontro do flagelado no sangue colhido da cauda dos camundongos e da orelha das cobaias.

\* Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Rua Valdemar Falcão 121, 40 000 Salvador, Bahia.

Recebido para publicação em 27/2/84.

### Triatomíneos

Os triatomíneos utilizados foram provenientes das colônias que mantínhamos no laboratório. No primeiro experimento, para os camundongos ABC usamos um total de 250 ninfas de *R. neglectus* em 4º ou 5º estágios, 5 por camundongo, em cada horário.

Como uma ninfa de *R. neglectus* 4º ou 5º estágio suga de cada vez de 90 a 120 mg de sangue<sup>2</sup>, para evitar a espoliação sanguínea dos roedores, no segundo experimento, passamos a utilizar de ninfas de 1º estágio de *P. megistus*, que tínhamos observado, naquela oportunidade, se infectarem excelentemente bem, tanto em camundongos como em cobaias. Estas ninfas, desde recém-nascidas, eram mantidas em jejum por 10 dias, sendo usado o total de 1.720 exemplares, cerca de 15 ninfas por animal de cada horário, para essa experiência com os 10 camundongos e as 3 cobaias.

### Xenodiagnósticos

Os xenos eram feitos de hora em hora, por duas pessoas, revezadas por outras duas, a cada turno de 6 horas de trabalho contínuo. Logo após colhido o sangue para a hemoscopia, colocavam-se os triatomíneos para sugar diretamente sobre o animal do horário (cobaia ou camundongos), estando o animal contido num cilindro de tela de arame de malhas largas. Este era então colocado dentro de um vasilhame de vidro onde estavam os triatomíneos. Após 30 minutos, os triatomíneos engurgitados que se haviam alimentado, eram retirados e guardados em tubos de vidro com suportes de papel de filtro e com as devidas anotações. Após 20 dias, os tubos digestivos dos triatomíneos eram examinados ao microscópio, após a dissecação em solução salina, entre lâmina e laminula.

### Hemoscopias

Para as hemoscopias horárias o sangue era colhido, da cauda do camundongo ou da orelha da cobaia, após um pequeno corte com tesoura, por meio de microtubos heparinizados para microhematócritos. Estes tubos da marca "Pre-Cal-Adams", eram calibrados para 77 mm  $\pm$  0,5 de altura e 0,55  $\pm$  0,05 de diâmetro interno, enchendo-se de sangue até a marca 15 mm de altura, fornecendo, portanto, um volume de 3,09 mm<sup>3</sup>, de acordo com a fórmula  $V = \pi R^2 h$ . Logo após colhido, o sangue era espalhado numa lâmina com uma gota de líquido de Errecart e após seco, era

fixado e corado pelo Giemsa. Os tripanossomas eram cuidadosamente contados ao microscópio, em todo o conteúdo do esfregaço.

Das cobaias era possível colherem-se duas porções de sangue: uma parte servia para o exame do esfregaço corado pelo Giemsa e a outra para o exame imediato a fresco em solução salina. Neste segundo método, cometemos freqüentes erros de contagem, devido principalmente ao movimento do parasita e a pressa que o experimento exigia. Por este motivo, os resultados deste último tipo de exame não foram levados em consideração para a análise final quantitativa. O seu valor foi mais de confirmação qualitativa da positividade horária.

### Horários de Investigação

No primeiro experimento, devido ao receio de exaurir a volemia de todos os camundongos e ter a experiência anulada, as hemoscopias com xenos simultâneos foram feitas somente nos 3 camundongos AB e C, enquanto que nos outros 4 camundongos D E F G foram feitas somente hemoscopias nos horários consecutivo, conforme já mencionamos.

Para os camundongos ABC tivemos de lançar mão de um esquema de utilização dos animais por períodos de 6 horas, intercalados por períodos de 12 horas de repouso, durante o tempo total das 72 horas de observação de cada animal. Desta forma foi possível observar a parasitemia de cada camundongo do grupo ABC, nos quatro turnos de 6 horas que compõem as 24 horas de um dia, conforme o esquema a seguir:

Horas e Camundongos				
	13h às 19h	19h à 01h	01h às 07h	07h às 13h
1º dia	A	B	C	A
2º dia	B	C	A	B
3º dia	C	A	B	C

No segundo experimento, tanto as cobaias como os camundongos foram testados com hemoscopias e xenos simultâneos durante as 24 horas consecutivas de um dia, tendo os animais apenas 20 minutos de repouso em cada horário, que correspondia ao término do horário de um xeno e começo do xeno do horário seguinte. Nos intervalos, os animais eram

colocados em caixas com alimento e água. Ambos os experimentos foram iniciados às 13 horas.

## RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 estão os resultados obtidos na primeira experiência com xenos e hemoscopias na fase aguda da infecção. Houve positividade das hemoscopias em todos os horários do dia, com todos os animais observados. Fato semelhante ocorreu em quase todos os horários dos xenos feitos nos camundongos ABC. As quedas nos índices de positividade dos xenos nestes camundongos, foram irregulares e não coincidiram nos três animais observados. Da mesma forma, não foi verificada a existência de

maiores índices de positividade dos xenos para determinados períodos do dia.

As hemoscopias, embora positivas em qualquer hora do dia ou da noite, mostraram irregularidade para o número de tripanossomas, não havendo contudo predominância do número de flagelados em determinados horários.

No segundo experimento, quando a infecção era mais crônica e o número de tripanossomas no sangue era muito baixo, os resultados parecem ter o mesmo significado da experiência anterior. Tanto nas cobaias como nos camundongos, conforme os dados da Tabela 5, as hemoscopias também demonstraram números

Tabela 1 - Positividade de xenodiagnóstico com *Rhodnius neglectus* em camundongos na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Hora do dia	Camundongo A (+)		Camundongo B (+)		Camundongo C (+)		Total		
	Nº Ninfas		Nº Ninfas		Nº Ninfas		Nº Ninfas		%
	Ex.	Pos.	Ex.	Pos.	Ex.	Pos.	Ex.	Pos.	
14	3	3	3	1	3	1	9	5	55,5
15	3	3	3	3	3	1	9	7	78
16	3	3	3	3	3	3	9	9	100
17	3	1	3	3	3	0	9	4	44,4
18	3	3	2	2	3	1	8	6	75
19	3	3	3	3	3	0	9	6	67
20	3	2	3	2	3	3	9	7	78
21	3	3	3	0	3	2	9	5	55
22	3	1	3	3	3	2	9	6	67
23	3	2	3	3	3	3	9	8	89
24	3	2	3	3	3	2	9	7	78
01	3	2	3	2	(++)	—	6	4	67
02	3	1	3	3	3	1	9	5	55,5
03	3	2	3	3	3	2	9	7	78
04	2	1	3	1	3	3	8	5	62,5
05	3	2	5	4	3	2	11	8	73
06	3	2	3	3	3	2	9	7	78
07	5	3	3	1	3	3	11	7	64
08	3	3	3	1	2	1	8	5	62,5
09	3	3	3	1	3	1	9	5	55,5
10	3	3	3	3	2	0	8	6	75
11	3	3	3	3	3	1	9	7	78
12	3	3	4	0	3	1	10	4	40
13	3	1	1	1	3	0	7	2	28,5
Total	73	55	72	52	67	35	212	142	67

(+) Correspondem aos camundongos ABC da Tabela 2.

(++) Morreu durante a experiência.

Tabela 2 – Número de trigomastigotas por 3,09 mm<sup>3</sup> de sangue nas horas do dia em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* (fase aguda)

Hora do dia	Camundongos e número de <i>T. cruzi</i> por 3,09 mm <sup>3</sup> de sangue							
	A (+)	B (+)	C (+)	D	E	F	G	Total
14	244	294	275	873	741	88	17	2.532
15	402	609	74	713	72	36	358	2.264
16	277	1.010	759	470	173	99	129	2.917
17	41	985	112	895	443	23	5	2.504
18	421	821	19	1.151	22	13	46	2.493
19	206	107	3	557	324	27	(**)	1.224
20	25	51	196	120	17	32	81	522
21	25	423	1.178	705	913	231	18	3.493
22	98	64	2.121	949	1.408	22	42	4.704
23	18	263	772	340	137	293	134	1.957
24	49	622	1.926	240	186	22	76	3.121
01	135	543	634	301	232	102	272	2.219
02	435	15	249	30	186	194	341	1.450
03	219	30	478	329	438	201	241	1.936
04	1.147	19	454	611	268	344	351	3.194
05	953	(**)	710	545	404	310	91	3.013
06	322	(**)	288	158	231	317	188	1.504
07	634	4	712	558	308	78	443	2.737
08	260	245	19	1.092	696	59	52	2.423
09	285	91	1	99	213	151	106	946
10	204	200	32	937	595	54	154	2.176
11	274	408	53	949	815	117	41	2.657
12	375	762	254	1.094	453	72	24	3.034
13	650	150	413	161	367	58	17	1.816

(+) Correspondem aos camundongos ABC da Tabela 1.

(\*\*) Material danificado.

indiferentes de tripanossomas em horários do dia porém, ao contrário da fase aguda, os números de parasitas eram baixíssimos. Frequentemente, não eram observados tripanossomas, principalmente nos camundongos. Da mesma forma, não houve horários especiais em que se demonstrasse maior número de tripanossomas. Os xenodiagnósticos também apresentaram resultados semelhantes aos da fase aguda, não havendo uma predominância de positividade para determinados horários, tanto para as cobaias como para os camundongos (Tabelas 3 e 4).

## DISCUSSÃO

Apesar da importância prática do ritmo circadiano, fenômeno já demonstrado para diversas espécies de tripanossomas<sup>7 8 9 10 11 13 17</sup>, o assunto

quase não tem sido investigado para o *T. cruzi*, sendo a maioria dos trabalhos publicados a respeito de nossa autoria<sup>1 12 14 16</sup>. Provavelmente, tal fato liga-se às dificuldades que existem para a realização desse tipo de observação. Diversos fatores são envolvidos para o controle e padronização do experimento. Alguns desses fatores já são conhecidos, entre eles, a luz e a temperatura que interferem na periodicidade do *Trypanosoma rotatorium*<sup>3 4 6 11 13 17</sup> e também o sono, ainda não bem investigado, mas que possivelmente muito poderá influir na ritmicidade da parasitemia dos tripanossomas. Observações feitas com o *Trypanosoma lewisi* e *Trypanosoma duttoni* parecem sugerir haver influência do sono no ritmo circadiano dos flagelados<sup>6</sup>.

De acordo com Seed<sup>13</sup>, existe um ritmo estacional e diurno para o *Trypanosoma rotatorium*

Tabela 3 – Positividade para *Trypanosoma cruzi* do xenodiagnóstico em cobaias infectadas durante 24 horas consecutivas, com ninfas de *Panstrongylus megistus* (fase crônica).

Hora do dia	Cobaia A		Cobaia B		Cobaia C		Total		%
	Nº Ninfas Ex.	Pos.							
14	9	8	8	6	10	10	27	24	89
15	7	3	2	2	2	2	11	7	64
16	9	7	3	3	8	7	20	17	76
17	7	6	6	6	5	4	18	16	89
18	7	5	5	4	5	4	17	13	76
19	6	5	10	7	5	4	21	16	76
20	6	5	10	10	8	7	24	22	92
21	8	8	4	2	7	5	19	15	79
22	2	2	3	3	8	7	13	12	92
23	4	4	6	6	2	2	12	12	100
24	7	7	6	4	10	8	23	19	83
01	7	6	6	6	4	4	17	16	94
02	6	6	6	5	5	4	17	15	88
03	4	3	7	6	7	7	18	16	89
04	10	10	2	1	6	6	18	17	94
05	7	7	4	4	7	7	18	18	100
06	7	1	5	5	8	8	20	14	70
07	3	2	7	6	9	9	19	17	89
08	3	3	7	6	6	6	16	15	94
09	7	5	4	3	3	3	14	11	78
10	4	4	3	3	4	4	11	11	100
11	8	8	6	6	4	4	18	18	100
12	4	4	3	3	4	4	11	11	100
13	3	3	4	4	4	3	11	10	91
Total	145	122	127	111	141	129	413	362	88

parasita da rã. O ritmo estacional é correlacionado com a temperatura da água em que o batráquio vive, sendo os níveis de parasitemias mais elevadas no verão e mais baixos no inverno. Entretanto, esses autores acreditam que a temperatura não é o único fator responsável pelos ciclos estacionais. O ritmo diurno foi influenciado pelo regime fotoperiódico ao qual as rãs eram expostas. O fotoperiodismo também estava correlacionado com a variação estacional<sup>13 17</sup> da parasitemia.

Muito importante também é o tipo de animal experimentado o que, conforme foi observado, interfere no ritmo circadiano de certas espécies de tripanossomas, como no ritmo do *Trypanosoma congolense*, o qual varia também de acordo com a espécie de mamífero infectado, assim como com a cepa do tripanossoma usada, além de outros fatores<sup>9 10</sup>.

Com referência ao *T. cruzi*, o camundongo provavelmente, não é um animal adequado para a verificação experimental da periodicidade sanguínea do parasita, principalmente por causa de sua baixa volemia que mal permite retirar quantidades de sangue suficientes para exames durante horas seguidas. O camundongo também não suporta um número adequado de triatomíneos nos xenos. Infelizmente, o camundongo é um dos poucos animais de laboratório onde as características da infecção pelo *T. cruzi* já são bem conhecidas<sup>15</sup>.

Porque utilizamos camundongos brancos e cobaias, não podemos esquecer o fato de serem eles animais de laboratório e portanto artificiais, ou melhor, estranhos à biocenose do protozoário. Talvez essa seja uma das razões de termos obtido resultados diferentes daqueles observados por Deane e colabora-

Tabela 4 – Positividade de xenodiagnósticos em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, durante 24 horas consecutivas, com ninfeas de *Panstrongylus megistus* (fase crônica)

Horas do dia	Camund. 1		Camund. 2		Camund. 3		Camund. 4		Camund. 5		Camund. 6		Camund. 7		Camund. 8		Camund. 9		Camund. 10		Total		%
	Ninfeas Ex.	Ninfeas Pos.																					
14	8	8	1	4	4	4	11	10	2	2	5	5	6	5	5	(+)	2	2	3	3	42	40	95
15	6	6	4	4	1	1	3	3	3	3	4	4	1	1	5	4	3	3	2	1	32	30	94
16	4	4	8	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5	5	49	49	100
17	4	4	6	5	5	5	5	5	5	5	9	9	3	3	3	3	3	3	9	9	52	52	100
18	7	7	9	8	5	5	4	4	2	2	5	5	8	7	3	2	6	6	8	8	57	54	95
19	6	6	4	4	13	12	4	4	6	6	8	8	6	6	6	6	12	12	9	9	74	73	99
20	5	5	8	7	7	7	3	3	4	4	8	7	4	4	5	5	8	8	6	6	58	56	96
21	7	6	5	5	8	8	10	10	7	6	7	6	1	1	7	7	8	8	8	8	68	65	95
22	5	5	6	5	7	7	10	10	4	4	6	6	2	2	9	9	5	4	9	9	63	61	97
23	10	10	3	3	9	8	5	5	4	4	7	7	4	4	8	8	7	7	11	11	68	67	98
24	1	1	5	5	6	6	5	4	3	3	8	8	5	5	5	5	8	8	9	9	55	54	98
01	5	5	9	5	4	4	8	8	2	2	6	6	6	6	6	6	8	8	7	6	64	62	97
02	7	6	6	6	5	4	6	6	4	3	5	4	8	8	8	8	12	12	5	4	66	61	92
03	7	7	3	3	5	5	7	7	5	5	5	5	8	8	2	2	7	7	8	8	57	57	100
04	11	11	4	4	4	4	6	6	3	3	6	5	7	7	13	13	10	9	5	5	69	67	97
05	5	5	6	6	10	10	8	8	2	2	4	4	9	8	8	8	2	2	10	8	64	61	95
06	2	2	6	5	7	4	6	5	5	4	3	3	9	8	6	6	9	9	6	6	59	52	88
07	2	2	4	4	5	4	7	7	2	2	6	6	8	8	4	4	7	7	4	2	49	46	94
08	5	5	7	6	6	4	1	1	6	4	4	1	6	5	2	2	8	8	4	4	49	40	82
09	1	1	6	5	9	9	5	1	4	4	4	4	3	3	8	8	11	11	11	10	62	56	90
10	1	1	3	3	4	4	3	3	2	2	4	4	2	2	4	4	2	2	2	2	27	27	100
11	3	2	3	3	2	2	5	2	3	3	2	2	3	3	(+)	(+)	2	2	2	(+)	23	19	83
12	2	2	4	4	3	3	6	6	5	3	3	3	6	6	1	1	(+)	(+)	2	2	32	30	94
13	5	5	2	2	6	5	4	4	2	2	3	3	1	1	2	1	2	2	2	2	29	27	93
Total	119	116	122	116	140	129	136	126	90	83	127	120	123	118	119	116	147	145	145	145	1.268	1.206	95

(+) Não se alimentaram.

Tabela 5 – Resultado de hemoscopias realizadas em 3 cobaias e 10 camundongos infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*, durante 24 horas consecutivas, na fase crônica da infecção. (As cobaias e camundongos são os mesmos referidos nas Tabelas 3 e 4).

Hora do dia	Soma dos tripanossomas nas cobaias (+)	Soma dos tripanossomas nos camundongos (+)
14	3	0
15	8	3
16	3	1
17	1	0
18	3	0
19	0	1
20	8	4
21	4	2
22	6	1
23	3	0
24	4	1
01	0	0
02	4	0
03	1	1
04	5	0
05	4	1
06	3	0
07	0	0
08	5	4
09	1	0
10	0	0
11	2	1
12	1	0
13	0	2

(+) Refere-se ao número total de tripanossomas observados por 3,09 mm<sup>3</sup> de sangue.

dores em *Callithrix*<sup>7 8</sup>, para o *Trypanosoma minasense*, flagelado filogeneticamente próximo ao *T. cruzi* e parasita natural deste primata.

Embora não tenhamos constatado um ritmo circadiano para o *T. cruzi*, além da metodologia original que empregamos e que poderá servir de base para observações futuras a respeito, as experiências que realizamos foram proveitosas e, algumas conclusões puderam ser tiradas. Em primeiro, verificou-se que a parasitemia pelo *T. cruzi*, nos dois tipos de animais utilizados, foi constante nas 24 horas do dia, tanto na fase inicial da infecção quando o número de parasitas é elevado, como na fase crônica em que os

mesmos são escassos. Como os dados mostraram, não existe um ritmo circadiano e conseqüentemente, não existe um horário melhor para a realização de hemoscopias ou xenodiagnóstico em que se possa detectar melhor o parasita. Do ponto de vista prático, sabemos agora que, a demonstração do parasita pode ser feita a qualquer hora do dia, tanto através do xenodiagnóstico como da hemoscopia. Se os xenos forem repetidos num mesmo dia, as possibilidades de diagnosticar o parasita na fase crônica, são muito maiores como já haviam observado Almeida, Sherlock e Fahel<sup>1</sup>, para a infecção humana crônica.

O elevado índice de positividade dos xenodiagnósticos que obtivemos nestas experiências, na fase crônica da doença, quando a hemoscopia demonstrava escassos tripanossomas circulantes, pode parecer estranho. Resultados também aparentemente inexplicáveis foram obtidos por Schenone e colaboradores<sup>12</sup> que, apesar da constante parasitemia do paciente que investigam, apenas 40% das ninfas que o sugaram se infectaram. Na realidade, além de outros fatores inerentes à própria susceptibilidade de infecção dos triatomíneos, cujos fatores são inúmeros e muitos dos quais já esclarecidos, nas nossas experiências na fase crônica, foi utilizado maior número de triatomíneos por xeno. Este fato é sabido que aumenta a positividade dos resultados<sup>2 12 15</sup>, independentemente da espécie, do tamanho e do estágio evolutivo do inseto. Tal aspecto que já tem sido bastante investigado, não cabe entretanto ser discutido no presente trabalho.

#### SUMMARY

*The hourly parasitaemia of Trypanosoma cruzi in mice with acute infection and in mice and guinea pigs with chronic infections was checked by means of hourly blood examinations and xenodiagnosis. The number of T. cruzi in the blood and the number of positive xenodiagnosis in both acute and chronic infections was frequent and variable but not cyclical during the 24 hours of the day. T. cruzi was demonstrable at any time of the day by either blood examination or xenodiagnosis.*

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Hourly Parasitaemia. Circadian rhythm. Xenodiagnosis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida SP, Sherlock IA, Fahel E. Novo procedimento do xenodiagnóstico na forma crônica da doença de Chagas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 74: 285-288, 1976.

2. Almeida SP, Miles MA, Marsden PD. Verificação da susceptibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi*, dos estágios evolutivos de *Rhodnius neglectus*. Revista Brasileira de Biologia 33: 43-52, 1973.
3. Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of *Ranidae*. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Canadian Journal of Zoology 47: 283-288, 1969.
4. Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of *Ranidae*. II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Canadian Journal of Zoology 48: 1317-1319, 1970.
5. Brener Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese de Docência Livre, Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1961.
6. Cornford EM, Freeman BJ, MacInnis AJ. Physiological relationships and circadian periodicities in rodent trypanosomes. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70: 238-243, 1976.
7. Deane LM, Silva JE, Loures Filho L. Circadian rhythms in the parasitaemia of the primate haemoflagellate *Trypanosoma minasense*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 67: 424-425, 1973.
8. Deane LM, Silva JE da, Loures Filho L. Nycthemeral variation in parasitaemia of *Trypanosoma minasense* in naturally infected marmosets of the genus *Callithrix* (Primates, Callithricidae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 16: 1-6, 1974.
9. Hawking F. Circadian rhythms of *Trypanosoma congolense* in laboratory rodents. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72: 592-595, 1978.
10. Hawking F. Circadian rhythms in *Trypanosoma congolense*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 70: 170, 1976.
11. Mason G. The diurnal rhythms of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans*: investigation of photoreceptors and physiological control. Proceeding of the Second International Congress of Parasitology, Washington D. C. USA, 1970.
12. Schenone H, Rojo M, Rojas A, Concha L. Positividad diurna y noturna del xenodiagnostico en un paciente con infección chagásica crónica de parasitemia permanente. Boletín Chileno de Parasitología 32: 63-66, 1977.
13. Seed JR. Diurnal and seasonal rhythms in parasitaemia levels of some trypanosomes infecting *Rana clamitans* from Louisiana. Resumes of the Second International Congress of Parasitology 56: 311, 1970.
14. Sherlock IA. Novas observações sobre a inexistência de ritmo circadiano para *Trypanosoma cruzi* em condições experimentais. In: Resumos do XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal, RN, 1980.
15. Sherlock IA, Almeida, SP. Diferenças de susceptibilidade à infecção com *T. cruzi* entre espécies de triatomíneos alimentados em cão, tatu e camundongo infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 7: 87-98, 1971.
16. Sherlock IA, Guitton N, Muniz, TM. Positividade durante 24 horas do xenodiagnóstico em camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. In: Resumos do XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e III Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, João Pessoa, Paraíba, 1978.
17. Shouthworth GC, Mason G, Seed JR. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24-Hour Cycle in the parasitaemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. The Journal of Parasitology 54: 255-258, 1968.