

# Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum* (\*)

I. *Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos*

por

Emmanuel Dias e Lincoln de Freitas, filho

## *Introdução*

O *Schizotrypanum cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanosomose americana, infecção humana grandemente espalhada na América do Sul e existente na América Central e no México, cujos transmissores são Hemipteros da família Reduviidae. Mamíferos de diferentes ordens (carnívoros, desdentados, roedores, marsupiais, quirópteros, primatas, e outros) tem sido encontrados naturalmente infectados por parasitos do gênero *Schizotrypanum*, sobretudo no Novo Mundo, mas também em muitas outras regiões do globo. Os insetos transmissores, de que há varias dezenas de espécies conhecidas, contam com um representantes universal, o *Triatoma rubrofasciata*, já reconhecido em vários lugares como hospedeiro de flagelados. No homem a doença de Chagas não foi encontrada senão nas Américas.

A questão da unidade ou pluralidade das espécies do gênero *Schizotrypanum*, cuja importância etiológica e epidemiológica é desnecessário encarecer, impõe-se à simples consideração da multiplicidade e universalidade dos hospedeiros vertebrados e invertebrados de tal gênero. E a dificuldade de sua solução sobressai mesmo à apreciação superficial das propriedades comuns e esses protozoários: o aspecto morfológico geral das formas de tripanosoma; o processo de multiplicação intracelular sob a forma de leishmania; a transmissibilidade ubiquitária por hemípteros e outros invertebrados sugadores; o ciclo evolutivo e o mecanismo de transmissão contaminativa pelas formas metacíclicas do intestino posterior; a facilidade do cultivo *in vitro* e a analogia da evolução cultural; e a diversidade ou semelhança do

---

\* Recebido para publicação a 21 de maio e dado à publicidade em junho de 1943.

comportamento em relação aos animais de experiência, levado em conta seu discutido valor como elemento de diferenciação específica, constituem circunstâncias suficientes para deixar entrever a complexidade do problema, já uma vez qualificado de "exasperante".

Até o presente, a questão tem sido mais investigada é a da identidade entre o *S. cruzi* e certos hemoflagelados parasitos de morcêgos. Com relação aos esquizotrípanos de outros animais, ela ainda não foi abordada de modo aprofundado, sendo admitido como o próprio *S. cruzi* os parasitos de uma série de mamíferos silvestres e domésticos. Em nenhum caso foi o problema investigado adequadamente do ponto de vista puramente morfológico.

Num trabalho anterior, Dias (1936), acompanhando a opinião geralmente adotada pelos autores, considerou todos os *Schizotrypanum* de morcegos como pertencentes a uma única espécie, *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia), à falta de elementos que possibilitassem a distinção entre diversas espécies. Ainda mais, em vista das afinidades biológicas entre o *S. cruzi* e o *S. vespertilionis*, e de acordo com os conhecimentos então disponíveis, julgou também impossível caracterizar com precisão estas duas espécies (Dias 1936, pág. 76 e 83), tendendo porisso ao unicismo. Propôs, então, a criação de um "grupo" comportando todos êsses hemoflagelados: "O gênero *Schizotrypanum* comporta parasitos de numerosas espécies de mamíferos e invertebrados que, posta de lado a questão da unidade ou pluralidade das espécies, formam um grupo natural bastante característico, o grupo *vespertilionis*, de distribuição geográfica universal"...

Perseverando na investigação do problema, decidimos aprofundar o estudo da morfologia das formas sanguícolas dos esquizotrípanos, aplicando métodos biométricos a exemplo do que fiseram outros autores para alguns tripanosomas (Pearson 1914, Hoare & Broom 1938, 1939). E o fiseamos sob a inspiração da autorizada advertência de Pearson, tão perfeitamente aplicável ao caso em apreço: "...the time has now come when without trained statistical aid, but little further progress will be made in a very important and urgent matter" (Pearson 1914, pág. 143).

Com o presente trabalho damos início à publicação dos resultados das pesquisas que vimos realizando desde 1938, ocupando-se um de nós, sobretudo, com a obtenção de amostras de parasitos, das respectivas mensurações e eventual estudo experimental, o outro com a parte estatística propriamente dita. Por mais de uma vez estivemos a ponto de publicar a respeito um trabalho de conjunto. Resolvemos, porém, suspendê-lo, movidos pelo empenho em conseguir maior número de dados sobre a matéria; foi possível, assim, aprofundar mais os estudos e fugir a algumas conclusões prematuras.

Contando, atualmente, com alguns milhares de tripanosomas medidos, oriundos de amostras de *Schizotrypanum* de variada procedência, principiamos neste momento a publicação parcelada do estudo biométrico dessas amostras, agrupando-as segundo suas características morfológicas principais e segundo sua origem. Ao contrário do inicialmente planejado, não nos limitaremos apenas ao estudo do chamado "índice nuclear", mas deixaremos consignadas tôdas as medidas obtidas de cada amostra e de cada grupo, mesmo quando elas não sejam objeto de imediata análise estatística: assim, em qualquer tempo poderão ser úteis como termo de comparação para trabalhos ulteriores, ou mesmo poderão servir de base para investigações biométricas adicionais por parte de outros pesquisadores.

Referências a algumas das conclusões e a dados pertencentes à série de publicações que ora encetamos encontram-se incidentalmente em trabalhos anteriores de um de nós com diversos colaboradores (Dias 1940; Pifano & Dias 1940; Dias & Pifano 1941, 1942; Dias, Melo, Costa, Damasceno & Azevêdo 1942; Dias & Torrico 1943), bem como em trabalho estrangeiro a cujos autores confiámos material e esclarecimentos sôbre o assunto (Floch, Lajudie & Abonnenc, 1942).

#### *Material e técnica*

Tomámos por objeto, nas presentes investigações, unicamente as formas de tripanosoma, sanguícolas, de *Schizotrypanum*. Tratámos, portanto, de obter esfregaços de sangue de vertebrados natural e experimentalmente infectados, de preferência com intenso parasitismo, por amostras de procedência a mais variada possível tanto quanto ao hospedeiro como quanto à localidade de origem. Em geral eram lâminas fixadas a sêco pelo álcool etílico absoluto e coradas pelo Giemsa ou outra variante do Romanowhky. Trabalhámos também com gotas espessas, porem, excepcionalmente.

Nosso material padrão foi o fornecido por amostras ("strains") mantidas no laboratório, de genealogia conhecida desde a origem, que eram medidas de tempos a tempos para verificação da constância ou da variabilidade das características biométricas. Algumas vezes utilizámo-nos de antigo material nosso, sobre o qual possuímos informações mais ou menos completas, e outras vezes servimo-nos de lâminas recebidas de outros pesquisadores, também nas mesmas condições. Ao decorrer dos próximos trabalhos serão dadas com a devida minúcia as informações indispensáveis de que dispomos a respeito de cada uma das amostras estudadas.

E' de grande importância a consignaçoão de dados referentes à procedência da amostra, ao hospedeiro em cujo sangue êla é medida (espécie, tempo de infecção), ao número de parasitos, assim como a de outros infor-

mes que poderão parecer supérfluos, mas cuja anotação permitirá pelo menos o início da reunião de dados que poderão ser úteis, ou mesmo essenciais, na interpretação dos resultados da análise estatística, sejam êstes concordantes ou divergentes, verificados na comparação de medidas tomadas de determinada raça de parasito sob diferentes circunstâncias. E, se por um lado a apreciação dessas circunstâncias poderá não esclarecer desde logo as causas de uma variabilidade morfológica constatada, por outro lado poderá servir como indicação para experiências tendentes a mostrar a natureza dessas causas, pela modificação adequada de supostos ou prováveis fatores de variabilidade e análise dos resultados produzidos: "Until we have such quantitative measure no hypothesis of sameness or difference can flow from statistical treatment; nobody as yet knows how much to attribute to environment, how much to attribute to individuality of strain" (Pearson 1914, pág. 101).

Estatisticamente falando, constitue para nós uma amostra ("sample") cada série de medidas tomadas de determinado número de tripanosomas do sangue de um mesmo hospedeiro e no mesmo dia de infecção. Assim sendo encontrámos desde logo um obstáculo à realização, em condições ótimas, de nossas pesquisas, devido ao fato conhecido de que em geral nas infecções por *Schizotrypanum* o parasitismo sanguíneo é escasso. No homem, esta regra sofre raríssimas exceções. No animal, mesmo quando se trata raças de *Schizotrypanum* virulentas, quando se verifica uma infecção intensa ela geralmente decai rapidamente, escasseando mais e mais os parasitos até praticamente desaparecerem da circulação; torna-se, portanto, quasi sempre difficil, mesmo nestes casos favoráveis, o estudo de amostras provenientes de um mesmo hospedeiro e obtidas a intervalos suficientemente longos para verificação de suas possíveis variações.

Por outro lado, as predileções de cada raça exigem determinados hospedeiros para provocar ricas infecções, o que restringe as possibilidades de investigações biométrica em variadas espécies animais. Devido à pobreza das infecções, na maioria das amostras de *Schizotrypanum* que mantemos no laboratório não é possível a tomada de ("samples") em tôdas as passagens, sendo preciso esperar às vezes longo tempo até que se apresente ensejo para fazê-lo em boas condições. Temos vários exemplos de esquizotripanos cujo estudo só pode ser feito depois de várias passagens, e de outros que até agora nunca estiveram a ponto de ser investigados por só produzirem infecções inaparentes, ou quasi.

Para poder aproveitar a maior parte das lâminas disponíveis, nas quais às vezes tripanosomas só eram encontrados após prolongadas buscas, tivemos que nos limitar a medir um número relativamente muito pequeno de parasitos; em geral 50, algumas vezes menos, outras vezes mais. Tal é, porém,

BIOMETRIA DE SCHIZOTRYPANUM — I. O. C. (D. E. E.) — Dr. E. Dias

Amostra n. .... Nome. .... Infecção .....

Origem .....

Sangue de ..... Data ..... Passagem.....

Data da inoculação..... Tempo de infecção..... Trip. medidos.....

Observações .....

DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA ( $\mu$ )

DIMENSÕES ( $\mu$ )

<i>u</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Mínima	Máxima	Média
P. N.																				
N. A.																				
Fl.																				
COMPRIMENTO TOTAL																				

COMPRIMENTO TOTAL — DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA ( $\mu$ )

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

ÍNDICE NUCLEAR (PN/NA) — DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA (EM DECIMOS)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ÍNDICE NUCLEAR (PN/NA) — DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM GRUPOS DE 0,5

I 0.5—0.9	II 1.0—1.4	III 1.5—1.9	IV 2.0—2.4	V 2.5—2.9	VI 3.0—3.4	VII 3.5—3.9	VIII 4.0—4.4	IX 4.5—4.9	X 5.0—5.4	XI 5.5—5.9	XII 6.0—6.4

ÍNDICE NUCLEAR MÉDIO.....

a amostra ("sample") no sentido estrito que definimos. Grupos de amostras idênticas ou próximas serão constituídos que, como veremos, chegam a compor-se por várias centenas e mesmo mais de um milhar de parasitos, o que de certo modo compensa o reduzido número dos indivíduos de cada amostra de per si.

Para a obtenção das medidas os tripanosomas são desenhados à câmara clara, a um aumento aproximado de 1.500 vezes. Marca-se o contorno do parasito, o flagelo, o núcleo e o blefaroplasto. Com o fim de evitar tôda e qualquer seleção, a lâmina deve ser percorrida metódicamente e os flagelados são marcados à medida que surgem no campo microscópico, desde que estejam íntegros e não apresentem deformações. A êsse respeito covem notar que os esfregaços não devem ser muito delgados, do contrário dilacera-se ou deforma-se a maioria dos tripanosomas.

Na realização desta parte do trabalho cuidámos em que as condições variassem o menos possível. Assim, todos os parasitos foram marcados por um único desenhista que usou sempre o mesmo microscópio, a mesma combinação de lentes e a mesma câmara clara, desenhando sempre à altura da mesa e a uma distância constante do pé da estativa. Para controle do aumento para cada série de tripanosomas figura no desenho uma escala micrométrica. Na obtenção das medidas foi sempre empregado o mesmo curvímetro (*Curvimètre à cadran. et à manche H. C.*), manejando-o sempre o mesmo operador (D.). Desde já queremos deixar consignados nossos agradecimentos e a expressão sincera de nossa admiração ao Sr. Antônio Pugas, do Instituto Oswaldo Cruz, a quem devemos a execução meticulosa e paciente dos desenhos de milhares de tripanosomas.

De cada parasito desenhado são tomadas as medidas desejadas, percorrendo-se com a roda dentada do curvímetro, mantido em posição vertical, o corpo do tripanosoma pela linha mediana, começando na extremidade posterior e terminando na ponta do flagelo. As leituras são feitas em milímetros e depois convertidas em micra por meio de uma tabela.

O diagrama da fig. 1 mostra as três secções em que dividimos o protozoário para as respectivas medidas e obtenção do comprimento total e do índice nuclear. Assim, determinam-se para cada indivíduo:

- 1) A distância PN, da extremidade posterior ao meio do núcleo;
- 2) A distância NA, do meio do núcleo à extremidade anterior do corpo;
- 3) O comprimento do flagelo livre, Fl;
- 4) O comprimento total, T, constituído pela soma de 1, 2 e 3;
- 5) O índice nuclear, IN, ou relação PN/NA, representado pelo quociente da divisão de 1 por 2.

Para facilitar a anotação dos dados concernentes a cada amostra medida organizámos uma ficha que se mostrou muito útil e cujo modelo reproduzimos em miniatura (o original mede 21 por 28 cm.)

### Problema e métodos estatísticos

Uma vez obtidas as séries de medidas das amostras de tripanosomas, o problema estatístico que se apresenta é o de saber se elas constituem amostras de uma mesma "população" ou "universo", isto é, se diferem entre si apenas por variações de amostras ("random samples"), ou se, ao contrário, devem ser consideradas amostras de "populações" diferentes. É claro que o estudo

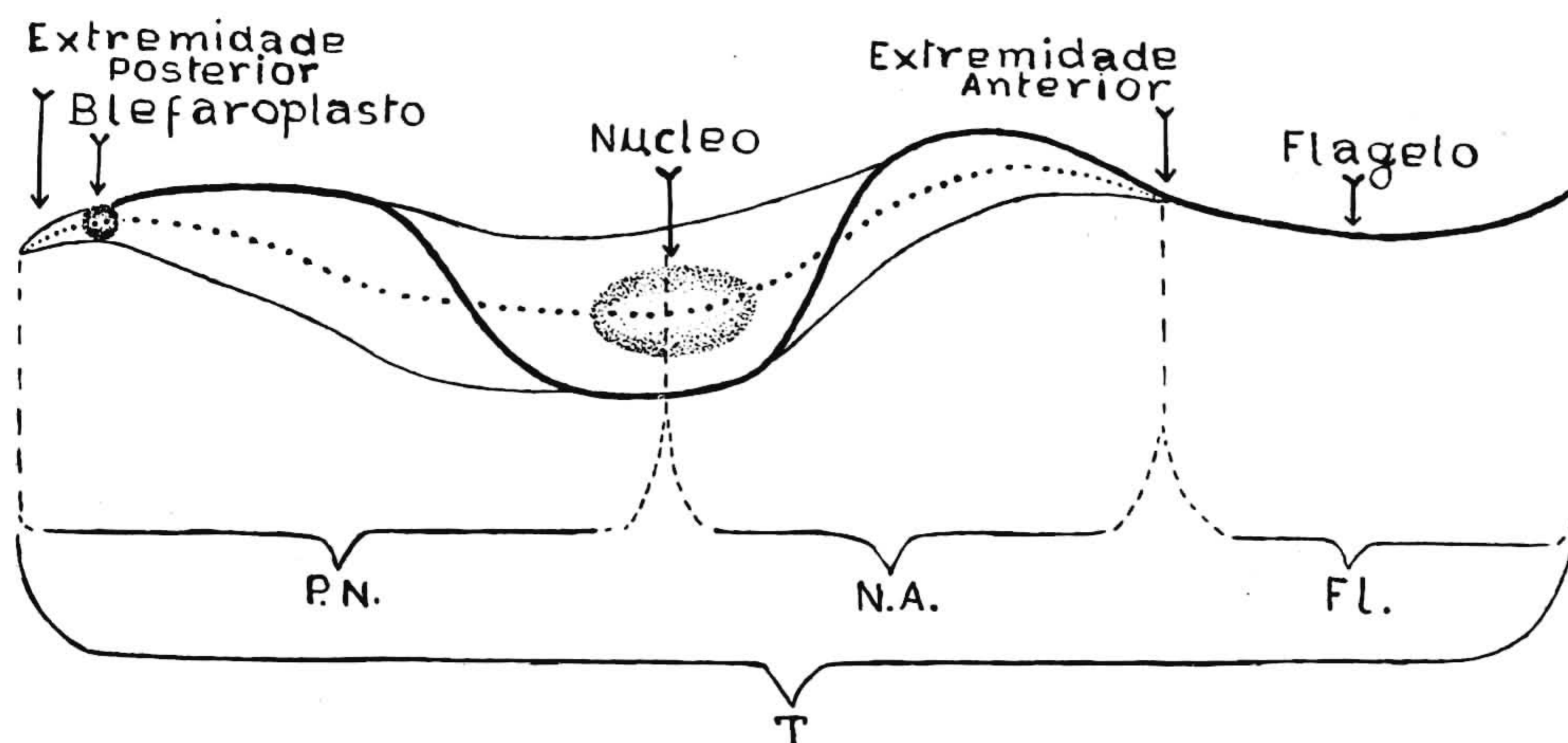


Fig. 1 — Diagrama de uma forma de tripanosoma de *Schizotrypanum*. PN = Extremidade posterior-meio do núcleo; NA = meio do núcleo-extremidade anterior; Fl = flagelo livre; T = comprimento total. A linha pontilhada indica o trajeto a ser percorrido pelo curvimento no corpo do parasito.

estatístico da questão assim posta implica na premissa de que a única diferença apreciável, e por conseguinte a única tomada em conta na comparação das diversas amostras, é a que diz respeito às mensurações consideradas.

Desde os clássicos trabalhos de Pearson sabe-se que é inteiramente impossível resolver-se este problema — o da identidade ou diferença de "amostras" — por simples processos de comparação gráfica entre distribuições de frequência, médias ou porcentagens.

Na investigação do problema em apreço começámos por considerar somente o comprimento total dos parasitos, tal como o tem feito outros autores no caso de verdadeiros tripanosomas. Porém, os resultados estatísticos da análise das 10 primeiras amostras não foi muito satisfatório. Ao correr desses

ensaios, observámos que uma outra dimensão dos tripanosomas parecia fornecer elementos para a melhor comparação das amostras entre si: a distância NA, que vai do meio do núcleo ao ponto de emergência do flagelo. De fato, os métodos estatísticos aplicados a séries de medidas desta distância mostraram resultados bastante animadores.

Com o desenvolvimento das pesquisas, verificámos que resultados ainda melhores eram conseguidos tomando-se por base as médias ou as distribuições de frequência dos índices nucleares das amostras em comparação. Como facilmente se deduz do exposto, a relação PN/NA indica a posição do núcleo de cada tripanosoma relativamente às duas extremidades do corpo (não considerado o flagelo), e a média dos índices dos indivíduos de cada amostra exprime a posição média do núcleo na amostra considerada, ou seja, o seu "índice nuclear médio" (INM).

Dois foram os processos estatísticos empregados, aliás com resultados muito concordantes, na comparação das amostras de *Schizotrypanum* entre si, tomado por base o índice nuclear.

O primeiro processo considera a diferença entre as médias aritméticas de duas distribuições de frequência, em relação ao erro padrão da diferença entre as médias. Quando a diferença entre duas médias excede de três vezes o erro padrão da diferença entre as médias, estas últimas são consideradas significativamente diferentes. Neste caso, as duas séries de medidas — estatisticamente falando — não devem provir de indivíduos de uma mesma "população" original, isto é, deve existir uma diferença real entre as duas amostras consideradas.

O segundo processo empregado é o desenvolvido por Pearson (1911, 1914) para calcular a probabilidade de duas distribuições de frequência independentes serem amostras de uma mesma população. É o teste do  $\chi^2$  que compara a distribuição de frequência verificada em toda a extensão das mensurações. Segundo Pierson este método, que tem sido aplicado a um grande número de problemas, é o mais adequado para estabelecer um critério de identidade de amostras de populações. Determinado o valor de  $\chi^2$ , obtem-se, por meio de tabelas especiais (Elderton 1902, Pearson 1914-A), a probabilidade (P) de que este valor possa existir por acaso entre duas amostras oriundas de uma mesma população ou universo. Quando P é menor do que 0,01 (ou 1%) presume-se existir uma diferença real entre as amostras, e tanto maior será a divergência estatística quanto menor esse valor (geralmente apura-se até a 6.<sup>a</sup> casa decimal). Quando P é maior do que 0,01 as amostras são consideradas do ponto de vista estatístico como podendo pertencer a uma mesma população; e quanto maior o seu valor, maior a semelhança entre as amostras comparadas, cuja igualdade estatística teórica é representada pela unidade (= 100%).



\*

\* \*

No próximo trabalho, a aparecer nestas Memórias, ocupar-nos-emos do primeiro grupo de amostras de *Schizotrypanum*, constituído por parasitos de índice nuclear médio variando em torno de 1,0 e originários de morcegos (*Phyllostomus hastatus*, *Phyllostomus elongatum*) e de gambás.

## REFERÊNCIAS

DIAS, E.

1936. Revisão geral dos Hemoflagelados de Chirópteros. Estudo do *Schizotrypanum* do *Phyllostomus hastatus*: identidade com *Schizotrypanum cruzi*. IX Reunião Soc. Argentina Patol. Reg., Buenos Aires, 1 : 10-88.
1940. Sobre um *Schizotrypanum* dos morcêgos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz, 35 (2) : 399-409.

DIAS, E., MELO, G. B., COSTA, O., DAMASCENO, R. &amp; AZEVEDO, M.

1942. Investigações sobre esquizotripanose de morcêgos no Estado do Pará. Encontro do barbeiro "*Cavernicola pilosa*" como transmissor. Rev. Brasil. Biol. 2 (1) : 103-110.

DIAS, E. &amp; PIFANO C., F.

1941. Estudo experimental de um *Schizotrypanum* do morcêgo *Hemiderma perspicillatum* da Venezuela. Memórias Inst. Oswaldo Cruz 36 (1) : 79-98.
1942. Sobre um *Schizotrypanum* do morcêgo *Phyllostomus elongatum* da Venezuela. Rev. Brasil. Biol. 2 (1) : 95-97.

DIAS, E. &amp; TORRICO, R. A.

1943. Estudos preliminares sobre a doença de Chagas na Bolívia. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz 38 (2) : 165-172.

ELDERTON, W. P.

1902. Tables for testing the goodness of fit theory to observation. Biometrika 1 : 155-163.

FLOCH, H., DE LAJUDIE, P. &amp; ABONNENC, E.

1942. Schizotrypanosome des cheiroptères en Guyane Française. L'indice nucléaire moyen. Inst. Pasteur Guyane Terr. Inini 51 : 1-7.

HOARE, C. A. &amp; BROOM, J. C.

1938. Morphological and taxonomic study on Mammalian trypanosomes. IV. Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 31 (5) : 517-534.

1939. Morphological and taxonomic study on Mammalian trypanosomes.  
VII. Differentiation of *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax* in mixed infections.  
Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 32 (5) : 629-632.

## PEARSON, K.

1911. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples from the same population.  
Biometrika 8 : 250-254.
1914. On the probability that two independent distributions of frequency are really samples of the same population, with special reference to recent work on the identity of trypanosome strains.  
Biometrika 10 : 85-143.
- 1914a. Tables for statisticians and biometricians.  
Cambridge University Press, 143 pp.

## PIFANO C., F. &amp; DIAS, E.

1940. Parasitismo natural do morcêgo *Carollia perspicillata* por um *Schizothypanum* na Venezuela.  
Brasil Méd. 54 (42) : 695-696.

*Nota* — Em alguns trabalhos anteriores há referência a publicações de Dias & Freitas que não chegaram a ser impressas, como "Nota preliminar sobre a biometria dos flagelados do gênero *Schizotrypanum*" (1942), sendo o presente o primeiro trabalho dos autores sobre o assunto.

---