

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Alyssa Rossi Borges**

**ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOLÓGICO DE TRIPANOSSOMAS DE  
PEIXES DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO***

Juiz de Fora  
2016

**ALYSSA ROSSI BORGES**

**ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOLÓGICO DE TRIPANOSSOMAS DE  
PEIXES DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e DIP.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kézia Katiani Gorza Scopel**

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rossi Borges, Alyssa.

Estudo morfológico e biológico de tripanossomas de peixes do Brasil: caracterização in vivo e in vitro / Alyssa Rossi Borges. -- 2016. 109 f. : il.

Orientadora: Kézia Katiani Gorza Scopel  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Hemoparasitos. 2. Morfometria. 3. Taxonomia. 4. Trypanosoma. I. Katiani Gorza Scopel, Kézia, orient. II. Título.

**ALYSSA ROSSI BORGES**

**Estudo morfológico e biológico de tripanossomas de peixes do Brasil:  
caracterização *in vivo* e *in vitro***

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17 / 03 / 2016.

**BANCA EXAMINADORA:**

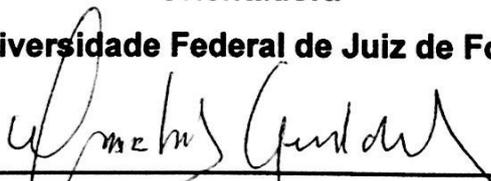


---

**Prof.ª Dr.ª Kézia Katiani Gorza Scopel**

**Orientadora**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



---

**Prof.ª Dr.ª Marta Maria Geraldete Teixeira**

**Universidade de São Paulo**



---

**Prof. Dr. Roberto Júnio Pedrosa Dias**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

*À minha bisavó Adelaide*

*“Enquanto houver você do outro lado  
Aqui do outro eu consigo me orientar  
A cena repete, a cena se inverte  
Enchendo a minha alma daquilo que outrora eu  
Deixei de acreditar*

*Tua palavra, tua história  
Tua verdade fazendo escola  
E tua ausência fazendo silêncio em todo lugar*

*Metade de mim  
Agora é assim  
De um lado a poesia, o verbo, a saudade  
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim  
E o fim é belo incerto, depende de como você vê  
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só*

*Só enquanto eu respirar  
Vou me lembrar de você  
Só enquanto eu respirar”*

*Fernando Anitelli*

## AGRADECIMENTOS

*Após dois anos de Mestrado, de muito trabalho, e cinco anos de faculdade, torna-se difícil elencar tantas pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Afinal, todos os caminhos tomados desde a graduação convergiram para a elaboração desta dissertação. Assim, gostaria de agradecer:*

*À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio na realização do projeto, e, também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.*

*À minha tão querida orientadora, Dr.<sup>a</sup> **Kézia Scopel**, por ter aceitado o desafio de trabalhar com os tripanossomas de peixes, por toda a confiança que depositou em mim neste tempo, pelo entusiasmo com nossos resultados e pela amizade.*

*Ao Dr. **José Carlos de Oliveira**, por ter me auxiliado nas coletas, pela identificação dos peixes e por ter feito tudo isso com amizade e carinho.*

*Aos membros da banca examinadora, por terem prontamente aceitado o convite e dedicado tempo à leitura desta dissertação.*

*Aos membros da banca do exame de qualificação, Dr. **Roberto Dias** e Dr.<sup>a</sup> **Heloísa D'Ávila**, pelas valiosas observações e contribuições.*

*Ao Dr. **Roberto Dias**, por ter aceitado colaborar com a filogenia, que permanece como um objetivo futuro deste trabalho, por ser um grande exemplo desde a minha graduação e também por me auxiliar em todas as vezes que precisei. Roberto, você é uma pessoa ímpar e iluminada. Obrigada por todos os ensinamentos!*

*À Dr.<sup>a</sup> **María Flores** por lo que me ha enseñado de la biología molecular y por tener prontamente aceptado colaborar con este proyecto en la parte de secuenciación. Muchas gracias.*

À Dr.<sup>a</sup> **Moara Lemos**, por ter despertado em mim o amor pelos tripanossomas e por ter me guiado nos primeiros passos do estudo destes parasitos “maravilindos”.

À Dr.<sup>a</sup> **Florence Rosa** por sua serenidade e preciosas dicas sobre apresentação.

À Dr.<sup>a</sup> **Simone Cardoso**, pela ajuda com o refinamento da estatística. Simoninha, obrigada pelo seu sorriso sincero, sua calma e dom de ensinar.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, em especial: a **Dani** e **Bárbara**, Florzinha e Lindinha, pela amizade e companheirismo, seja nos momentos de trabalho ou de descontração, e, claro, por aguentarem meu ótimo humor quando algo não saía como o planejado; a **Marina** por toda a ajuda prestada e por ser sempre doce, e a **Paty** por ser a pessoa mais fofa e prestativa com quem tive o privilégio de conviver.

Às minhas “padawans”, **Gabi** e **Ju**, por terem me ensinado muito sobre a “arte de ensinar” e por terem me impulsionado a ser cada dia melhor no trabalho que desempenho.

Aos meus companheiros de laboratório de Protozoologia, onde tudo começou, em especial a: **Bia**, **Mari**, **Fran**, **Marchesini** e **Lulu**. Vocês foram e são exemplos, amigos e os melhores colaboradores informais que existem!

Aos meus amigos do NGIME gostaria de dizer que estar com vocês nos últimos dois anos foi uma das melhores coisas que me aconteceram. Tivemos ótimos momentos que irei guardar para sempre! **Flávia**, amiga de infância que conheci aos 25, muito obrigada por ter me apresentado o mundo da EaD e me incentivado nesses primeiros passos na área da Educação. **Carol**, além da amizade, você me deu o melhor exemplo do que é ser uma verdadeira líder. Obrigada pelos incentivos e por sempre acreditar em mim. **Thadeu**, você é um anjo que a vida me deu em forma de amigo. Obrigada por todos os puxões de orelha, pelo ombro amigo, pelo sorriso sincero e pelo abraço acolhedor. Tudo isso foi fundamental! **Ju**, a minha “vó” favorita, sua amizade foi um grande presente que trouxe no pacote as melhores gargalhadas! **Daniel**, obrigada pela companhia nas muitas cervejas e por sempre me apresentar outra forma de encarar as situações da vida.

A mis amigas **Marta y Pame**, por las buenas vibraciones y, por supuesto, por toda la ayuda enviada por “whatsapp” cuando tenía alguna duda desde aquí. A **Bruno y Rita**, los brasileños más españoles a quien conozco, gracias por las charlas, por la amistad, compañerismo y fuerza, mismo con la distancia vosotros estuviereis siempre conmigo.

Aos meus amigos da vida, que um dia intitulamos de “Nosso Sonho”, obrigada por sempre compreenderem que, apesar do estresse e falta de tempo, eu os amo mais que tudo! Vocês são sensacionais e proporcionam os melhores colos, seja para momentos de tristeza ou de felicidade plena! **Tharcy e Daly**, como viver sem esse tripé de amor que nasceu no CM?! Vocês conhecem minhas fraquezas e têm a capacidade de perdoá-las e transformá-las em virtudes. **Camilinha**, além de ter entrado na minha vida pra ficar, se tornou uma “metadinha”. Como se não bastasse sermos companheiras de “happy hour”, passamos a trabalhar e a morar juntas. Obrigada por ser a companhia de todas as horas! **Thierre**, meu amigo, meu irmão e companheiro de casa que me oferece, “de bom grado”, seu amor todos os dias. Obrigada por se fazer presente até mesmo quando está no mar! **Eve e Lucas**, os donos dos melhores abraços de urso e que possuem uma alegria genuína, contagiante e transbordante. Obrigada por compartilharem um pouco disso comigo! **Nath**, uma mãezona puro amor, que nem é tão hipócrita quanto dizem por aí! Você traz paz pro meu espírito. **Henrique**, o super-herói que todos querem no grupinho e que, mesmo sendo rabugento, proporciona gargalhadas inusitadas. **Cícero**, minha alma gêmea, o melhor amigo do mundo, o que me entende sem que eu precise dizer nada. Você é, e sempre será, meu porto seguro.

Aos amigos que fiz durante a graduação e que permanecem na minha vida. **Samy, Verbs e Moniquinha**, obrigada pela amizade, pelo carinho e pelas melhores vibrações. Vocês me trazem luz! **Grilinho**, um dia te “adotei”, mas hoje é você quem me pega pela mão! **Dudu**, seus falsetes trouxeram alegria em momentos muito necessários!

À Biodeli, a melhor Biologia do Brasil, todas as distrações que vocês proporcionaram foram fundamentais para renovar as energias! **Aninha**, por toda a ajuda nos momentos que precisei. **Pilar**, pelo carinho e todas as conversas. **Sara**, por me acompanhar novamente. Amo vocês!

*Aos meus professores do CMJF que foram grandes exemplos, incentivadores e, muitas vezes, o impulso que eu precisava para seguir em frente e acreditar em mim mesma. Em especial, agradeço aos queridos **Capitão Fátima, Capitão Duarte, Aline, Doris Dey, Elisângela e Aristeu**. Vocês colocaram os primeiros tijolos desta construção!*

*À minha família, por todos os churrascos, almoços de domingo, cervejinhas, finais de semana no sítio, jogos do Botafogo, deboches sobre os “parasitOs” e orações para que tudo desse certo.*

*Aos meus pais, **Mônica e Aloysio**, por serem meus exemplos de ética, persistência e motivação; pelo amor incondicional; pelo suporte e apoio durante as dificuldades deste mestrado e da vida. Vocês trazem inspiração para os meus dias e me dão o Norte diante dos caminhos que escolho trilhar.*

*A Deus, força maior que rege o universo, por ter me permitido chegar até aqui...*

*"Não há saber mais, nem saber menos, há saberes diferentes"*

*Paulo Freire (1987)*

## RESUMO

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* são descritos em uma ampla variedade de espécies de peixes. Devido ao pleomorfismo destes protozoários e à rara especificidade quanto ao hospedeiro vertebrado, muitas das espécies descritas podem ter sua validade contestada. Visando contribuir para o conhecimento dos tripanossomas de peixes que circulam no Brasil, este estudo apresenta a caracterização morfológica e morfométrica das formas tripomastigotas sanguíneas encontradas em cascudos *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni*, de duas localidades no estado de Minas Gerais, aliada ao seu isolamento e manutenção em meios de cultura. A infecção por tripanossomas foi detectada em 100% de *H. affinis* e em 84,6% de *H. luetkeni* amostrados, com uma tendência no registro das parasitemias mais elevadas nos hospedeiros menores. As análises morfológicas permitiram o agrupamento dos tripomastigotas sanguíneos em quatro morfotipos distintos, sendo que dois aparentemente não apresentam semelhanças a nenhum outro tripanossoma de peixe já descrito no Brasil. O isolamento *in vitro* dos parasitos foi possível nos três meios bifásicos testados, enquanto a manutenção dos mesmos pôde ser realizada apenas no meio hiposmótico. O tempo necessário para observação dos primeiros epimastigotas *in vitro* diferiu entre as duas localidades. As formas evolutivas observadas por exame direto das culturas foram “esferomastigotas”, epimastigotas e tripomastigotas sendo o processo de multiplicação, caracterizado como divisão binária. A sequência de duplicação das organelas seguiu tanto o padrão registrado para tripanossomas de peixes de água doce, com segregação do cinetoplasto anterior à do núcleo, quanto de água salgada, com o núcleo se multiplicando anteriormente ao cinetoplasto. Ao final do processo de divisão puderam ser gerados dois tripomastigotas, dois epimastigotas ou um tripomastigota e um epimastigota. Os isolados deste trabalho apresentaram características *in vitro* distintas da única espécie isolada no Brasil, especialmente no que se refere às características fisiológicas e à ordem de divisão das organelas, sugerindo que eles possam pertencer a espécies distintas, o que só poderá ser confirmado por análises moleculares.

Palavras chave: hemoparasitos, morfometria, taxonomia, *Trypanosoma*.

## ABSTRACT

Parasites of the *Trypanosoma* genus have been described in a great number of fish species. Due to the pleomorphism presented by these protozoans and the rare specificity related to the vertebrate host, a lot of described species can have their validity questioned. Aiming to contribute with the knowledge about Brazilian fish trypanosomes, this study provides morphological and morphometric characterization of blood trypomastigotes from *Hypostomus affinis* and *Hypostomus luetkeni* collected in two sites of Minas Gerais state, along with their culture isolation and maintenance. The trypanosome infections were detected in 100% of *H. affinis* and 84,6% of *H. luetkeni*, showing a tendency of highest parasitemias on smaller hosts. The morphological analyses have allowed the distinction of four morphotypes, two of which are possibly not related with any fish trypanosome species previously described in Brazil. The *in vitro* isolation of parasites was achieved in three biphasic media that were tested; however, their maintenance was possible only in the hyposmotic medium. The time required for the observation of first *in vitro* epimastigotes was different for each sampling site. The culture forms observed were spheromastigote-like, epimastigote and trypomastigote, and that latest two have showed a binary fission multiplication process. The multiplication sequence of cell organelles has followed the typical pattern of freshwater fish trypanosomes, with kinetoplast division starting before nucleus division, and also the salt water trypanosomes arrangement, with nucleus multiplication occurring previously to the kinetoplast. As result of the division process were generated two trypomastigotes, two epimastigotes, or one trypomastigote and one epimastigote. The trypanosomes isolates described here have showed *in vitro* features distinct from those of single trypanosome species isolated in Brazil, nominally: their physiological characteristics related to the medium growth and the division sequence of cell organelles. Altogether, these results can suggest that these trypanosomes could belong to different species; however, this hypothesis can only be confirmed by molecular analysis.

Key words: hemoparasites, morphometry, taxonomy, *Trypanosoma*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Formas evolutivas que podem ser apresentadas por protozoários da família Trypanosomatidae .....	20
<b>Figura 2</b> Forma tripomastigota de <i>Trypanosoma</i> sp. observada na circulação sanguínea de bagres <i>Tachysurus fulvidraco</i> (Richardson, 1846).....	25
<b>Figura 3</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma percae</i> Brumpt, 1906 .....	30
<b>Figura 4</b> Parâmetros biométricos utilizados na caracterização morfométrica dos tripanossomas de peixes.....	46
<b>Figura 5</b> Morfotipos de tripomastigotas sanguíneos encontrados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG, registrados por microscopia de luz de campo claro. ....	58
<b>Figura 6</b> Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 1 encontrados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. ....	59
<b>Figura 7</b> Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 2 encontrados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. ....	60
<b>Figura 8</b> Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 3 encontrados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. ....	61
<b>Figura 9</b> Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 4 encontrados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. ....	62
<b>Figura 10</b> <i>Boxplot</i> de distintos parâmetros morfométricos obtidos a partir da mediana e que evidenciam diferenças entre os morfotipos de tripanossomas de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> do rio Paraíba do Sul, MG. ....	64
<b>Figura 11</b> Análise de Componentes Principais e agrupamento dos morfotipos de tripanossomas identificados em <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG.....	67

<b>Figura 12</b> Formas evolutivas de tripanossomas, isolados a partir do sangue de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> e mantidos <i>in vitro</i> , observados por microscopia de luz de campo claro..	71
<b>Figura 13</b> Processo de multiplicação <i>in vitro</i> dos tripanossomas de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG.	73
<b>Figura 14</b> Curva de crescimento <i>in vitro</i> de tripanossomas isolados de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> do rio Xopotó, MG.	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Espécies de <i>Trypanosoma</i> registradas em peixes de água doce do Brasil. .....	22
<b>Tabela 2</b> Testes estatísticos aplicados na análise dos morfotipos.....	52
<b>Tabela 3</b> Positividade da infecção por tripanossomas em cascudos da bacia do rio Paraíba do Sul em Minas Gerais, Brasil.....	54
<b>Tabela 4</b> Dados epidemiológicos da infecção por tripanossomas em peixes cascudos coletados na bacia do rio Paraíba do Sul em Minas Gerais, Brasil. ....	55
<b>Tabela 5</b> Dados morfométricos dos morfotipos sanguíneos dos tripanossomas de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> da bacia do rio Paraíba do Sul, MG .....	63
<b>Tabela 6</b> Correlação entre os parâmetros morfométricos adotados na caracterização dos morfotipos de tripanossomas de cascudos <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> . ....	65
<b>Tabela 7</b> Contribuição dos parâmetros morfométricos no agrupamento dos morfotipos de tripanossomas de cascudos da bacia do rio Paraíba do Sul, MG.....	66
<b>Tabela 8</b> Resultados dos modelos selecionados de acordo com o critério de informação de Akaike .....	68
<b>Tabela 9</b> Características morfométricas das formas evolutivas dos tripanossomas de <i>Hypostomus affinis</i> e <i>Hypostomus luetkeni</i> observados nas culturas <i>in vitro</i> . ....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AICc</b>	Critério de Informação de Akaike
<b>AIC wi</b>	Peso do Akaike
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BAB</b>	Base Ágar Sangue
<b>BME</b>	Meio Basal de Eagle
<b>CC</b>	Comprimento do Corpo
<b>CK</b>	Comprimento do Cinetoplasto
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro Quadrado
<b>CN</b>	Comprimento do Núcleo
<b>CT</b>	Comprimento Total do Corpo
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>F</b>	Comprimento do Flagelo Livre
<b>g</b>	Gramas
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
<b>IK</b>	Índice do Cinetoplasto
<b>IN</b>	Índice Nuclear
<b>K<sub>2</sub>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Dipotássico
<b>kb</b>	“Kilobase” - Quilobase
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>L</b>	Litro
<b>LC</b>	Largura do Corpo
<b>LK</b>	Largura do Cinetoplasto
<b>LN</b>	Largura do Núcleo
<b>Log<sub>10</sub></b>	Logaritmo de Base 10
<b>L (gi   x)</b>	Probabilidade do Modelo Obtido por Critério de Informação de Akaike
<b>mg</b>	Miligrama

<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>min.</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NA</b>	Distância da Extremidade Anterior ao Centro do Núcleo
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>n.i.</b>	Não Identificada
<b>NK</b>	Distância do Centro do Cinetoplasto ao Centro do Núcleo
<b>nº</b>	Número
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>p.i.</b>	Pós-Inoculação
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia Polimerase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PK</b>	Distância da Extremidade Posterior ao Centro do Cinetoplasto
<b>PK_Log10</b>	Distância da Extremidade Posterior ao Centro do Cinetoplasto logaritmizada em base 10
<b>PN</b>	Distância da Extremidade Posterior ao Centro do Núcleo
<b>PO</b>	Meio Modificado de Ponselle
<b>PO.8</b>	Meio Modificado de Ponselle acrescido de 8 g de NaCl
<b>rDNA</b>	DNA Ribossômico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>rRNA</b>	RNA Ribossômico
<b>seg.</b>	Segundos
<b>U</b>	Unidades
<b>v</b>	Volume
<b>µg</b>	Micrograma

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>5S rRNA</b>	RNA Ribossômico Codificado pelo Gene 5S do DNA Ribossômico
<b>18S rRNA</b>	RNA Ribossômico Codificado pelo Gene 18S do DNA Ribossômico
<b>28S rRNA</b>	RNA Ribossômico Codificado pelo Gene 28S do DNA Ribossômico
<b>ΔAICc</b>	Delta do Critério de Informação de Akaike
<b>°C</b>	Graus Celsius

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	Os Protozoários do Gênero <i>Trypanosoma</i>	19
1.2	Os Tripanossomas Parasitos de Peixes	21
1.2.1	Morfologia e Taxonomia	25
1.2.2	Ciclo de Vida	28
1.2.3	Fatores Preponderantes à Dinâmica da Infecção	30
1.2.4	Aspectos Patogênicos da Infecção no Hospedeiro Vertebrado	32
1.3	Técnicas Aplicadas ao Estudo dos Tripanossomas de Peixes	33
1.3.1	Esfregaço Sanguíneo	34
1.3.2	Isolamento em Cultura	35
1.3.3	Biologia Molecular	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	42
4.1	Coleta dos Hospedeiros e Obtenção dos Tripanossomas	42
4.2	Técnicas Parasitológicas para o Diagnóstico dos Tripanossomas	43
4.2.1	Esfregaços Sanguíneos	43
4.2.2	Cultura In Vitro	44
4.2.2.1	Meios de fase sólida	44
4.2.2.2	Meio de fase líquida	45
4.3	Caracterização dos Tripomastigotas Sanguíneos	46
4.4	Manutenção dos Tripanossomas Isolados em Cultura	47

4.5	Caracterização dos Tripanossomas Mantidos em Cultura .....	48
4.6	Técnicas Moleculares de Diagnóstico e Identificação dos Tripanossomas ..	49
4.6.1	Obtenção do DNA.....	49
4.6.2	Reação em Cadeia Polimerase .....	50
4.7	Testes Estatísticos .....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1	Infecção por Tripanossomas em Peixes da Bacia do Paraíba do Sul .....	53
5.2	Caracterização Morfológica e Morfométrica dos Tripanossomas.....	55
5.3	Isolamento, Manutenção e Características Biológicas e Morfológicas dos Tripanossomas <i>in vitro</i> .....	68
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
6.1	Aspectos Relacionados à Infecção .....	75
6.2	Características Morfológicas e Morfométricas dos Tripomastigotas Sanguíneos.....	80
6.3	Características dos Tripanossomas Mantidos <i>In Vitro</i> .....	84
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>91</b>

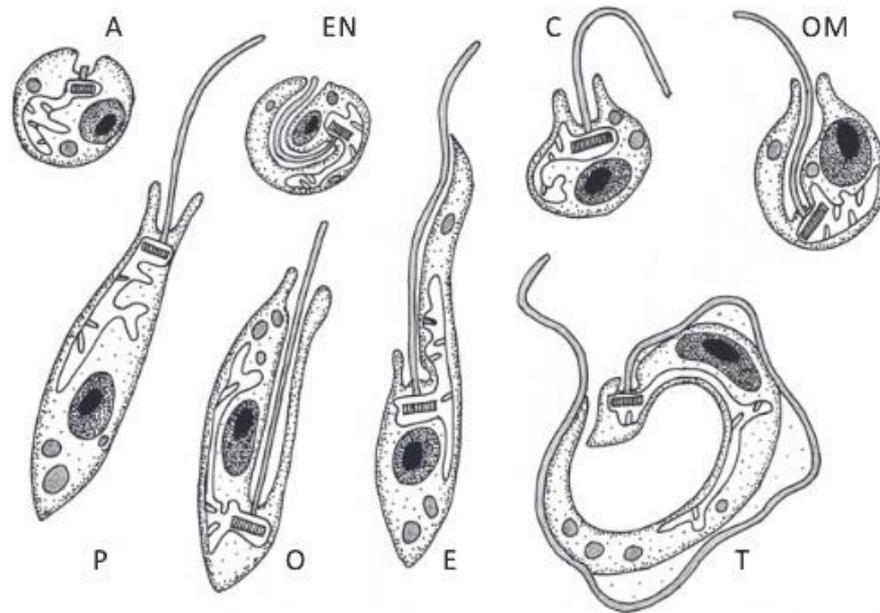
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Os Protozoários do Gênero *Trypanosoma*

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843 são flagelados da família Trypanosomatidae Doflein, 1901 que pertencem à ordem Trypanosomatida (Kent, 1880) da classe Kinetoplastea (Honigberg, 1963) (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004). A família Trypanosomatidae inclui outros gêneros de organismos exclusivamente parasitos encontrados em praticamente todas as classes de animais vertebrados, algumas classes de invertebrados e também em plantas (STEVENS, 2008; LIMA, 2011; BOTERO et al., 2013).

Os tripanossomatídeos são conhecidos por serem agentes etiológicos de importantes enfermidades humanas, como a doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1913 e as leishmanioses causadas por diferentes espécies de *Leishmania* Ross, 1903 (SIMPSON et al., 2004; SIMPSON, STEVENS e LUKES, 2006), e também por causarem doenças em animais de criação, como *Trypanosoma vivax* (Zieman, 1905) em bovinos (D'ARCHIVIO et al., 2013; SILVA et al., 2013). Além disso, estes protozoários são importantes por terem divergido evolutivamente há cerca de 100 milhões de anos (STEVENS e GIBSON, 1999; SIMPSON, STEVENS e LUKES, 2006), permitindo que eles acumulassem, em seu DNA, aspectos únicos e intrigantes quanto a sua biologia (SIMPSON et al., 2000; LUKES et al., 2002).

Os tripanossomatídeos apresentam diferentes formas de desenvolvimento durante seu ciclo de vida (Fig. 1) (VICKERMAN, 1976; MCGHEE e CROSGROVE, 1980; MASLOV, PODLIPAEV e LUKES, 2001), mas todas possuem apenas um flagelo (MCGHEE e CROSGROVE, 1980; DOLEZEL et al., 2000; MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004) e um cinetoplasto com o DNA (kDNA) organizado em mini e maxi-círculos em forma de rede catenada (BREWSTER, ASLETT e BARKER, 1998; DOLEZEL et al., 2000; KLINGBEIL et al., 2001; LUKES et al., 2002; MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004).



**Figura 1** Formas evolutivas que podem ser apresentadas por protozoários da família Trypanosomatidae: amastigota (A), endomastigota (EN), coanomastigota (C), opistomorfo (OM), promastigota (P), opistomastigota (O), epimastigota (E) e tripomastigota (T). Fonte: Maslov et al. (2013, p. 45).

O primeiro relato de tripanossomas é atribuído a Valentin (1841) que teria observado esses hemoflagelados em amostras sanguíneas de trutas-marrom *Salmo trutta* L., 1758, porém Laveran e Mesnil (1901 apud HOARE, 1972) contestaram esta identificação e sugeriram que o protozoário em questão seria pertencente ao gênero *Trypanoplasma* (Leidy, 1846). Em 1843, Mayer encontrou diversas formas de um mesmo parasito de anuro, descrevendo-o como *Amoeba rotatorium*, *Paramecium loricatum* e *Paramecium costatum*; em seguida, Gruby identificou os mesmos organismos e propôs o nome de *Trypanosoma sanguinis* (apud WENYON, 1926). Visando solucionar esse problema taxonômico, Laveran e Mesnil (1901) propuseram a modificação do nome da espécie para *Trypanosoma rotatorium*, tornando essa a espécie tipo do gênero (BARDSLEY e HARMSEN, 1973 apud LEMOS, 2012).

Desde a constatação das doenças causadas pelos tripanossomas, principalmente em mamíferos, o interesse em seu estudo cresceu e diversas espécies passaram a ser estudadas e descritas levando em consideração a doença que causavam, os seus hospedeiros e a sua distribuição biogeográfica (GIBSON, 2007). Entretanto, como algumas espécies podem compartilhar hospedeiros em uma mesma região e podem ser morfológicamente muito similares, os pesquisadores passaram a questionar e a reavaliar estes estudos (HOARE, 1972; GIBSON, 2007).

Com o advento da taxonomia molecular, muito tem sido descoberto a respeito destes parasitos, retomando a discussão sobre as características que realmente podem permitir a diferenciação entre as espécies (GIBSON, 2007; ZINGALES et al., 2009; ADAMS et al., 2010; VOTÝPKA et al., 2015). Atualmente, a biologia molecular tem auxiliado os investigadores na validação e identificação das espécies de tripanossomas posicionando-as dentro de árvores filogenéticas, que além de indicarem suas relações umas com as outras, também podem inferir se as diferenças genótípicas são suficientes, ou não, para a definição de uma nova espécie (ZINGALES et al., 2009; ADAMS et al., 2010; VOTÝPKA et al., 2015).

## **1.2 Os Tripanossomas Parasitos de Peixes**

Levando em consideração o conhecimento disponível a respeito dos tripanossomas de mamíferos, o estudo sobre os tripanossomas de peixes ainda pode ser considerado um campo negligenciado (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014). Desde a observação de Valentin até os dias atuais, mais de 200 espécies de tripanossomas foram descritas em peixes de água doce e salgada (LOM, 1979; EIRAS et al., 2012; HAYES et al., 2014; LEMOS et al., 2015) em todo o mundo, inclusive no Brasil (Tabela 1). Entretanto, a maior parte destas espécies foi tradicionalmente identificada de acordo com sua morfologia no sangue do hospedeiro vertebrado (FRÓES et al., 1979; BARA, 1984; GUPTA, 2006) e também considerando-se a hipótese da especificidade parasito-hospedeiro (LETCH, 1977; FRÓES et al., 1978). Desta forma, assim como constatado no passado para os tripanossomas de mamíferos, atualmente acredita-se que a validade da descrição de algumas espécies de tripanossomas de peixes possa ser contestada (WOO e BLACK, 1984; EIRAS et al., 2012; HAYES et al., 2014).

**Tabela 1** Espécies de *Trypanosoma* registradas em peixes de água doce do Brasil.

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro<sup>a</sup></b>	<b>Estado</b>	<b>Autores</b>
<i>Trypanosoma abeli</i>	<i>Hypostomus affinis</i>	MG	Lemos et al. (2015)
	<i>Hypostomus luetkeni</i>	MG	Lemos et al. (2015)
	<i>Ancistrus</i> sp.	N.I. <sup>c</sup>	Lemos et al. (2015)
<i>Trypanosoma affonsoi</i>	<i>Hypostomus tietensis</i>	SP	Lopes et al. (1992c)
<i>Trypanosoma albopunctatus</i>	<i>Hypostomus albopunctatus</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928a)
<i>Trypanosoma anusi</i>	<i>Loricariichthys anus</i>	RS	Fróes et al. (1979)
<i>Trypanosoma azoubeli</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	MS	Albuquerque et al. (1996) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma barrettoi</i>	<i>Hypostomus paulinus</i>	SP	Lopes et al. (1990a)
<i>Trypanosoma barrosi</i>	<i>Hypostomus</i> sp.	GO	Ribeiro et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma birmani</i>	<i>Hypostomus commersoni</i>	SP	Ribeiro et al. (1991)
<i>Trypanosoma brasiliensis</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchus</i>	PR	Eiras (1991)
<i>Trypanosoma brenteganii</i>	<i>Squaliforma emarginata</i>	GO	Ribeiro et al. (1992a)
<i>Trypanosoma britskii</i>	<i>Loricaria lentiginosa</i>	SP	Lopes et al. (1991a)
<i>Trypanosoma bourrouli</i>	<i>Synbranchus marmoratus</i>	RJ	Neiva e Pinto (1926)
<i>Trypanosoma camposi</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	MG	Lopes et al. (1993b)
<i>Trypanosoma chaetostomi</i>	<i>Chaetostomus</i> sp.	SP	Fonseca e Vaz (1929)
		MG	Horta (1910)
<i>Trypanosoma chagasi</i>	<i>Hypostomus punctatus</i>	RJ	Horta (1910)
		RJ	Bara (1984)
<i>Trypanosoma clarus</i>	<i>Schizodon borellii</i>	PR	Eiras (1991)
<i>Trypanosoma commersonii</i>	<i>Hypostomus commersoni</i>	RS	Fróes et al. (1979)
<i>Trypanosoma coriaceus</i>	<i>Trachelyopterus coriaceus</i>	PR	Mendes et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma costae</i>	<i>Leporinus elongatus</i>	PR	Satake et al. (1992)
<i>Trypanosoma dominguesi</i>	<i>Hypostomus alatus</i>	MG	Lopes et al. (1989)
<i>Trypanosoma dorbignyi</i>	<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928a)
<i>Trypanosoma ferreirae</i>	Characinidae n.i. <sup>b</sup>	SP	Fonseca e Vaz (1928a)
<i>Trypanosoma francirochai</i>	<i>Hisonotus francirochai</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928b)
<i>Trypanosoma garavelloi</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	SP	Lopes et al. (1992a)

<i>Trypanosoma grandinii</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	PR	Lopes et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma guaibensis</i>	<i>Hypostomus commersoni</i>	RS	Fróes et al. (1978)
	<i>Loricariichthys anus</i>	RS	Fróes et al. (1978)
	<i>Hypostomus punctatus</i>	RJ	Bara (1984)
<i>Trypanosoma guairaensis</i>	<i>Megalancistrus parananus</i>	PR	Eiras et al. (1989)
<i>Trypanosoma hypostomi</i>	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	SP	Splendore (1910)
<i>Trypanosoma iheringi</i>	<i>Franciscodoras marmoratus</i>	SP	Fonseca (1935)
<i>Trypanosoma immanis</i>	<i>Loricariichthys anus</i>	SP	Fróes et al. (1978)
<i>Trypanosoma itoi</i>	<i>Hypostomus</i> sp.	SP	Ribeiro et al. (1990a)
<i>Trypanosoma lamanoi</i>	<i>Hypostomus ancistroides</i>	SP	Costa et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma limae</i>	<i>Hoplias lacerdae</i>	MT	Lopes et al. (1996) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma larai</i>	<i>Prochilodus</i> sp.	SP	Fonseca e Vaz (1929)
<i>Trypanosoma lopesi</i>	<i>Rhinelepis aspera</i>	SP	Ribeiro et al. (1989)
<i>Trypanosoma loricariae</i>	<i>Loricaria</i> sp.	SP	Fonseca e Vaz (1928b)
<i>Trypanosoma macrodonis</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>	SP	Botelho (1907)
<i>Trypanosoma maculatus</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	SP	Albuquerque et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma margaritiferi</i>	<i>Hypostomus margaritifer</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928b)
<i>Trypanosoma nupelianus</i>	<i>Rhinelepis aspera</i>	PR	Eiras et al. (1990)
<i>Trypanosoma nutii</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	SP	Ribeiro et al. (1993a)
<i>Trypanosoma paranaensis</i>	<i>Trachydoras paraguayensis</i>	PR	Eiras (1991)
<i>Trypanosoma petenuscii</i>	<i>Hypostomus</i> sp.	PR	Carraro et al. (1992) <sup>d</sup>
<i>Trypanosoma piavae</i>	Characinidae n.i. <sup>b</sup>	SP	Fonseca e Vaz (1928)
<i>Trypanosoma pintoii</i>	<i>Hypostomus</i> sp.	SP	Ribeiro et al. (1990b)
<i>Trypanosoma piracicabae</i>	<i>Loricaria piracicabae</i>	SP	Fonseca e Vaz (1929)
<i>Trypanosoma plecostomi</i>	<i>Plecostomus</i> sp.	SP	Fonseca e Vaz (1928b)
<i>Trypanosoma pradoi</i>	<i>Hypostomus ancistroides</i>	SP	Ribeiro et al. (1993b)
<i>Trypanosoma regani</i>	<i>Hypostomus regani</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928)
<i>Trypanosoma regoi</i>	<i>Loricariichthys platymetopon</i>	PR	Eiras (1991)

<i>Trypanosoma rhamdiae</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	SP RS	Botelho (1907) Fróes et al. (1978)
<i>Trypanosoma saadi</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	SP	Lopes et al. (1990b)
<i>Trypanosoma salae</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>	PR	Lopes et al. (1993a)
<i>Trypanosoma satakei</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	SP	Nuti-Sobrinho et al. (1987)
<i>Trypanosoma scrofae</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	PR	Eiras e Pavanelli (1989)
<i>Trypanosoma splendorei</i>	<i>Rhamdia quelen</i> <i>Rhamdia quelen</i>	SP RS	Splendore (1910) Fróes et al. (1978)
<i>Trypanosoma strigaticeps</i>	<i>Hypostomus strigaticeps</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928a)
<i>Trypanosoma valerii</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	GO	Lopes et al. (1991b)
<i>Trypanosoma vallei</i>	<i>Hypostomus</i> sp.	SP	Lopes et al. (1992b)
<i>Trypanosoma vasconcelosi</i>	<i>Pterygoplichthys</i> <i>multiradiatus</i>	GO	Ribeiro et al. (1992b)
<i>Trypanosoma venustissimum</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	RS	Fróes et al. (1979)
<i>Trypanosoma watanabei</i>	<i>Pterygoplichthys lituratus</i>	GO	Lopes et al. (1992d)
<i>Trypanosoma zungaro</i>	<i>Zungaro zungaro</i>	SP	Fonseca e Vaz (1928a)

<sup>a</sup> Nomes de espécies atualizados de acordo com FishBase (FROESE e PAULY, 2015).

<sup>b</sup> Espécie não identificada da família Characinidae.

<sup>c</sup> Localidade de coleta identificada como Bacia Amazônica, estado não informado.

<sup>d</sup> Apud Eiras et al. (2012).

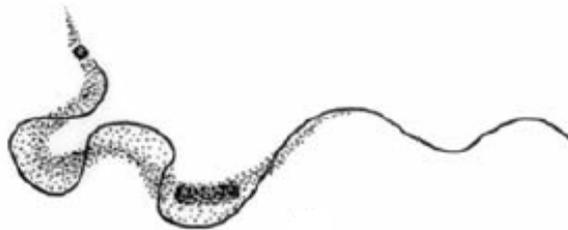
Diante do problema taxonômico encontrado dentre os tripanossomas de peixes, a caracterização molecular surgiu como ferramenta alternativa, sobretudo para auxiliar na identificação de espécies (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; HAYES et al., 2014; LEMOS et al., 2015), com ampla utilização dos genes que codificam a menor subunidade de RNA ribossômico (18S rRNA) (MASLOV et al., 1996; DAVIES et al., 2005; GIBSON et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014). Embora essa ferramenta venha permitindo a confirmação de espécies já descritas e/ou identificação de novas de espécies de tripanossomas de peixe em todo o mundo, no Brasil, até o momento, apenas *Trypanosoma abeli* Lemos & Souto-Padrón, 2015 teve sua caracterização molecular realizada (LEMOS et al., 2015).

Da mesma forma, apesar de o isolamento e a manutenção dos tripanossomas de peixes *in vitro* terem sido realizados para algumas espécies da América do Norte

e da Europa (PRESTON, 1969; JONES e WOO, 1991b; DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995; BIENEK e BELOSEVIC, 1997), no Brasil somente *T. abeli* foi isolado até o momento (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015). O isolamento em cultivo, além de permitir o estudo das formas de desenvolvimento desses parasitos (JONES e WOO, 1991b; LEMOS, 2012; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015), também é de grande importância para a caracterização molecular dos tripanossomas, pois a produção de clones isolados permite que a caracterização seja realizada sem a interferência de possíveis infecções mistas encontradas na natureza (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015).

### 1.2.1 Morfologia e Taxonomia

Os tripanossomas são encontrados na corrente sanguínea dos peixes na forma tripomastigota (CRUZ, 1995) que é caracterizada por apresentar cinetoplasto posterior ao núcleo e uma porção livre do flagelo na extremidade anterior do corpo. O flagelo emerge da extremidade posterior e margeia a extensão corporal, causando o efeito de uma membrana ondulante em virtude do seu batimento (Fig. 2) (VICKERMAN, 1969).



**Figura 2** Forma tripomastigota de *Trypanosoma* sp. observada na circulação sanguínea de bagres *Tachysurus fulvidraco* (Richardson, 1846). Fonte: Gu et al. (2007b, p. 728).

Existem diversas descrições morfológicas de espécies de tripanossomas de peixes na literatura (FONSECA, 1935; FRÓES et al., 1978, 1979; EIRAS, REGO e PAVANELLI, 1989, 1990), porém atualmente sabe-se que grande parte desses

parasitos exibem um considerável pleomorfismo (FRÓES et al., 1979; WOO e BLACK, 1984; CRUZ, 1995; GUPTA, 2006; EIRAS et al., 2012; LEMOS et al., 2015).

O pleomorfismo é a manifestação de diferentes tipos morfológicos (morfotipos) para um mesmo genótipo (GUPTA, 2006), sendo que suas causas podem ser o estágio da infecção (KHAN, 1976; GUPTA, 2006) e a espécie hospedeira (WOO e BLACK, 1984; HAYES et al., 2014). No início da infecção no hospedeiro vertebrado, as formas menores e delgadas dos tripanossomas são frequentemente observadas e, com o passar dos dias, os tripanossomas podem apresentar aumento de tamanho, variações na coloração em esfregaço sanguíneo, aumento do número de grânulos e/ou vacúolos em seu citoplasma e cariossoma nuclear evidenciado (KHAN, 1976; LETCH, 1980; CRUZ, 1995; GUPTA, 2006). Woo e Black (1984) demonstraram que, de acordo com a espécie do hospedeiro vertebrado infectado, *Trypanosoma danilewskyi* Laveran & Mesnil, 1904 apresenta variações morfométricas em parâmetros considerados importantes na identificação de espécies de tripanossomas, como comprimento do núcleo, distância da extremidade posterior ao centro do cinetoplasto e comprimento do corpo.

Algumas descrições de espécies foram feitas baseadas na hipótese da especificidade parasito-hospedeiro, assumindo, assim, que todos os tripomastigotas encontrados em um determinado hospedeiro pertenceriam a uma única espécie pleomórfica (HORTA, 1910; FONSECA e VAZ, 1928a, 1928b, 1929; FONSECA, 1935; FRÓES et al., 1978, 1979). Entretanto, conforme observado para *T. danilewskyi*, muitos tripanossomas de peixes não são específicos quanto ao hospedeiro vertebrado (WOO e BLACK, 1984; DAVIES et al., 2005; GU et al., 2007b; LEMOS et al., 2015) e podem apresentar alterações morfológicas de acordo com a espécie de peixe parasitada (WOO e BLACK, 1984). Além disso, está claro que mais de uma espécie de tripanossoma pode ocorrer simultaneamente no mesmo hospedeiro (BARA, 1984; DAVIES et al., 2005; GU et al., 2007b; LEMOS et al., 2015). Por exemplo, Bara (1984) encontrou infecção simultânea por *Trypanosoma chagasi* Horta, 1910 e *Trypanosoma guaibensis* Fróes, Fortes, Lima & Leite, 1978 em cascudos da espécie *Hypostomus punctatus* Valenciennes, 1840, no Rio de Janeiro, Brasil, enquanto Davies et al. (2005) e Gu et al. (2007b) observaram que peixes da mesma espécie podem ser infectados por tripanossomas geneticamente distintos. Lemos et al. (2015), estudando os tripanossomas de peixes no Brasil, encontraram evidências moleculares que sugerem que uma mesma

espécie de peixe pode ser infectada por mais de uma espécie de tripanossoma e, também, que *T. abeli* pode parasitar distintas espécies de peixes.

Diante da constatação de que o pleomorfismo pode induzir a inconsistências taxonômicas (WOO e BLACK, 1984; CRUZ, 1995; EIRAS et al., 2012; LEMOS, 2012), a observação de outros aspectos biológicos, como os relacionados ao ciclo de vida e caracterização das formas de desenvolvimento *in vivo*, no hospedeiro invertebrado, e *in vitro*, passaram a ser utilizadas e consideradas de grande importância para a caracterização e identificação destes parasitos (JONES e WOO, 1990, 1991a, 1991b). Assim, Jones e Woo (1990) descreveram *Trypanosoma phaleri* enfatizando seu pleomorfismo em diferentes espécies de peixes e também a especificidade que possui quanto ao hospedeiro invertebrado.

Outra ferramenta adicional que pode ser utilizada para a caracterização desses parasitos é a ultraestrutura celular (LEMOS, 2012; LEMOS et al., 2015). Entretanto, os estudos envolvendo este aspecto foram realizados em menor escala quando comparados aos estudos morfológicos, tendo sido empregado apenas para poucas espécies descritas (PRESTON, 1969; LEWIS e BALL, 1980; PATERSON e WOO, 1984; DAVIES et al., 1999; GU et al., 2007c; LEMOS et al., 2015). Nos estudos realizados até o momento, foram investigadas as formas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado de *T. danilewskyi*, *Trypanosoma pseudobagri* Dogiel & Achmerov, 1959 e *T. abeli* (PATERSON e WOO, 1984; GU et al., 2007c; LEMOS et al., 2015), as formas encontradas no hospedeiro invertebrado de *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1883 e *T. abeli* (LEWIS e BALL, 1980; LEMOS et al., 2015), e as formas em cultura de *Trypanosoma raiiae* (Laveran & Mesnil, 1902), *Trypanosoma granulorum* Laveran & Mesnil, 1902 e *T. abeli* (PRESTON, 1969; DAVIES et al., 1999; LEMOS et al., 2015).

Além disso, nas últimas décadas, a utilização de métodos moleculares na taxonomia destes tripanossomas vem aumentando e acrescentando informações que auxiliam na caracterização e identificação das espécies (KOLESNIKOV et al., 1995; FIGUEROA et al., 1999; GU et al., 2007a; GU et al., 2007b; GU et al., 2010; LEMOS et al., 2015). As sequências utilizadas baseiam-se na amplificação de genes como o gene do 18S rRNA (MASLOV et al., 1996; GU et al., 2007a; LEMOS et al., 2015), gene do 5S rRNA (LEMOS, 2012), o gene do *spliced leader* RNA (GIBSON et al., 2000; LEMOS, 2012), o gene do GAPDH (LEMOS et al., 2015) e também genes mitocondriais (KOLESNIKOV et al., 1995).

Davies et al. (2005), estudando tripanossomas de peixes da África, analisaram o gene 18S rRNA dos tripanossomas com similaridades morfológicas a *Trypanosoma mukasai* (Hoare, 1932) e constataram que eles pertencem a diferentes subgrupos genéticos. *Trypanosoma pleuronectidium* Robertson, 1906 e *Trypanosoma murmanense* Nikitin, 1927 encontrados em bacalhau-do-atlântico *Gadus morhua* L., 1758 além de serem distintos morfológicamente também apresentam diferenças genéticas quanto ao gene 18S rRNA (KARLSBAKK e NYLUND, 2006). Gu et al. (2007a) utilizaram sequência do gene 18S rRNA combinada com as características morfológicas dos tripanossomas encontrados na carpa chinesa *Siniperca chuatsi* (Basilewsky, 1855) para redescrever *Trypanosoma siniperca* Chang, 1964. Lemos et al. (2015) utilizaram as regiões hipervariáveis do gene 18S rRNA e o gene que codifica para a enzima GAPDH associados à morfologia e ao processo de desenvolvimento, tanto *in vitro* quanto no hospedeiro invertebrado, para caracterizar *T. abeli* encontrado em cascudos de diferentes biomas do Brasil.

Desta forma, constata-se que uma possível solução para a taxonomia dos tripanossomas de peixes é o isolamento *in vitro* (JONES e WOO, 1991b; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015) aliado ao uso da biologia molecular (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015) e da caracterização morfológica tradicional (GU et al., 2007b; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; HAYES et al., 2014; LEMOS et al., 2015).

### **1.2.2 Ciclo de Vida**

Os hirudíneos, popularmente conhecidos como sanguessugas, são os hospedeiros invertebrados dos tripanossomas de peixe e representam a única via de infecção até hoje conhecida para o hospedeiro vertebrado (JONES e WOO, 1991a; WOO, 2006). Eles tornam-se infectados ao ingerir os tripomastigotas presentes no sangue de peixes parasitados, que se reproduzem e se diferenciam no interior do

seu sistema digestório (Fig. 3) (KHAN, 1976; LECTH, 1980; WOO, 1981; JONES e WOO, 1990, 1992; KARLSBAKK, HAUGEN e NYLUND, 2005; WOO, 2006).

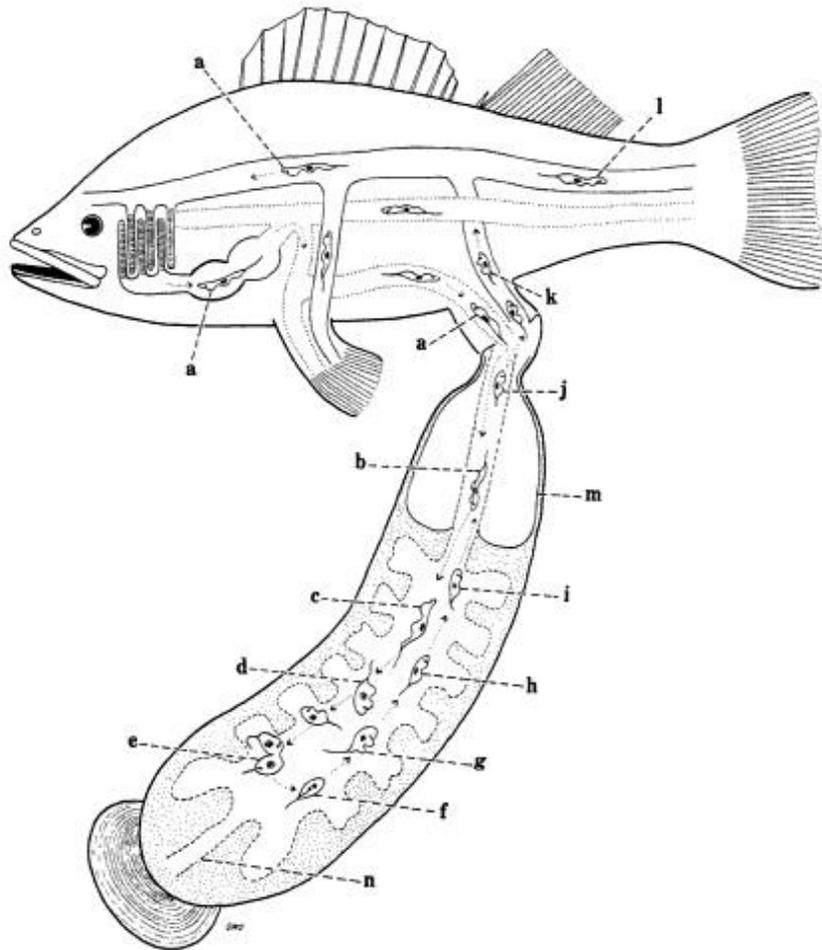
O desenvolvimento dos tripanossomas no hospedeiro invertebrado, embora ainda não seja um processo conhecido para todas as espécies, foi estudado e descrito por Brumpt (1906 apud LEMOS, 2012) das seguintes formas: 1) desenvolvimento exclusivamente no estômago com migração para a probóscide somente no momento da hematofagia, 2) desenvolvimento no estômago e no intestino com migração para a probóscide antes da hematofagia, e 3) desenvolvimento no estômago com migração para a probóscide antes da hematofagia.

D'Agosto e Serra-Freire (1993) observaram formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas na probóscide e no estômago de hirudíneos do gênero *Batracobdella* Viguier, 1879. Recentemente, Lemos et al. (2015), ao investigarem o desenvolvimento dos tripanossomas em sanguessugas *Haementeria brasiliensis* Pinto, 1923, encontraram formas epimastigotas nos cecos estomacais e intestinos, e tripomastigotas na probóscide e também nos cecos estomacais. As formas tripomastigotas observadas no hospedeiro invertebrado se mostraram menores e mais delgadas do que as encontradas na circulação do hospedeiro vertebrado (D'AGOSTO e SERRA-FREIRE, 1993; LEMOS et al., 2015).

O processo de transmissão da infecção ao hospedeiro vertebrado ocorre no momento da hematofagia das sanguessugas infectadas, em que a ferida aberta no tegumento do peixe permite que as formas tripomastigotas metacíclicas atinjam sua corrente sanguínea (LEMOS, 2012). Uma vez na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos podem iniciar seu processo reprodutivo (Fig. 3) (WOO, 1981; BURRESON e KARLSBAKK, 2007; PÁDUA et al., 2011; SU et al., 2014).

A divisão desses parasitos nos peixes se inicia com a formação de um novo flagelo seguida pela divisão binária do cinetoplasto; a extremidade posterior do corpo se alarga adquirindo um formato mais arredondado; o novo flagelo cresce, se direcionando posteriormente; o núcleo se divide e um deles migra posteriormente posicionando-se após os cinetoplastos; a citocinese ocorre por constrição do corpo em um ponto entre os dois cinetoplastos (WOO, 1981; PATERSON e WOO, 1984; JONES e WOO, 1991b; WOO, 2006). Devido a fatores não compreendidos, o processo reprodutivo pode apresentar anormalidades, como a presença de dois

núcleos e um cinetoplasto ou a presença de um cinetoplasto e ausência de núcleo (WOO, 1981), podendo ainda diferir quanto à sequência de duplicação das organelas, como a segregação tardia do cinetoplasto em *Trypanosoma pacifica* Burreson & Pratt, 1972, somente após a divisão do núcleo (BURRESON e KARLSBAKK, 2007).



**Figura 3** Ciclo de vida de *Trypanosoma percae* Brumpt, 1906 adaptada de Olsen (1974, p. 47). Tripomastigotas (a, b, c), forma em transição de tripomastigota para epimastigota (d), divisão e formação de epimastigotas (e, f) e tripomastigotas metacíclicos (g, h, i, j, k).

### 1.2.3 Fatores Preponderantes à Dinâmica da Infecção

Alguns estudos sobre infecções naturais abordaram a relação entre a parasitemia e parâmetros epidemiológicos, como tamanho/idade do hospedeiro

vertebrado (TANDON e JOSHI, 1973; BARA, 1984; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; CRUZ, 1995; MALOVIC, HEMMINGSEN e MACKENZIE, 2010; LEMOS, 2012), sexo dos hospedeiros (MALOVIC, HEMMINGSEN e MACKENZIE, 2010; LEMOS, 2012), área de coleta (MALOVIC, HEMMINGSEN e MACKENZIE, 2010) e estações do ano/temperatura da água (HORTA, 1910; LEMOS, 2012).

Segundo Malovic, Hemmingsen e Mackenzie (2010), os parâmetros que podem influenciar nas altas parasitemias de *T. murmanense* podem diferir de acordo com a espécie do hospedeiro, sendo observado que em *G. morhua* os hospedeiros com idade inferior a dois anos apresentaram menor carga parasitária; em “haddock” *Melanogrammus aeglefinus* (L., 1758), a área de coleta foi o fator de influência na parasitemia; e em solha americana *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius, 1780), a maior parasitemia foi encontrada nos exemplares do sexo feminino.

Ao contrário do que foi observado para infecções de *T. murmanense* em *G. morhua* (MALOVIC, HEMMINGSEN e MACKENZIE, 2010) e também para *T. granulorum* em enguias da Europa (CRUZ, 1995), diversos autores registraram, para diferentes espécies de tripanossomas e de peixes, uma carga parasitária maior nos hospedeiros menores e mais jovens (TANDON e JOSHI, 1973; BARA, 1984; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; MALOVIC, HEMMINGSEN e MACKENZIE, 2010; LEMOS, 2012).

Lemos (2012), ao relacionar a carga parasitária em cascudos *Hypostomus affinis* (Steindachner, 1877) com as estações do ano e com a maturação sexual, registrou o pico da infecção no inverno e maior carga parasitária nas fêmeas. Observações com o mesmo tipo de alteração sazonal também foram feitas por Horta (1910) quando investigou a infecção por *T. chagasi* em cascudos da espécie *H. punctatus*.

Além disso, é importante considerar que alterações na temperatura do ambiente podem influenciar a velocidade de multiplicação dos tripanossomas (ISLAM e WOO, 1992), o metabolismo e sistema imunológico dos peixes (BOWDEN et al., 2007; BOWDEN, 2008; DITTMAR et al., 2014) e, também, o comportamento de algumas espécies de sanguessugas, que podem tornar-se mais responsivas a perturbações na água (ELLIOT e TULLET, 1986; ELLIOT e KUTSCHERA, 2011). Desta forma, os fatores ambientais, aliados às características dos hospedeiros, podem causar desequilíbrios na relação parasito-hospedeiro, resultando em altas parasitemias.

#### **1.2.4 Aspectos Patogênicos da Infecção no Hospedeiro Vertebrado**

A infecção por tripanossomas em peixes tem curso crônico, sendo a parasitemia mais alta no início da infecção, reduzindo progressivamente com o decorrer do tempo (KHAN, 1976; LETCH, 1980; ISLAM e WOO, 1991b). Dentre os distúrbios causados nos animais infectados, a anemia é considerada um sinal clínico clássico (KHAN, 1985) e está diretamente relacionada com a parasitemia (WOO, 2006; AHMED et al., 2011). Alguns fatores, como o aumento do volume de sangue de acordo com o aumento da parasitemia, a secreção de proteases pelos tripanossomas, que promovem a lise de eritrócitos na ausência de anticorpos específicos (ISLAM e WOO, 1991a; WOO, 2006; GUPTA e GUPTA, 2012) e a falha dos órgãos hematopoiéticos (DYKOVÁ e LOM, 1979; KHAN, 1985), são considerados causas prováveis desta anemia.

Em peixes marinhos experimentalmente infectados por *T. murmanense* foram observadas alterações fisiopatológicas em diferentes órgãos e maior taxa de mortalidade nos espécimes jovens (KHAN, 1985). Por exemplo, Dyková e Lom (1979) registraram diversas alterações em órgãos vitais, tais como: hiperplasia acentuada de precursores hematopoiéticos e células plasmáticas nos rins; modificações no epitélio do túbulo renal; pequenos focos de necrose e infiltrados de tripanossomas e macrófagos no baço; alterações nos hepatócitos; aumento do tamanho das células endoteliais das veias hepáticas; desintegração excessiva de eritrócitos nos rins e no baço. Além disso, em infecções experimentais por *T. danilewskyi* em peixes-dourados *Carassius auratus* (L., 1758) foi verificada anorexia associada com alta parasitemia (ISLAM e WOO, 1991b).

Embora algumas espécies de tripanossomas causem mortalidade e morbidade dos hospedeiros vertebrados (ARDELLI e WOO, 1998), a persistência da infecção com a sobrevivência do hospedeiro pode indicar uma coevolução parasito-hospedeiro, com um delicado balanço entre os mecanismos de evasão do parasito e o sistema imune dos peixes (OVERATH et al., 1999; WIEGERTJES e FORLENZA, 2010). Desta forma, a correta identificação das diferentes espécies de tripanossomas de peixes que ocorrem no Brasil torna-se importante não só para o conhecimento de potenciais patógenos da ictiofauna, mas também para auxiliar

estudos filogenéticos que visem compreender as adaptações sofridas por esses parasitos para sobreviver em diferentes hospedeiros e em diferentes regiões geográficas (KELLY et al., 2014), assim como tem sido registrado para tripanossomas de mamíferos (ECHODU et al., 2015; GREIF et al., 2015).

### 1.3 Técnicas Aplicadas ao Estudo dos Tripanossomas de Peixes

A escolha do método de diagnóstico parasitológico a ser utilizado varia de acordo com os recursos disponíveis, mas principalmente de acordo com o objetivo do estudo (FAO, 1998) e com os aspectos epidemiológicos da doença (LUCKINS, 1993). Dentre as técnicas utilizadas no estudo dos tripanossomas de peixes, serão discutidas o esfregaço sanguíneo, a cultura *in vitro* e a biologia molecular.

As técnicas de microscopia, por exame de sangue a fresco ou de esfregaços sanguíneos corados, representam um método fácil e de rápida aplicação (LUCKINS, 1993) que permite o diagnóstico e a identificação dos parasitos (ROSENBLATT, 2009; MUIEED, CHAUDHARY e SHAKOORI, 2010). A cultura *in vitro*, além de representar outra técnica para detecção da infecção (DAVIES et al., 1992; LEMOS, 2012; BORGES et al., dados não publicados<sup>1</sup>), permite a obtenção de grandes números de parasitos que podem ser requeridos e utilizados em diferentes estudos (VISVESVARA e GARCIA, 2002). Os testes moleculares, tais como a reação em cadeia polimerase (PCR), têm sido cada vez mais utilizados (MASLOV et al., 1996; DAVIES et al., 2005; GIBSON et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; LEMOS, 2012), não só para o diagnóstico (DAVIES et al., 2005; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014), mas principalmente para auxiliar na identificação das espécies dos tripanossomas de peixes (KARLSBAKK e NYLUND, 2006; GU et al., 2007a; LEMOS et al., 2015).

---

<sup>1</sup> Trabalho em fase de elaboração.

### 1.3.1 Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é um método de diagnóstico de baixo custo (VALKIÜNAS et al., 2008) amplamente utilizado em estudos parasitológicos. A sensibilidade de detecção dos parasitos por meio desta técnica é, no entanto, claramente influenciada pelo nível de experiência do observador, nível da parasitemia (MUIEED, CHAUDHARY e SHAKOORI, 2010), número de campos analisados (ROSENBLATT, 2009) e pela qualidade do esfregaço (VALKIÜNAS et al., 2008).

Lemos et al. (2015) registraram 100% e 90% de prevalência da infecção por tripanossomas em cascudos *H. affinis* e *Hypostomus luetkeni* (Steindachner, 1877), respectivamente, utilizando o exame de esfregaços sanguíneos. Entretanto, diferentes estudos demonstraram que esta técnica pode levar à subestimação da prevalência (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; DAVIES et al., 2005; PÁDUA et al., 2011). Considerando o curso crônico da infecção caracterizada por baixas parasitemias, os esfregaços sanguíneos são indicados em combinação com outros métodos de diagnóstico, tais como exame a fresco (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; PÁDUA et al., 2011), centrifugação de micro-hematócrito (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; PÁDUA et al., 2011; FUJIMOTO et al., 2013) e, também, PCR (DAVIES et al., 2005).

Apesar de suas limitações, o esfregaço sanguíneo pode ser empregado para a identificação de espécies (ROSENBLATT, 2009), enquanto as técnicas de concentração, como centrifugação do micro-hematócrito, interferem na morfologia dos parasitos (WOO, 1969) e as técnicas moleculares ignoram este aspecto (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014). Assim, atendendo à necessidade de se combinar análises morfológicas com a caracterização molecular para a identificação das espécies de tripanossomas de peixes (GU et al., 2007b), o esfregaço sanguíneo apresenta-se como uma técnica de fundamental importância em estudos que visem contribuir para a elucidação da taxonomia destes parasitos.

### 1.3.2 Isolamento em Cultura

Desde o início dos estudos com protozoários do gênero *Trypanosoma*, o estabelecimento de protocolos eficientes para cultura *in vitro* desses parasitos têm sido um dos principais objetivos da comunidade científica (SCHUSTER e SULLIVAN, 2002). Atualmente, essa técnica representa um segmento essencial na protozoologia de parasitos (AHMED, 2014), permitindo estudos sobre sua fisiologia, comportamento e metabolismo, como também produzindo número suficiente de parasitos para realização de ensaios imunológicos e quimioterápicos (VISVESVARA e GARCIA, 2002; AHMED, 2014) e, também, de investigações detalhadas sobre sua ultraestrutura (LEMOS et al., 2015). Entretanto, a padronização de uma cultura não é uma tarefa simples (AHMED, 2014), sendo necessária uma cuidadosa observação e combinação das exigências nutricionais do parasito com a temperatura e pH ideais (PRESTON, 1969; ABOLARIN, 1970; CRUZ, 1995; ARDELLI e WOO, 1998; VISVESVARA e GARCIA, 2002; AHMED, 2014; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Além disso, seu emprego no diagnóstico de parasitos deve ser feito com cautela, pois existem evidências de que, em casos de infecções mistas, pode ocorrer seleção de espécies (LEMOS et al., 2015).

O primeiro isolamento *in vitro* de tripanossomas de peixes foi realizado por Thomson (1908), que manteve estes parasitos por cerca de 40 dias, utilizando o meio de Novy e McNeal com modificações de Nocht e Mayer (apud THOMSON, 1908). Jones e Woo (1991b) utilizaram um meio bifásico, constituído de base de ágar sangue modificada de Ponselle (1913 apud JONES e WOO, 1991b) como fase sólida e Meio Basal de Eagle suplementado com soro fetal bovino e hemina como fase líquida, para o isolamento de *Trypanosoma catostomi* Daly & DeGiusti, 1971 e *T. phaleri*. Davies et al. (1992) desenvolveram um método simples para o isolamento de *T. granulorum*, parasito de enguias, que consiste de solução de Ringer associada a base de ágar sangue. Bienek e Belosevic (1997) demonstraram que a adição de soro de peixes pode aumentar significativamente o crescimento *in vitro* de *T. danilewskyi* quando comparado à adição de soro de mamíferos, enquanto Overath et al. (1998) verificaram que a manutenção de *Trypanosoma carassii* (Mitrophanow, 1883) não é possível sem a suplementação com soro de peixes de água doce.

O desenvolvimento dos tripanossomas de peixes em cultivo é característico, iniciando-se com uma fase de crescimento exponencial (fase logarítmica) em que ocorre predominância das formas epimastigotas (CRUZ, 1995; LEMOS et al., 2015). A seguir observa-se uma fase estacionária na reprodução desses parasitos, em que podem ser visualizados tripomastigotas e esferomastigotas (LEMOS et al., 2015), chegando a uma fase de declínio, com diminuição crítica do número de parasitos (CRUZ, 1995). A observação de aglomerados dos parasitos formando rosetas é relatada na literatura, sendo indicada como característica da fase de crescimento exponencial (DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995).

A morfologia e morfometria dos tripanossomas isolados em cultura podem diferir daquelas observadas no hospedeiro vertebrado (DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995; LEMOS, 2012; LEMOS et al., 2015). Nesse contexto, foi demonstrado que as formas de *T. granulorum* isoladas e mantidas em cultura tendem a ser menores e mais largas do que aquelas observadas no sangue de enguias (DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995). Contudo, para *T. carassii*, as formas em cultura mostraram-se indistinguíveis das formas observadas no hospedeiro vertebrado ressaltando três critérios: a morfologia dos tripomastigotas, compartilhamento de epítipo de superfície para anticorpo monoclonal e superfície celular envolta por um glicocálice rico em carboidrato (OVERATH et al., 1998). Lemos (2012), estudando *T. abeli* isolado de cascudos provenientes de Minas Gerais, relatou diferença morfológica entre os tripomastigotas observados nos primeiros dias do isolamento *in vitro* das formas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado e também o pleomorfismo das formas tripomastigotas e epimastigotas nas passagens em cultivos subsequentes. As rosetas, quando observadas, têm a parte posterior do corpo no centro com o flagelo projetando-se para fora (CRUZ, 1995; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014).

No Brasil, Botelho (1907) e Horta e Machado (1911) tentaram, sem sucesso, isolar e manter os tripanossomas de peixes utilizando, respectivamente, os meios ágar sangue, para *Trypanosoma rhamdiae* Botelho, 1907, e Novy e MacNeal, para *T. chagasi*. Em 2014, Lemos e Souto-Padrón testaram diversos meios de cultura e realizaram o primeiro isolamento destes parasitos no país a partir do sangue de cascudos *H. affinis* e *H.luetkeni*. Assim, até o momento apenas uma espécie de tripanossoma de peixe, *T. abeli*, foi isolada no país (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015).

### **1.3.3 *Biologia Molecular***

As técnicas moleculares podem ser empregadas tanto para o diagnóstico quanto para fornecer informações que auxiliem na identificação de espécies dos tripanossomas (DAVIES et al., 2005; GU et al., 2010; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015). Estas ferramentas, embora muitas vezes classificadas como altamente sensíveis, podem apresentar limitações decorrentes de baixas parasitemias, do número reduzido de cópias do gene alvo e pelo protocolo de PCR adotado (BERN et al., 2011; QVARNSTROM et al., 2012). Dentre os estudos moleculares realizados sobre os tripanossomas de peixes, aqueles que utilizam sequências do gene 18S rDNA são os mais frequentes (MASLOV et al., 1996; DAVIES et al., 2005; GIBSON et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; LEMOS et al., 2015), o que pode ser devido ao enfoque filogenético da maior parte desses trabalhos.

Os estudos de filogenia molecular visam demonstrar a história evolutiva dos táxons através da comparação de sequências de DNA, ou de proteínas, dos organismos (PATWARDHAN, RAY e ROY, 2014). Neste sentido, é preciso observar que enquanto alguns genes são considerados importantes biomarcadores para estudos filogenéticos de tripanossomas, como aqueles do DNA ribossômico (rDNA) e do GAPDH, outros são menos propícios para essa finalidade por apresentarem, por exemplo, múltiplas cópias que podem exibir ambiguidades, dificultando a obtenção de árvores robustas (PHILIPPE et al., 2011; CAPELLA-GUTIERREZ, RAUFF e GABALDÓN, 2014; PATWARDHAN, RAY e ROY, 2014; FERMINO et al., 2015).

O rDNA dos eucariotos é formado por sequências codificadoras conservadas separadas entre si por sequências intercalares não-codificantes, que são variáveis intra e interpopulacionalmente (HILLIS e DIXON, 1991; MATEUS et al., 2006). As regiões conservadas são unidades repetitivas que codificam para os RNAs 18S, 5.8S e 28S (LSU rRNA) (HILLIS e DIXON, 1991; MATEUS et al., 2006) e são muito utilizadas em estudos filogenéticos por estarem presentes em todos os organismos vivos, pelo seu tamanho e por possuírem diferentes taxas de variabilidade (HILLIS e DIXON, 1991; OLSEN e WOESE, 1993). Nesse sentido, o uso do gene 18S rDNA

pode permitir não só a separação de grupos filogeneticamente distantes, devido a sua baixa taxa de variabilidade (HILLIS e DIXON, 1991; OLSEN e WOESE, 1993), como também pode proporcionar a diferenciação em nível específico, quando são consideradas suas regiões hipervariáveis (LEMOS et al., 2015).

Assim, a escolha do gene 18S rDNA como fragmento alvo de amplificação permite, além do diagnóstico, a realização de estudos que visem a identificação de espécies de tripanossomas de peixes através da taxonomia molecular (DAVIES et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015). Atualmente no Brasil, o único estudo sobre tripanossomas de peixes envolvendo ferramentas moleculares foi realizado para a identificação da nova espécie *T. abeli* (LEMOS et al., 2015), demonstrando a carência de investigações com este enfoque.

## 2 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui a maior diversidade de peixes em águas continentais do mundo (IBAMA, 2008). Estima-se que existam no país aproximadamente 5000 espécies, sendo que somente cerca de metade delas são conhecidas e registradas (ROSA e LIMA, 2005; IBAMA, 2008). Entretanto, pouco se conhece sobre os tripanossomas que parasitam estes animais.

Até o momento, a maior parte dos estudos realizados sobre os tripanossomas de peixes no Brasil tiveram como objetivo principal a identificação das espécies por meio de descrições morfológicas e/ou o simples registro de ocorrência desses parasitos (HORTA, 1910; SPLENDORE, 1910; FONSECA e VAZ, 1928a, 1928b, 1929; FONSECA, 1935; FRÓES et al., 1978, 1979; EIRAS, REGO e PAVANELLI, 1989, 1990; PÁDUA et al., 2011; LEMOS et al., 2015). Cabe ressaltar que, dos 27 estados brasileiros, somente 10 foram investigados quanto à ocorrência de tripanossomas em peixes (MARTINS et al., 2015), evidenciando, novamente, a carência de dados em relação a estes parasitos frente a extensa pesquisa sobre os tripanossomas de mamíferos e a diversidade de peixes existente em nosso país.

Embora o pleomorfismo e a falta de especificidade desses parasitos já fossem conhecidos e divulgados, muitos trabalhos de identificação das espécies brasileiras das décadas de 80 e 90 ainda utilizaram a morfometria como o parâmetro principal para a sua identificação (NUTI-SOBRINHO et al., 1987; LOPES et al., 1989, 1990a, 1990b, 1991a, 1992a, 1992b, 1992c, 1993a, 1993b; RIBEIRO et al., 1989, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b, 1993a, 1993b; SATAKE et al., 1992). Assim, a validade das espécies descritas para o Brasil permanece uma questão controversa (EIRAS et al., 2012).

Desde a década de 90, os estudos moleculares dos tripanossomas de peixes vêm aumentando e sendo considerados promissores para a solução dos problemas taxonômicos encontrados neste grupo, com ampla utilização do gene 18S rRNA (MASLOV et al., 1996; DAVIES et al., 2005; GIBSON et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; LEMOS et al., 2015). Entretanto, a PCR a partir do sangue total pode gerar haplótipos devido a infecções mistas, ressaltando-se, assim, a importância da obtenção de clones isolados em cultura para a caracterização

molecular (GRYBCHUK-IEREMENKO et al., 2014; LEMOS et al., 2015). No entanto, no Brasil, até o presente momento, somente um estudo envolvendo estas ferramentas foi realizado, resultando na identificação de uma única espécie de tripanossoma em cascudos (LEMOS et al., 2015).

Além disso, estudos que investiguem o potencial patogênico destes parasitos (DYKOVÁ e LOM, 1979; KHAN, 1985; ISLAM e WOO, 1991a, 1991b) ou a sua relação com o sistema imunológico dos peixes (JOERINK et al., 2006; OLADIRAN e BELOSEVIC, 2009, 2010, 2012), embora realizados desde a década de 70 na América do Norte e na Europa, ainda são raros no Brasil (FUJIMOTO et al., 2013; LEMOS et al., 2015). Neste sentido, é importante a produção de isolados em cultura, não só para a identificação dos parasitos, mas também para possibilitar a realização de infecções experimentais que permitam avaliar estes aspectos em condições controladas e sem a interferência de infecções mistas, que são frequentemente encontradas na natureza.

Considerando todo o exposto acima, torna-se indiscutível a existência de várias lacunas no conhecimento dos tripanossomas de peixes do Brasil, tornando necessárias novas pesquisas que visem contribuir para o conhecimento das espécies que realmente circulam no país, unindo as técnicas clássicas de morfologia e morfometria com a obtenção de isolados em cultivo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo investigar a ocorrência de protozoários do gênero *Trypanosoma* em peixes (Osteichthyes) de água doce provenientes de dois afluentes da bacia do rio Paraíba do Sul no estado de Minas Gerais, Brasil, realizando sua caracterização morfológica e seu isolamento *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência da infecção utilizando o exame microscópico de esfregaços sanguíneos, o isolamento *in vitro* e a amplificação do gene 18S rRNA;
- Determinar a carga parasitária nos peixes infectados por meio da análise de esfregaços sanguíneos;
- Caracterizar morfológica e morfometricamente os tripanossomas observados no sangue, comparando os dados obtidos com as descrições de espécies presentes na literatura;
- Estabelecer um protocolo eficiente para a manutenção *in vitro* dos tripanossomas a partir dos isolados coletados em campo;
- Caracterizar morfológicamente as formas evolutivas observadas *in vitro*;
- Analisar aspectos biológicos dos parasitos isolados e mantidos *in vitro*, tais como metabolismo e eventos/sequência de multiplicação.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta dos Hospedeiros e Obtenção dos Tripanossomas

Os peixes foram capturados nos meses de fevereiro, março e abril, com auxílio de tarrafa, em dois locais da bacia do rio Paraíba do Sul: rio Xopotó, afluente do rio Pomba, localizado próximo à cidade de Guioval (21°13'40" S, 42°48'00" O) e no ribeirão Forquilha, afluente do rio Cágado, próximo à cidade de Guarará (21°45'16.8" S, 43°00'48.5" O), no estado de Minas Gerais. Os animais foram submetidos a banhos anestésicos contendo solução alcoólica de óleo de cravo (Eugenol) 50 mg/L (INOUE e MORAES, 2007) e, então, inspecionados para a presença de sanguessugas, pesados e medidos quanto ao comprimento total do corpo. Em seguida, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; DAVIES et al., 2005) com seringa e agulha de calibres variáveis, de acordo com o tamanho do hospedeiro.

O sangue coletado foi imediatamente utilizado para: 1) confecção de esfregaços sanguíneos; 2) inoculação em distintos meios de cultivo; e 3) obtenção de DNA para os estudos moleculares. As amostras utilizadas na obtenção de DNA foram acondicionadas em tubos contendo K<sub>2</sub>EDTA (BD) e congeladas a -20 °C até o uso.

Após a obtenção do sangue, todos os peixes foram eutanasiados, por excesso de anestésico, e fixados em etanol 70% para identificação e inclusão na Coleção de Ictiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob responsabilidade do Dr. José Carlos de Oliveira (números de registro: UFJF 3258, UFJF 3259, UFJF 3151, UFJF 3152). As coletas foram efetuadas com autorização do IBAMA/SISBIO (Instituto dos Recursos Naturais e Renováveis e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), número 17730-1, e a manipulação dos animais foi realizada segundo a metodologia aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, autorização número 046/2013.

## 4.2 Técnicas Parasitológicas para o Diagnóstico dos Tripanossomas

As técnicas parasitológicas utilizadas para o diagnóstico da infecção foram esfregaços sanguíneos, isolamento em cultivo e amplificação do gene 18S rRNA. A prevalência foi expressa em porcentagem e calculada de acordo com Bush et al. (1997), sendo determinada pelo número de hospedeiros infectados por tripanossomas dividido pelo número de hospedeiros amostrados.

A parasitemia, definida como o número de tripanossomas encontrados em um único hospedeiro (BUSH et al., 1997), e a parasitemia média, definida como o número total de tripanossomas encontrados nos hospedeiros dividido pelo número de hospedeiros infectados (BUSH et al., 1997), foram obtidas pela análise do esfregaço sanguíneo.

### 4.2.1 Esfregaços Sanguíneos

Uma gota de sangue, aproximadamente 9  $\mu\text{L}$ , de cada hospedeiro foi utilizada na confecção de esfregaços sanguíneos finos, com cerca de 12  $\text{cm}^2$  de área. Os esfregaços foram secados ao ar, fixados em Metanol por 3 min. e corados com Giemsa 10% por 30 min.

O diagnóstico da infecção foi realizado concomitantemente com o registro do número de parasitos encontrados, que foram utilizados para o cálculo da parasitemia. Para isso, foi realizada a análise randômica de 250 campos (1  $\text{cm}^2$ ) de cada lâmina em microscópio óptico de campo claro (x100 Objetiva).

O número total de parasitos visualizados foi contabilizado e o cálculo da parasitemia foi estimado em parasitos/mL da seguinte forma:

$$\begin{array}{l|l} 12 \text{ cm}^2 \text{ ----- } 9 \mu\text{L} & \text{n}^\circ \text{ de parasitos encontrados ---- } 0,75 \mu\text{L} \\ 1 \text{ cm}^2 \text{ ----- } 0,75 \mu\text{L} & \text{x ---- } 1000 \mu\text{L} \end{array}$$

#### 4.2.2 *Cultura In Vitro*

Para a tentativa de isolar os tripanossomas foram utilizados meios bifásicos preparados em tubos de vidro (JONES e WOO, 1991b; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). A fase sólida foi composta por Meio Modificado de Ponselle (PO), Meio Modificado de Ponselle acrescido de 8 g/L de NaCl (PO.8) ou Base Ágar Sangue (BAB) e a fase líquida por Meio Basal de Eagle (BME) (JONES e WOO, 1991b; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014).

Os meios bifásicos foram preparados cerca de 24 horas antes do momento da coleta e mantidos a 25 °C. Aproximadamente 1 mL da fase sólida foi depositado em cada tubo de vidro, sendo recobertos por 300 µL de meio líquido (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Após a inoculação de cinco gotas do sangue do hospedeiro, todas as hemoculturas foram mantidas em estufa B.O.D. a 25 °C e analisadas diariamente, por exame direto, para a detecção dos tripanossomas. Aproximadamente 4 µL da fase líquida foram utilizados para a análise, por exame direto, em microscópio óptico (x40 Objetiva) com contraste de fase 2.

O isolamento em cultivo foi determinado pela presença das formas tripomastigotas, enquanto a manutenção foi caracterizada pelo surgimento das formas epimastigotas (LEMOS, 2012).

##### 4.2.2.1 Meios de fase sólida

**Meio Modificado de Ponselle:** O preparo deste meio sólido seguiu as recomendações do fabricante, dissolvendo-se 20 g de Agar Bacteriológico em 1 L de água deionizada. A mistura foi, então, autoclavada e em cada tubo foram acrescentadas duas partes de ágar para uma parte de sangue desfibrinado de carneiro estéril inativado por calor (JONES e WOO, 1991b). Após o preparo, os tubos foram mantidos 24 horas em temperatura ambiente para verificação de esterilidade e armazenados a 4 °C até o uso.

**Meio Modificado de Ponselle com acréscimo de 8 g de NaCl:** O preparo deste meio foi realizado dissolvendo-se 20 g de Agar Bacteriológico e 8 g de NaCl em 1 L de água deionizada. A mistura foi autoclavada e em cada tubo foram acrescentadas duas partes de ágar para uma parte de sangue desfibrinado de carneiro estéril inativado por calor (JONES e WOO, 1991b). Após o preparo, os tubos foram mantidos 24 horas em temperatura ambiente para verificação de esterilidade e armazenados a 4 °C até o uso.

**Base Agar Sangue:** O preparo desta fase sólida consistiu em 40 g de Base Ágar Sangue dissolvido em 1 L de água deionizada. A mistura foi autoclavada e em cada tubo foram acrescentadas três partes de ágar para uma parte de sangue desfibrinado de carneiro estéril inativado por calor (JONES e WOO, 1991b). Após o preparo, os tubos foram mantidos 24 horas em temperatura ambiente para verificação de esterilidade e armazenados a 4 °C até o uso.

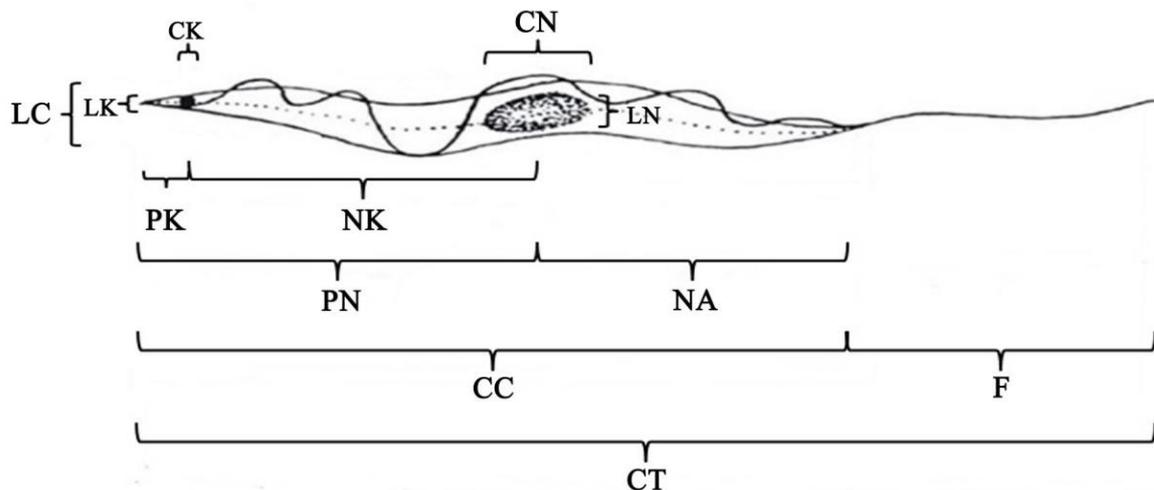
#### 4.2.2.2 Meio de fase líquida

**Meio Basal de Eagle:** A fase líquida foi preparada de acordo com Jones e Woo (1991b) contendo Meio Basal de Eagle diluído 50% (v/v) em água deionizada, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado por calor (56 °C por 30 min.), 20 µg/mL de Hemina, 100 U/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina, 0,25 µg/mL de antimicótico e tamponado com 25 mM de HEPES (pH 7.2). A fase líquida foi preparada, filtrada e mantida a 37 °C por 24 horas para verificação de esterilidade. Após este período, foi acondicionada a 4 °C até o uso.

### 4.3 Caracterização dos Tripomastigotas Sanguíneos

Os tripomastigotas sanguíneos encontrados nos esfregaços foram fotografados utilizando microscópio de luz Olympus BX53 equipado com câmera digital DP73 e analisados pelo programa cellSens Dimension®.

Os parasitos foram agrupados de acordo com sua morfologia, de maneira independente de localidade ou hospedeiro, e 20 indivíduos de cada grupo foram utilizados na morfometria, sendo aferidos os seguintes parâmetros: comprimento total do corpo, incluindo o flagelo livre (CT); comprimento do corpo, excluindo o flagelo livre (CC); comprimento do núcleo (CN); comprimento do cinetoplasto (CK); comprimento do flagelo livre (F); largura do corpo (LC) e largura do núcleo (LN), medidas no centro do núcleo; largura do cinetoplasto (LK); distância da extremidade posterior ao centro do cinetoplasto (PK); distância da extremidade posterior ao centro do núcleo (PN); distância do centro do cinetoplasto ao centro do núcleo (NK) e distância da extremidade anterior ao centro do núcleo (NA) (Fig. 4).



**Figura 4** Parâmetros biométricos utilizados na caracterização morfométrica dos tripanossomas de peixes. Adaptada de Bara (1984, p. 34).

O índice nuclear ( $IN = PN/NA$ ), que expressa a posição do núcleo na célula, e o índice do cinetoplasto ( $IK = PN/NK$ ), que indica a posição do cinetoplasto, foram calculados e podem ser interpretados da seguinte maneira, de acordo com Cruz (1995):

- ✓  $IN = 1$ : o núcleo está situado no centro da célula;
- ✓  $IN > 1$ : o núcleo se situa em posição anterior, relativamente ao centro da célula;
- ✓  $IN < 1$ : o núcleo se situa em posição posterior, relativamente ao centro da célula;
- ✓  $IK = 1$ : o cinetoplasto se localiza na extremidade posterior;
- ✓  $IK = 2$ : o cinetoplasto se a meia distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo;
- ✓  $IK < 2$ : o cinetoplasto se localiza mais próximo da extremidade posterior que do núcleo;
- ✓  $IK > 2$ : o cinetoplasto se localiza mais próximo do núcleo que da extremidade posterior.

#### **4.4 Manutenção dos Tripanossomas Isolados em Cultura**

Após a inoculação do sangue, todas as hemoculturas foram mantidas em estufa B.O.D. a 25 °C e analisadas diariamente para a presença de tripanossomas, conforme descrito anteriormente. Após a observação das primeiras formas epimastigotas em cultura, foram adicionados 200 µL de fase líquida e, aproximadamente 24 horas após a adição, os parasitos foram transferidos para novos tubos contendo a mesma fase líquida e a mesma fase sólida em que se multiplicaram. Para isso, a fase líquida foi totalmente aspirada, centrifugada a 3.000 x g por 4 min. (LEMOS, 2012) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento contendo os parasitos foi ressuspenso em 50 µL de fase líquida e transferido para um novo tubo contendo a fase sólida e 450 µL de fase líquida.

A passagem dos isolados para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> foi realizada quando a contagem dos parasitos livres em câmara de Neubauer foi de, no mínimo, 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL. As garrafas foram preparadas com 5 mL de fase sólida e 3 mL de fase líquida.

Para a determinação da curva de crescimento foram escolhidos dois cultivos representativos, sendo um de cada localidade. A curva foi iniciada com um inóculo de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL e os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer por um período de 15 dias consecutivos. Os experimentos foram realizados em triplicata em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

Para a criopreservação,  $1 \times 10^7$  parasitos/mL foram recolhidos da cultura e centrifugados a 3000 x g por 4 min., sendo o sobrenadante descartado. Os tripanossomas foram ressuspensos em solução contendo 90% de Soro Fetal Bovino e 10% de DMSO (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014) e, então, congelados a -80 °C por 24 h e estocados em nitrogênio líquido. A verificação de viabilidade celular foi realizada por observação da motilidade do flagelo e manutenção da capacidade de multiplicação *in vitro* mais de 180 dias após a criopreservação.

#### **4.5 Caracterização dos Tripanossomas Mantidos em Cultura**

Para a caracterização das formas evolutivas observadas nas culturas, os meios foram levemente homogeneizados, sendo cerca de 10 µL da fase líquida recolhida e levemente espalhada com a ponteira em uma lâmina de vidro. Os esfregaços foram secados ao ar e corados em Giemsa (3 gotas do corante a cada 1 mL de água tamponada) por 30 min.

A análise foi realizada em microscópio de luz de campo claro (x100 Objetiva) e as imagens foram registradas em microscópio de luz Olympus BX53 equipado com câmera digital DP73.

## 4.6 Técnicas Moleculares de Diagnóstico e Identificação dos Tripanossomas

A amplificação do gene 18S rRNA por PCR à partir do sangue total foi utilizada para o diagnóstico da infecção, além das técnicas parasitológicas descritas anteriormente. A PCR do mesmo gene foi realizada para os parasitos isolados em cultura.

### 4.6.1 Obtenção do DNA

O DNA dos parasitos, tanto do sangue total quanto das culturas, foi extraído utilizando o *kit* Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

A extração a partir do sangue total foi adaptada do protocolo fornecido pelo fabricante. Aproximadamente 100 µL de cada amostra de sangue total, armazenadas a -20 °C, foram adicionadas a tubos de microcentrífuga com 300 µL de solução de lise celular, agitados vigorosamente (com auxílio de agitador de tubos tipo Vortex) e incubados por 15 min. a 25°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 1 min. e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido duas vezes com acréscimo da mesma quantidade de solução de lise celular. O sedimento foi agitado vigorosamente e 100 µL de solução de lise nucleica foram adicionados e os tubos submetidos à nova agitação e centrifugação a 13000 x g por 1 min. Cerca de 3 µL de solução de RNase foram adicionados, misturados por inversão e os tubos foram incubados a 37 °C por 15 min. Após este tempo, os tubos foram deixados por 5 min. a temperatura ambiente e depois centrifugados a 13000 x g por 1 min. precedentes à adição de 33 µL da solução de precipitação de proteína. Seguiu-se uma agitação vigorosa e a centrifugação a 13000 x g por 3 min. Os sobrenadantes foram transferidos cuidadosamente para novos tubos contendo 100 µL de isopropanol em temperatura ambiente e misturados gentilmente por agitação até que o DNA fosse visível. Então, os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 1 min., sendo o sobrenadante descartado a seguir. Então, 100 µL de etanol 70% em

temperatura ambiente foram adicionados e misturados por inversão para lavar o DNA. Após um novo processo de centrifugação a 13000 x g por 1 min., o etanol foi descartado e os tubos foram deixados invertidos por 15 min. para que o sedimento fosse secado ao ar. Ao final, 50 µL de solução de reidratação de DNA foram adicionados, misturados e os tubos foram incubados por 1 hora a 65 °C. O DNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

Para a extração do DNA dos parasitos provenientes do cultivo,  $1 \times 10^7$  parasitos/mL foram coletados e lavados duas vezes com 300 µL de PBS estéril. Após este processo, os parasitos foram ressuspensos em 300 µL de PBS estéril e armazenados a -20 °C até o uso (SILVA, 2009) ou foram imediatamente submetidos à extração de DNA seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.6.2 Reação em Cadeia Polimerase**

Para amplificação do gene 18S rRNA foram utilizados os iniciadores S-762 (GACTTTTGCTTCCTCTA(AT)TG) e S-763 (CATATGCTTGTTTCAAGGAC) (MASLOV et al., 1996) que podem amplificar fragmentos com cerca de 1400 a 2200 pb. A mistura de reação enzimática foi preparada em um volume final de 25 µL contendo: 10 ng de DNA genômico, 1,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 25 U/mL de *Taq* DNA polimerase em tampão (pH 8,5). A reação de amplificação foi realizada nas condições previamente padronizadas em nosso laboratório: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min., 35 ciclos de 95 °C por 2 min., 55 °C por 30 seg., 68 °C por 2 min. e extensão final a 68 °C por 10 min.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Aproximadamente 8 µL da mistura, contendo 5 µL dos produtos amplificados e 3 µL do tampão de carregamento Blue Orange Loading Dye (Promega), foram aplicados em cada poço. Foram utilizados 2 µL de marcador de peso molecular GelPilot® 1kb Plus Ladder (Qiagen). Os fragmentos foram revelados por técnica de impregnação por nitrato de prata e fotografados com câmera manual.

#### 4.7 Testes Estatísticos

Os dados epidemiológicos quantitativos, peso e tamanho dos hospedeiros e parasitemia, foram submetidos à estatística descritiva para a verificação do padrão de distribuição e cálculo da parasitemia média. Considerando que o número de amostras em cada grupo foi inferior a 50, o teste de normalidade adotado foi Shapiro-Wilk. Os parâmetros que contrariaram a distribuição normal foram logaritmizados em base 10 (Log10) para nova verificação da normalidade. Para analisar se os dados respeitavam a hipótese de homogeneidade, foi empregado o teste de Levene. O teste U de Mann-Whitney foi realizado para avaliar se as parasitemias médias registradas para cada espécie de peixe coletada diferiram significativamente ao nível de 5%. A correlação de Pearson, com nível de significância de 5%, foi utilizada para avaliar a inter-relação entre a parasitemia e o tamanho e peso dos hospedeiros, sem levar em consideração a qual espécie eles pertenciam.

Os dados morfométricos foram submetidos à estatística descritiva, para o cálculo da média, do desvio padrão e construção de gráficos de caixa (*boxplot*) a partir da mediana, e também ao teste de Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ) para verificação do padrão de distribuição. Após esta etapa, os parâmetros que contrariaram a hipótese de normalidade foram transformados em Log10 e novamente testados quanto à distribuição. Além disso, a homogeneidade de variância foi verificada pelo teste de Levene para todos os parâmetros com padrão de distribuição normal.

Desta forma, a variância dos dados classificados como normais e homogêneos foi analisada pelo teste ANOVA de uma via e a análise dos dados normais e não homogêneos foi realizada pelo teste de igualdade de médias. Os pós-testes utilizados foram Tukey, para os parâmetros com número de amostras iguais, e GT2 de Hochberg, para os parâmetros com número de amostras diferentes. O nível de significância considerado foi de 5%. Além disso, o teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% também foi empregado na análise de variância dos dados com distribuição não paramétrica e o teste U de Mann-Whitney foi utilizado como pós-teste, com nível de significância ajustado para 1%. A correlação entre as variáveis foi verificada pelos testes de correlação de Pearson e Spearman, com

níveis de significância de 5% e 1%. A Análise de Componentes Principais (do inglês *Principal Components Analysis*, ou PCA) foi realizada para avaliar a contribuição dos parâmetros no agrupamento dos morfotipos. Além disso, o critério de informação de Akaike (AICc) foi utilizado para investigar quais parâmetros morfométricos poderiam contribuir para diferenciação entre os morfotipos como um modelo mais parcimonioso. Para isso, os dados foram logaritmizados em base 10 e o critério  $\Delta AICc < 2$  foi adotado para separar os modelos mais prováveis. Um resumo dos testes empregados para cada parâmetro encontra-se apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** Testes estatísticos aplicados na análise dos morfotipos.

Parâmetros*	Teste de Variância	Pós-teste	Correlação	Multivariada	Bayesiana
CT	ANOVA	GT2 de Hochberg	-	-	-
CC	ANOVA	Tukey	Pearson	PCA	-
CN	Igualdade de Médias	Tukey	Pearson	PCA	AICc
CK	Igualdade de Médias	Tukey	Pearson	PCA	AICc
F	Igualdade de Médias	GT2 de Hochberg	-	-	-
LC	Igualdade de Médias	Tukey	Pearson	PCA	AICc
LN	Igualdade de Médias	Tukey	Pearson	PCA	AICc
LK	Kruskal-Wallis	U de Mann-Whitney	Spearman	PCA	AICc
PK_Log10	Igualdade de Médias	Tukey	Pearson	-	-
PN	ANOVA	Tukey	Pearson	PCA	AICc
NK	ANOVA	Tukey	Pearson	PCA	-
NA	ANOVA	Tukey	Pearson	PCA	AICc

\* CT = comprimento total do corpo, incluindo o flagelo livre; CC = comprimento do corpo; CN = comprimento do núcleo; CK = comprimento do cinetoplasto; F = comprimento do flagelo livre; LC = largura do corpo; LN = largura do núcleo; LK = largura do cinetoplasto; PK\_Log10 = distância entre a extremidade posterior e o centro do cinetoplasto transformada em logaritmo de base 10; PN = distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo; NK = distância entre o centro do cinetoplasto e o centro do núcleo; NA = distância entre a extremidade anterior e o centro do núcleo.  
-O símbolo indica que o teste em questão não foi aplicado para o parâmetro relacionado.

As análises foram realizadas com auxílio dos *softwares* IBM SPSS® *Statistics* versão 21, R versão 3.2.2 e *Spatial Analysis in Macroecology - SAM* - versão 4.0 (RANGEL et al., 2010).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Infecção por Tripanossomas em Peixes da Bacia do Paraíba do Sul

No rio Xopotó foram coletados 13 cascudos, sendo identificados como *Hypotomus affinis* (n = 1) ou *Hypostomus luetkeni* (n = 12), e no ribeirão Forquilha foram amostrados nove cascudos, também identificados como *H. affinis* (n = 8) ou *H. luetkeni* (n = 1). Portanto, dos 22 cascudos utilizados no estudo, nove (41%) foram da espécie *H. affinis* e 13 (59%) da espécie *H. luetkeni* (Tabela 3).

A infecção por protozoários do gênero *Trypanosoma* foi observada em 12 (54,6%) hospedeiros quando considerado o exame de esfregaços sanguíneos, em 18 (81,8%) quando considerados os resultados obtidos a partir da cultura, e em 13 (59,1%) quando consideradas as amplificações do gene do 18S rRNA (Tabela 3).

Analisando-se a Tabela 3 é possível observar que um dos cascudos positivos pelo exame microscópico de esfregaço sanguíneo não teve a infecção detectada por meio da cultura ou PCR. Da mesma forma, a PCR possibilitou a detecção da infecção em um hospedeiro que não havia sido positivamente diagnosticado pela cultura ou pelo esfregaço. Assim, quando combinadas, as técnicas utilizadas permitiram a detecção da infecção em 90,9% dos hospedeiros (n = 20). Quando observadas separadamente, as espécies dos hospedeiros apresentaram uma prevalência da infecção de 100% em *H. affinis* e de 84,6% em *H. luetkeni*.

Apesar da presença de sanguessugas ter sido observada nas águas do rio Xopotó, nenhuma foi encontrada aderida aos peixes amostrados. Por esta razão, elas não foram utilizadas no estudo.

**Tabela 3** Positividade da infecção por tripanossomas em cascudos da bacia do rio Paraíba do Sul em Minas Gerais, Brasil, considerando-se a análise de esfregaço sanguíneo, exame direto de culturas *in vitro* e reação em cadeia polimerase (PCR) do gene 18S rDNA.

Identificação	Hospedeiro	Afluente	Esfregaço Sanguíneo	Isolamento em Cultura	PCR 18S rDNA
01-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	-	-	-
02-X	<i>Hypostomus affinis</i>	Xopotó	+	+	-
03-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	+
04-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	-
05-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	+
06-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	-	-	+
07-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	-
08-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	-	-
09-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	-
10-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	-	+	-
11-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	+
12-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	-	+	+
13-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	+	+	+
01-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	-	+	+
02-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	+	+	-
03-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	-	+	+
04-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	-	+	+
05-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	+	+	+
06-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	+	+	+
07-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	-	+	+
08-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	-	+	+
09-F	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Forquilha	-	-	-

- = resultado negativo

+ = resultado positivo

Interessantemente, apesar dos cascudos da espécie *H. affinis* terem concentrado a maior prevalência de infecção (100% versus 84,6% em *H. luetkeni*), a parasitemia média observada nesses animais foi inferior à observada em cascudos da espécie *H. luetkeni* ( $2,3 \times 10^3$  parasitos/mL versus  $6,3 \times 10^3$  parasitos/mL, respectivamente). Entretanto, a diferença observada não foi significativa ( $p > 0,05$ ; U de Mann-Whitney). Observou-se, ainda, correlação negativa entre as altas parasitemias e o tamanho dos hospedeiros ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,635$ ) e seu peso ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,629$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** Dados epidemiológicos da infecção por tripanossomas em peixes cascudos coletados na bacia do rio Paraíba do Sul em Minas Gerais, Brasil.

Identificação	Hospedeiro	Afluente	Peso (g)	Comprimento Total (mm)	Parasitemia (parasitos/mL)
01-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	154	240	-
02-X	<i>Hypostomus affinis</i>	Xopotó	135	240	1,33 x 10 <sup>3</sup>
03-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	74	185	2,67 x 10 <sup>3</sup>
04-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	77	192	5,33 x 10 <sup>3</sup>
05-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	69	180	2,67 x 10 <sup>3</sup>
06-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	53	175	-
07-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	46	163	5,33 x 10 <sup>3</sup>
08-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	38	150	10,67 x 10 <sup>3</sup>
09-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	33	145	1,33 x 10 <sup>3</sup>
10-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	43	155	-
11-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	37	145	8,00 x 10 <sup>3</sup>
12-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	34	143	-
13-X	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Xopotó	34	145	14,67 x 10 <sup>3</sup>
01-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	208	280	-
02-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	168	275	1,33 x 10 <sup>3</sup>
03-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	128	245	-
04-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	61	190	-
05-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	59	210	5,33 x 10 <sup>3</sup>
06-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	70	215	1,33 x 10 <sup>3</sup>
07-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	106	245	-
08-F	<i>Hypostomus affinis</i>	Forquilha	65	210	-
09-F	<i>Hypostomus luetkeni</i>	Forquilha	311	320	-

- = amostra negativa na análise do esfregaço.

## 5.2 Caracterização Morfológica e Morfométrica dos Tripanossomas

Foram fotografados 443 tripomastigotas sanguíneos no total, sendo 370 provenientes dos esfregaços de cascudos do rio Xopotó e 73 de esfregaços de cascudos do ribeirão Forquilha. Para a determinação dos morfotipos, foram considerados somente agrupamentos morfológicos com, pelo menos, 20 indivíduos. Desta forma, foram determinados quatro morfotipos a partir das análises morfométricas (Tabela 5). É interessante notar que, embora a localidade não tenha

sido levada em consideração para o agrupamento dos tripomastigotas, os morfotipos 1, 2 e 3 foram registrados somente nos peixes coletados no rio Xopotó, enquanto o morfotipo 4 foi registrado somente nos peixes do ribeirão Forquilha. Para fins de descrição, foram considerados “largos” os tripanossomas com largura média do corpo superior a 3  $\mu\text{m}$  e “longos” aqueles com comprimento do corpo superior a 45  $\mu\text{m}$ . A seguir, encontra-se a caracterização morfológica destes parasitos.

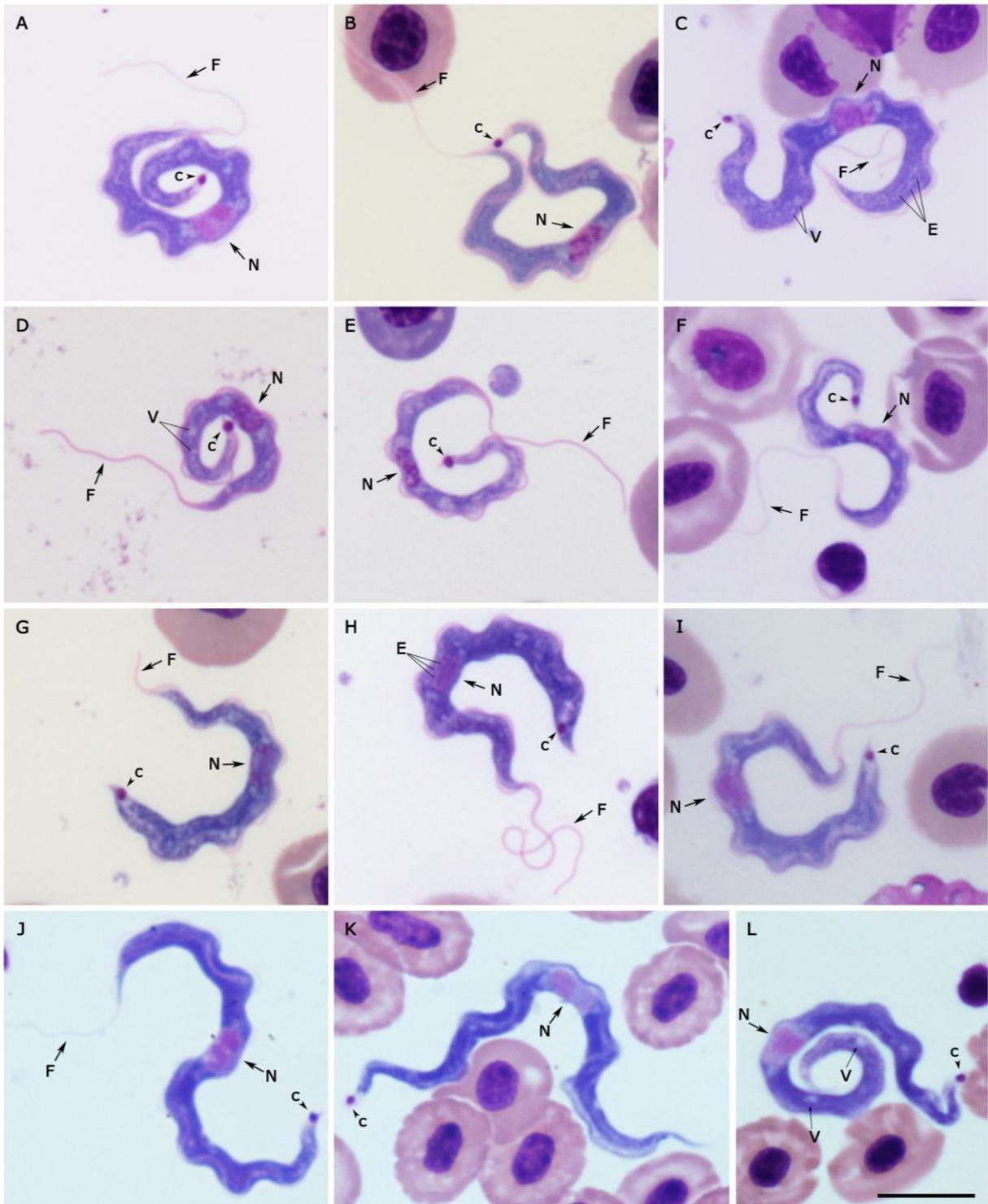
**Morfotipo 1** (Fig. 5 A - C, Fig. 6): possui corpo delgado e longo com as duas extremidades afiladas, principalmente a anterior em direção ao flagelo. O formato do corpo pode ser espiral (Fig. 5 A) ou flexionado em “C” (Fig. 5 B) ou “S” (Fig. 5 C). O citoplasma é finamente granular com a presença de vacúolos (Fig. 5 B, C, Fig. 6) e é intensamente corado. Alguns parasitos podem apresentar estrias na região anterior do corpo, que são mais nítidas quando observadas ao microscópio e por isso estão representadas em desenhos esquemáticos (Fig. 5 C, Fig. 6). A região entre o cinetoplasto e a extremidade posterior é sempre fracamente corada, ocasionalmente com uma discreta extensão delgada. O flagelo livre é geralmente longo e seu batimento causa ondulações conspícuas da membrana celular. O núcleo tem formato oval, apresenta alta afinidade pelo corante, com pontos de cromatina evidenciados em grande parte dos indivíduos (Fig. 6), e localiza-se próximo ao centro do corpo, estando levemente deslocado em direção à região anterior na maior parte dos parasitos observados ( $IN = 1,11 \pm 0,13$ ). O cinetoplasto geralmente tem formato oval, podendo ser ocasionalmente visto em formato circular, e localiza-se muito próximo à extremidade posterior na maioria dos indivíduos observados ( $IK = 1,03 \pm 0,01$ ).

**Morfotipo 2** (Fig. 5 D - F, Fig. 7): possui corpo delgado e curto com a extremidade anterior levemente afilada em direção ao flagelo. Assim como o morfotipo 1, o formato do corpo pode ser espiral (Fig. 5 D) ou flexionado em “C” (Fig. 5 E) ou “S” (Fig. 5 F). O citoplasma é fortemente corado com pequenos vacúolos (Fig. 5 D, Fig. 7) e grânulos discretos. A região entre o cinetoplasto e a extremidade posterior é geralmente muito evidente devido à afinidade com o corante, sempre com uma extensão corporal após o cinetoplasto em formato triangular ou delgada. A porção do flagelo livre é geralmente longa com seu contorno evidenciado ao longo do corpo. O núcleo tem formato oval, é deslocado em direção à região anterior do corpo ( $IN = 1,24 \pm 0,19$ ) e pode apresentar pontos de cromatina evidenciados (Fig. 7). O cinetoplasto é normalmente circular, embora alguns parasitos com cinetoplasto

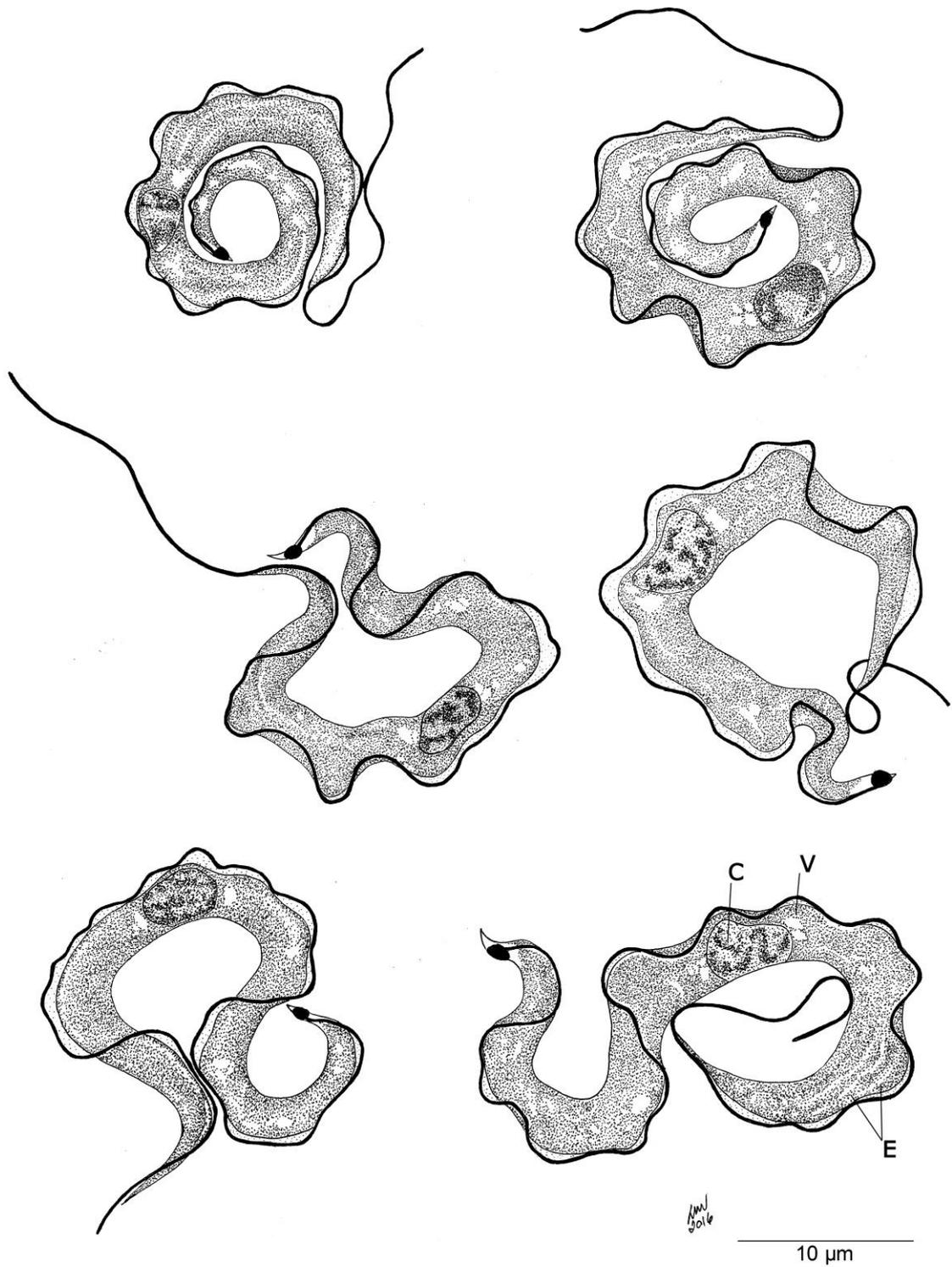
oval também tenham sido observados, geralmente parece ultrapassar os limites da largura da célula e localiza-se próximo à extremidade posterior ( $IK = 1,06 \pm 0,02$ ).

**Morfotipo 3** (Fig. 5 G-I, Fig. 8): apresenta corpo largo e curto com extremidade anterior afilada, normalmente estreitando-se próximo ao núcleo e seguindo gradativamente em direção ao flagelo, e extremidade posterior acentuadamente alargada. O formato do corpo é flexionado (Fig. 5 G, H, I), com parasitos em formato espiral sendo raramente visualizados. O citoplasma é fortemente corado com presença de estrias inclusive na região do núcleo, que devido à forte afinidade pelo corante são mais perceptíveis em observação ao microscópio (Fig. 5 H, Fig. 8), pequenos vacúolos (Fig. 8) e granulações. A região entre o cinetoplasto e a extremidade posterior é geralmente muito corada e em formato triangular. O flagelo livre possui tamanho variável e nem sempre é visível, mas as ondulações da membrana plasmática são sempre evidentes. O núcleo é oval ou reniforme, é sempre deslocado em direção à região anterior do corpo ( $IN = 1,32 \pm 0,17$ ) e apresenta cromatina evidenciada em alguns indivíduos (Fig. 8). O cinetoplasto é normalmente circular e localiza-se próximo a extremidade posterior ( $IK = 1,08 \pm 0,04$ ) normalmente deslocado lateralmente em direção à membrana plasmática.

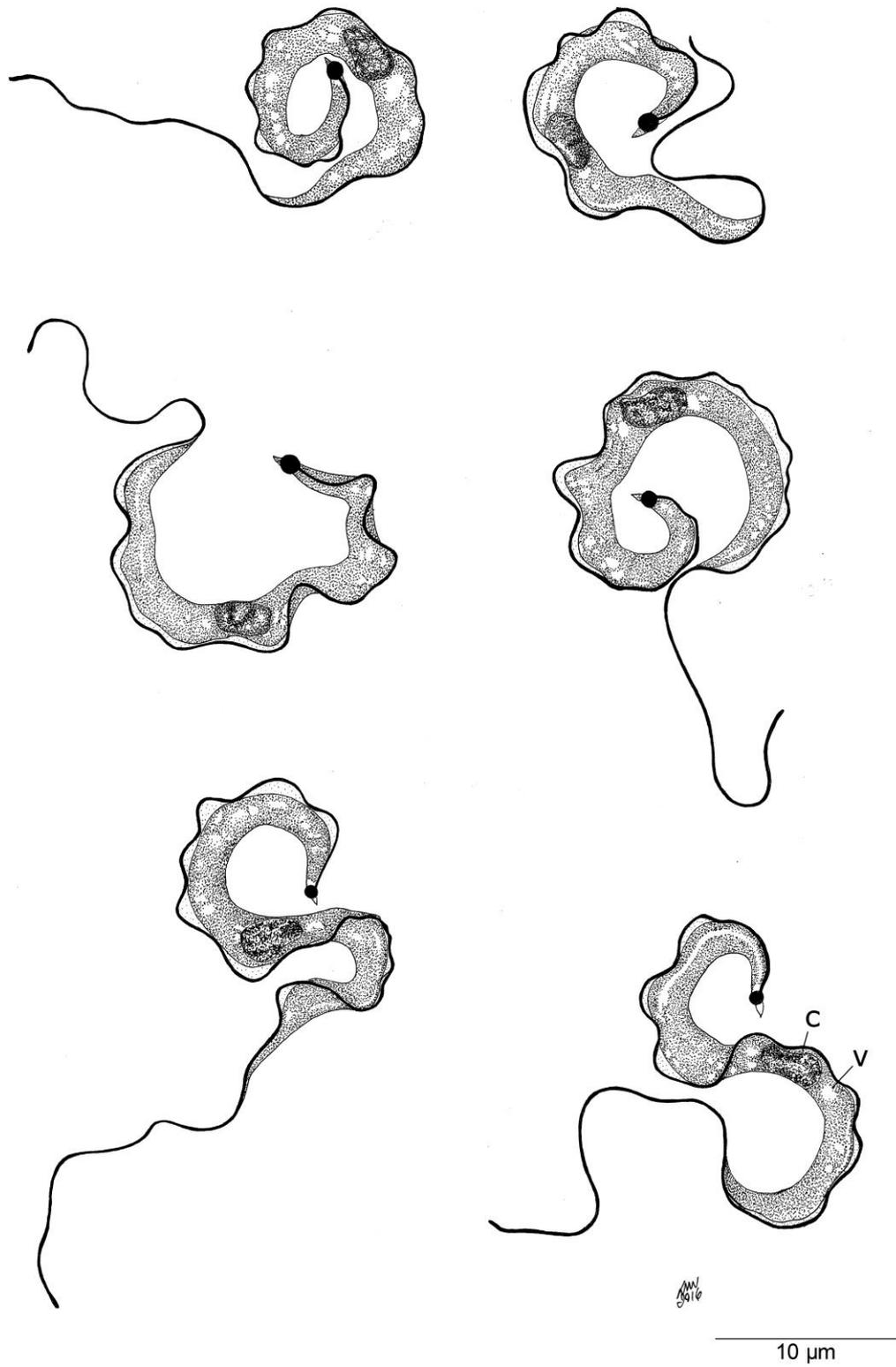
**Morfotipo 4** (Fig. 5 J-L, Fig. 9): apresenta corpo largo e longo com as duas extremidades afiladas. O corpo é normalmente mais retilíneo quando comparado aos outros morfotipos, apresentando apenas uma ou duas flexuras pronunciadas (Fig. 5 K, L), e podem ser observados alguns poucos parasitos com a região anterior do corpo em espiral (Fig. 5 L). O citoplasma é fortemente corado, podendo apresentar vacúolos próximos às duas extremidades (Fig. 5 L, Fig. 9) e algumas áreas fracamente coradas próximas às extremidades e também ao longo do corpo, que parecem acompanhar as ondulações da membrana (Fig. 9). O flagelo livre normalmente não é visualizado e as ondulações da membrana plasmática são conspícuas. O núcleo é oval, cora-se homoganeamente, embora alguns parasitos apresentem cariossoma evidenciado (Fig. 9), e encontra-se levemente deslocado em direção à região anterior do corpo ( $IN = 1,11 \pm 0,11$ ) na maior parte dos parasitos. O cinetoplasto é normalmente oval, envolto por uma área sem coloração e localizado na região terminal do corpo ( $IK = 1,02 \pm 0,01$ ).



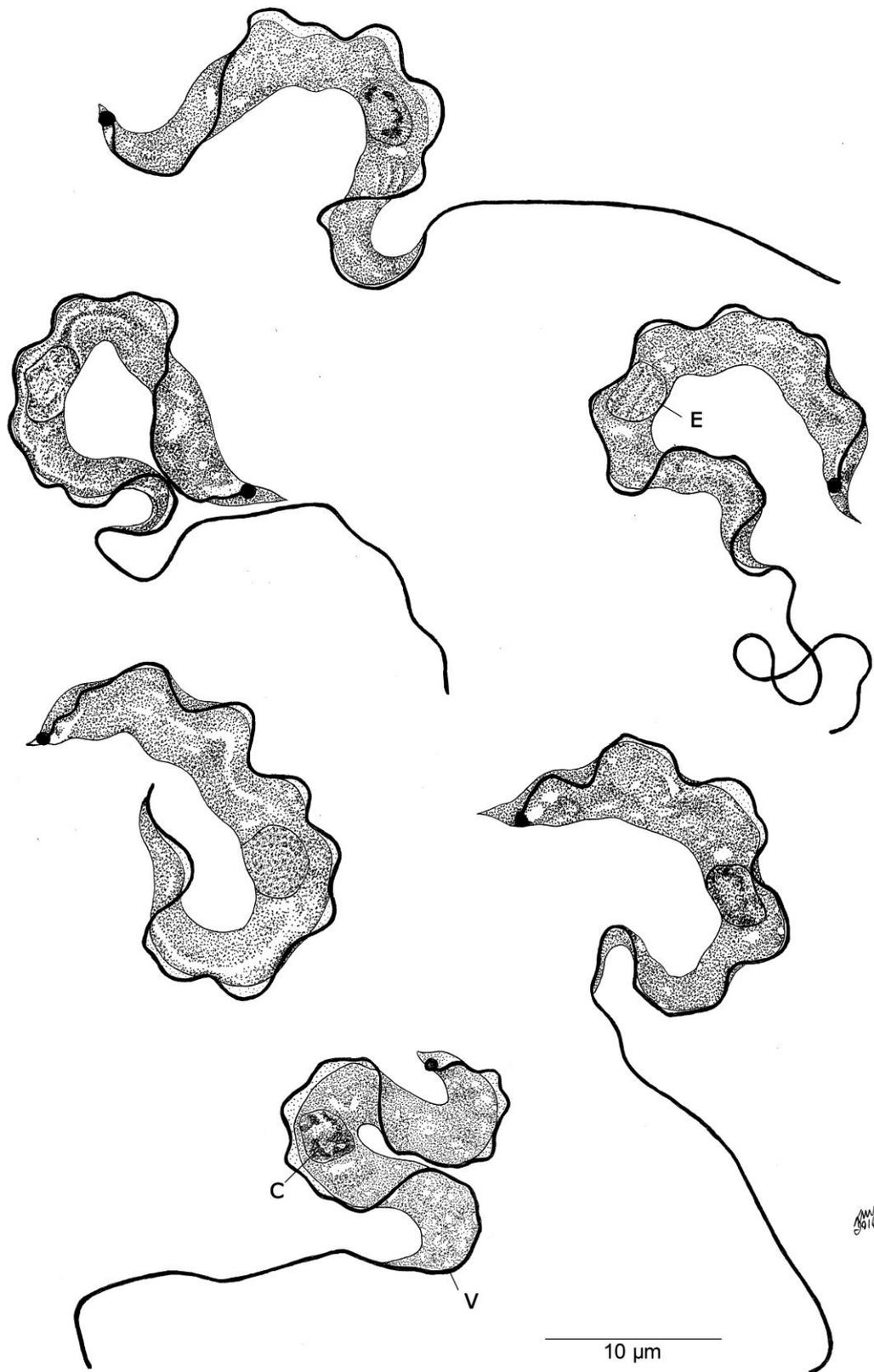
**Figura 5** Morfotipos de tripomastigotas sanguíneos encontrados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG, registrados por microscopia de luz de campo claro. Morfotipo 1 (A - C) de corpo delgado e longo, morfotipo 2 (D - F) de corpo delgado e curto, morfotipo 3 (G - I) de corpo largo e curto e morfotipo 4 (J - L) de corpo largo e longo. O cinetoplasto (c), o núcleo (N), o flagelo (F), os vacúolos (V) e as estrias (E) estão indicados. Barra = 10  $\mu$ m.



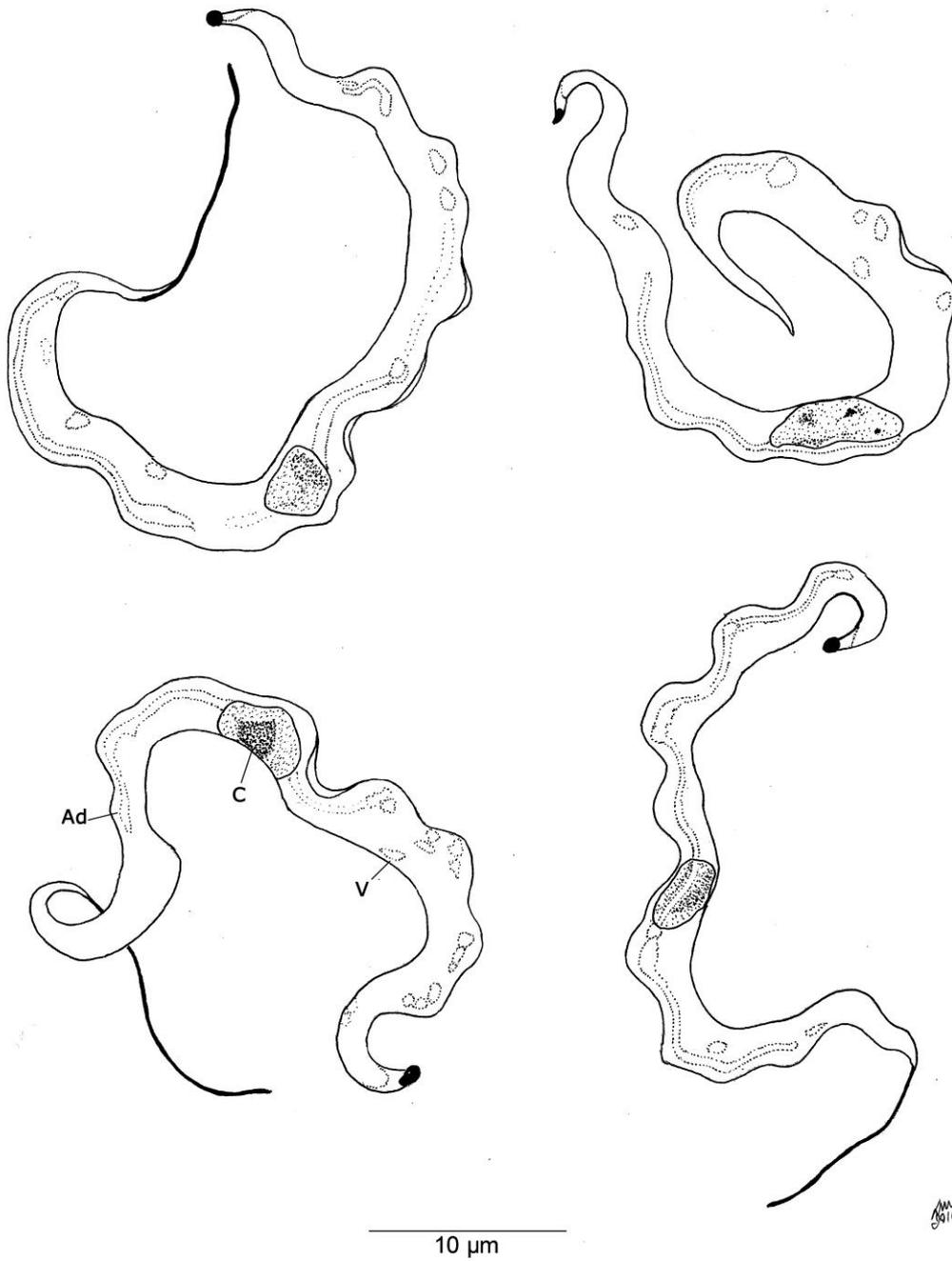
**Figura 6** Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 1 encontrados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Cromatina nuclear (C), estrias (E) e vacúolos (V) encontram-se exemplificados.



**Figura 7** Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 2 encontrados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Cromatina nuclear (C) e vacúolos (V) encontram-se exemplificados.



**Figura 8** Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 3 encontrados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Cromatina nuclear (C), estrias (E) e vacúolos (V) encontram-se exemplificados.



**Figura 9** Desenhos esquemáticos de tripomastigotas sanguíneos do morfotipo 4 encontrados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Áreas de descoloração (Ad), cromatina nuclear (C) e vacúolos (V) encontram-se exemplificados.

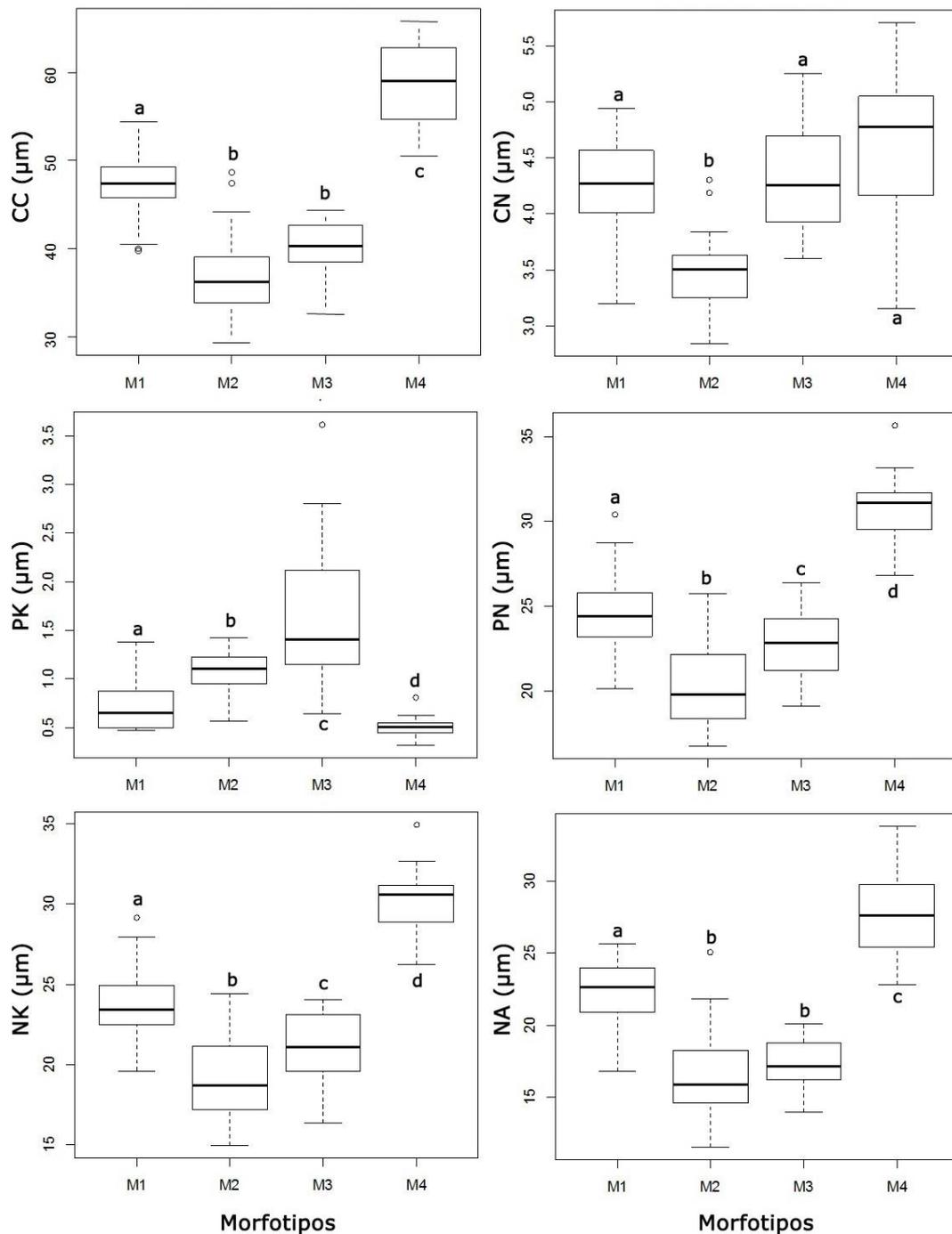
**Tabela 5** Dados morfométricos dos morfotipos sanguíneos dos tripanossomas de *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Os valores estão apresentados em  $\mu\text{m}$  e dispostos em média  $\pm$  desvio padrão, amplitude (mínimo - máximo) e coeficiente de variação de Pearson.

Parâmetros*	Morfotipos			
	1	2	3	4
<b>CT</b>	67,52 $\pm$ 3,98 <sup>a, b</sup> (59,41 - 73,60) 0,06	57,56 $\pm$ 6,90 <sup>c</sup> (40,78 - 68,31) 0,12	62,42 $\pm$ 9,81 <sup>a, c</sup> (41,25 - 76,18) 0,16	74,76 $\pm$ 5,28 <sup>b</sup> (66,17 - 80,45) 0,07
<b>CC</b>	47,02 $\pm$ 3,85 <sup>a</sup> (39,79 - 54,40) 0,08	37,01 $\pm$ 5,10 <sup>b</sup> (29,37 - 48,64) 0,14	40,19 $\pm$ 2,94 <sup>b</sup> (32,55 - 44,37) 0,07	58,47 $\pm$ 4,82 <sup>c</sup> (50,52 - 65,81) 0,08
<b>CN</b>	4,27 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup> (3,20 - 4,94) 0,10	3,49 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup> (2,85 - 4,30) 0,10	4,33 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup> (3,60 - 5,25) 0,12	4,63 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> (3,16 - 5,70) 0,15
<b>CK</b>	1,02 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup> (0,87 - 1,22) 0,09	1,01 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup> (0,87 - 1,22) 0,09	0,89 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup> (0,53 - 1,10) 0,18	0,95 $\pm$ 0,15 <sup>a, b</sup> (0,70 - 1,23) 0,16
<b>F</b>	20,42 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup> (18,70 - 22,92) 0,06	20,07 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup> (10,97 - 26,06) 0,16	21,72 $\pm$ 8,79 <sup>a</sup> (4,69 - 35,16) 0,40	15,59 $\pm$ 1,65 <sup>a</sup> (13,50 - 17,65) 0,11
<b>LC</b>	2,85 $\pm$ 0,34 <sup>a, b</sup> (2,21 - 3,37) 0,12	2,43 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup> (1,67 - 3,60) 0,19	3,23 $\pm$ 0,57 <sup>b, c</sup> (2,54 - 4,65) 0,18	3,57 $\pm$ 0,73 <sup>c</sup> (2,19 - 4,91) 0,20
<b>LN</b>	2,42 $\pm$ 0,33 <sup>a, b</sup> (1,80 - 3,02) 0,14	2,03 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup> (1,32 - 2,44) 0,14	2,69 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup> (1,75 - 3,95) 0,21	3,32 $\pm$ 0,74 <sup>c</sup> (1,93 - 4,91) 0,22
<b>LK</b>	0,86 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup> (0,70 - 1,05) 0,10	0,94 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup> (0,79 - 1,22) 0,13	0,83 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup> (0,53 - 1,10) 0,19	0,98 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup> (0,79 - 1,23) 0,15
<b>PK</b>	0,73 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup> (0,47 - 1,37) 0,34	1,08 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup> (0,56 - 1,42) 0,20	1,66 $\pm$ 0,82 <sup>c</sup> (0,64 - 4,09) 0,49	0,50 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup> (0,32 - 0,81) 0,21
<b>PN</b>	24,69 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup> (20,11 - 30,41) 0,10	20,25 $\pm$ 2,36 <sup>b</sup> (16,77 - 25,71) 0,12	22,71 $\pm$ 2,17 <sup>c</sup> (19,09 - 27,07) 0,10	30,71 $\pm$ 2,07 <sup>d</sup> (26,79 - 35,63) 0,07
<b>NK</b>	23,91 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup> (19,59 - 29,16) 0,10	19,12 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup> (14,96 - 24,43) 0,13	21,01 $\pm$ 2,09 <sup>c</sup> (16,34 - 24,07) 0,10	30,17 $\pm$ 2,06 <sup>d</sup> (26,25 - 34,95) 0,07
<b>NA</b>	22,33 $\pm$ 2,26 <sup>a</sup> (16,76 - 25,64) 0,10	16,71 $\pm$ 3,23 <sup>b</sup> (11,58 - 25,08) 0,19	17,38 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup> (13,96 - 20,11) 0,10	27,80 $\pm$ 3,20 <sup>c</sup> (22,82 - 33,79) 0,11

\* CT = comprimento total do corpo, incluindo o flagelo livre; CC = comprimento do corpo; CN = comprimento do núcleo; CK = comprimento do cinetoplasto; F = comprimento do flagelo livre; LC = largura do corpo; LN = largura do núcleo; LK = largura do cinetoplasto; PK = distância entre a extremidade posterior e o centro do cinetoplasto; PN = distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo; NK = distância entre o centro do cinetoplasto e o centro do núcleo; NA = distância entre a extremidade anterior e o centro do núcleo.

a, b, c, d Letras iguais simbolizam variância não significativa na média entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Conforme demonstrado na Tabela 5, alguns parâmetros morfométricos permitiram a diferenciação entre todos os morfotipos, como LK, PK, PN e NK. Além desses, é possível notar que o morfotipo 1 se diferencia dos demais quanto ao CC e NA, que o morfotipo 2 se diferencia quanto ao CN e o 4 se distingue dos demais pelo CC, PK, PN, NK e NA (Fig. 10).



**Figura 10** *Boxplot* de distintos parâmetros morfométricos obtidos a partir da mediana e que evidenciam diferenças entre os morfotipos de tripanossomas de *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* do rio Paraíba do Sul, MG. Letras diferentes simbolizam diferenças significativas obtidas a partir das médias de cada morfotipo. M1 = morfotipo 1, M2 = morfotipo 2, M3 = morfotipo 3 e M4 = morfotipo 4.

Outra estratégia adotada na literatura para a verificação de possíveis diferenças entre os morfotipos é o emprego da correlação entre os parâmetros, que, em alguns casos, também pode contribuir para a compreensão dos resultados da análise de variância. Assim, as correlações de Pearson e de Spearman foram realizadas e, dentre os resultados obtidos, foram considerados somente aqueles com forte grau de correlação ( $r > 0,6$ ) e cujos parâmetros não representavam medidas complementares entre si (Tabela 6).

Dentre os resultados, é possível notar que o morfotipo 1 apresenta correlação positiva entre CC e PK que não é apresentada pelos demais morfotipos e que o morfotipo 4 apresenta, isoladamente, correlação positiva entre CC e CN e também entre CN e NA. Todos os morfotipos apresentaram correlações positivas entre os parâmetros LC e LN. É interessante notar que o morfotipo 1 apresenta um coeficiente de variação do PK maior que 30% (Tabela 5), valor que pode ser considerado alto. Diante do resultado da correlação é possível perceber que este parâmetro responde às variações no CC, o que pode contribuir para esta dispersão dentro das amostras.

**Tabela 6** Correlação entre os parâmetros morfométricos adotados na caracterização dos morfotipos de tripanossomas de cascudos *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni*.

Graus de correlação entre as variáveis de acordo com os morfotipos				
Parâmetros correlacionados	1	2	3	4
CC - CN	-	-	-	0,656**
CC - PK	0,687**	-	-	-
LC - LN	0,755**	0,823**	0,681**	0,942**
CN - NA	-	-	-	0,636**

\*\* Correlação é significativa ao nível de significância de 0,01.

- Ausência de correlação dentro do critério estabelecido ( $r > 0,6$ ).

A Análise de Componentes Principais foi utilizada para verificar a distribuição dos morfotipos frente à variância da população observada na morfometria. Considerando que os dados referentes ao flagelo livre, e conseqüentemente o comprimento total, não puderam ser obtidos em todos os tripanossomas medidos, estes parâmetros foram excluídos na Análise de Componentes Principais. Além destes, a distância entre a extremidade posterior e o centro do cinetoplasto também não foi utilizada por apresentar coeficiente de variância maior que 20% dentro de

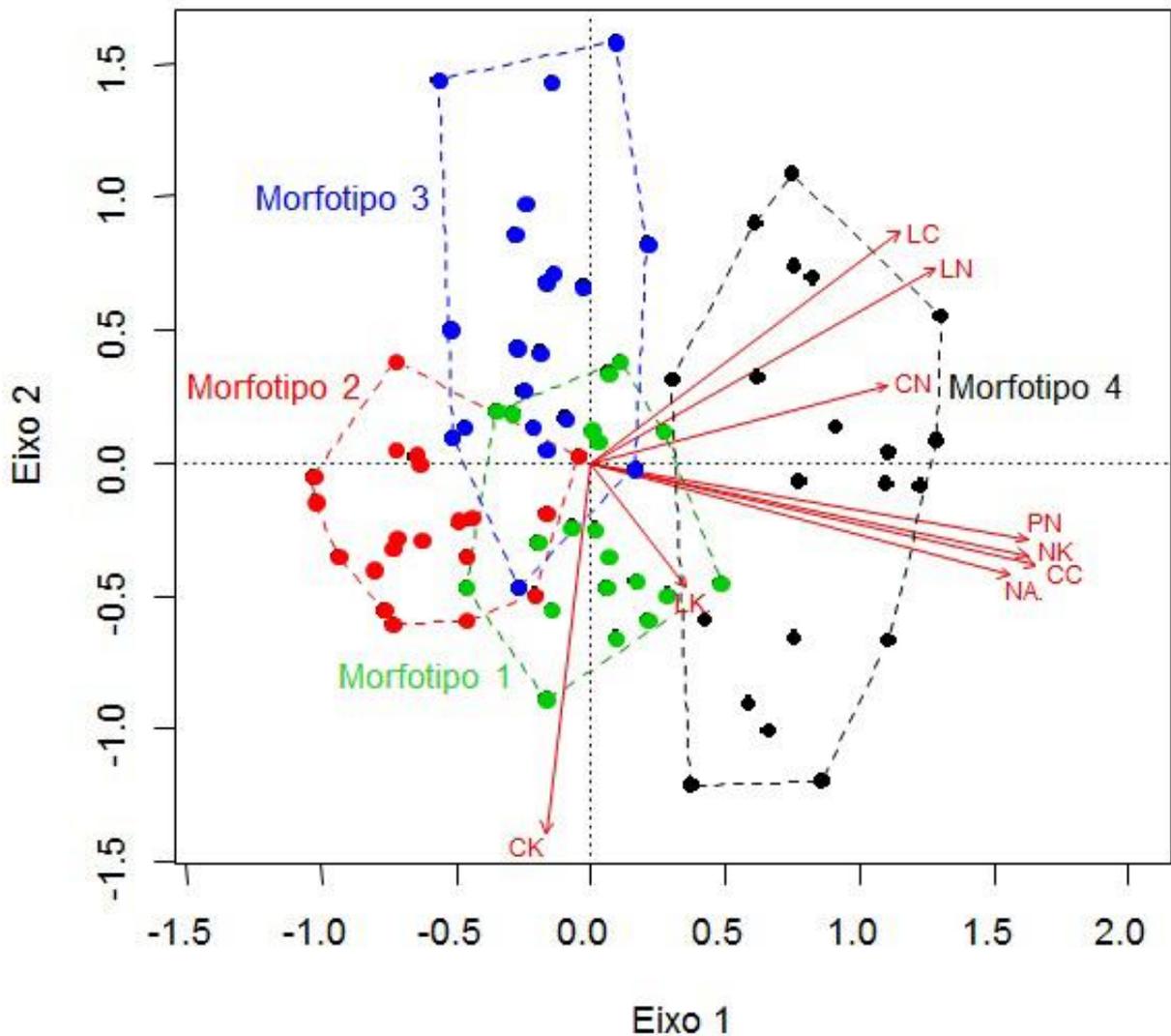
cada um dos quatro morfotipos, sendo, por isso, considerada como um parâmetro pouco robusto para o seu agrupamento.

A PCA pôde explicar, nos eixos 1 e 2, cerca de 70% dos dados. Diante dos valores dos escores de cada componente em relação aos eixos (Tabela 7) e do agrupamento gerado (Fig. 11), é possível perceber que a separação entre o morfotipo 4 e os demais foi influenciada, principalmente, pelo CC. Além deste parâmetro, PN, NK e NA também exerceram forte influência. Já o comprimento do cinetoplasto (CK) interferiu para a diferenciação do morfotipo 3 com relação aos morfotipos 1 e 2.

**Tabela 7** Contribuição dos parâmetros morfométricos no agrupamento dos morfotipos de tripanossomas de cascudos da bacia do rio Paraíba do Sul, MG, para os dois primeiros eixos da Análise de Componentes Principais.

Parâmetros*	Eixo 1	Eixo 2
CC	1,6512	-0,3823
CN	1,1028	0,2869
CK	-0,1662	-1,3852
LC	1,1465	0,8684
LN	1,2786	0,7343
LK	0,3516	-0,4677
PN	1,6185	-0,2886
NK	1,6198	-0,3470
NA	1,5549	-0,4220

\* CC = comprimento do corpo; CN = comprimento do núcleo; CK = comprimento do cinetoplasto; LC = largura do corpo; LN = largura do núcleo; LK = largura do cinetoplasto; PN = distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo; NK = distância entre o centro do cinetoplasto e o centro do núcleo; NA = distância entre a extremidade anterior e o centro do núcleo.



**Figura 11** Análise de Componentes Principais e agrupamento dos morfotipos de tripanossomas identificados em *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Os parâmetros analisados foram: comprimento do corpo (CC), comprimento do núcleo (CN), comprimento do cinetoplasto (CK), largura do corpo (LC), largura do núcleo (LN), largura do cinetoplasto (LK), distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo (PN), distância entre o centro do cinetoplasto e o centro do núcleo (NK) e distância entre a extremidade anterior e o centro do núcleo (NA).

Considerando que os dados obtidos com a PCA isoladamente não foram suficientes para distinguir claramente os morfotipos, o critério de informação de Akaike foi utilizado na tentativa de obter um melhor modelo de separação entre os morfotipos. Para essa análise as variáveis utilizadas foram LC, CN, LN, CK, LK, PN e NA. Estes parâmetros foram escolhidos por terem sido utilizados com frequência nos estudos morfológicos de tripanossomas disponíveis para a comparação. O CC não foi utilizado, pois as informações das distâncias extremidades-núcleo são complementares a ele. Além disso, foi considerado que estes parâmetros poderiam

fornecer mais informações por terem apresentado diferenças significativas entre todos os morfotipos.

Com base nos resultados (Tabela 8) é possível notar que apenas dois modelos atenderam ao critério estabelecido ( $\Delta AICc < 2$ ). O primeiro modelo ( $R^2 = 0,424$ ;  $AICc = 216,31$ ) incluiu os parâmetros LC, CK, LK, NA e PN, enquanto que o segundo modelo ( $R^2 = 0,394$ ;  $AICc = 217,92$ ) incluiu LC, CK, NA e PN. Considerando que o modelo mais parcimonioso obtido pôde explicar apenas 42,4% e que a PCA também não foi suficiente para a separação entre todos os morfotipos, fica demonstrada a fragilidade dos critérios morfométricos isoladamente para a definição de diferenças morfológicas.

**Tabela 8** Resultados dos modelos selecionados de acordo com o critério de informação de Akaike ( $AICc$ ), probabilidade do modelo ( $L(gi | x)$ ) e peso do Akaike ( $AIC wi$ ). Nesta tabela estão dispostos somente os modelos com os valores de  $\Delta AICc$  inferior a 2 e com os maiores valores de  $R^2$ .

Modelo	Parâmetros incluídos no modelo*	Parâmetros selecionados*	$R^2$	$AICc$	$\Delta AICc$	$L(gi   x)$	$AICc Wi$
Morfotipo	LC, CN, LN, CK, LK, NA, PN	LN, CK, LK, NA, PN	0,424	216,31	0	1	0,173
	LC, CN, LN, CK, LK, NA, PN	LN, CK, NA, PN	0,394	217,92	1,612	0,447	0,077

\* LC = largura do corpo; CN = comprimento do núcleo; LN = largura do núcleo; CK = comprimento do cinetoplasto; LK = largura do cinetoplasto; NA = distância entre a extremidade anterior e o centro do núcleo; PN = distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo.

### 5.3 Isolamento, Manutenção e Características Biológicas e Morfológicas dos *Tripanossomas in vitro*

Na coleta no rio Xopotó foram utilizados os meios de cultura contendo as três fases sólidas descritas (PO, PO.8 e BAB) acrescidas de BME 50%. Os meios bifásicos contendo as fases sólidas BAB e PO.8 possibilitaram apenas o isolamento dos parasitos, enquanto o meio composto por PO foi capaz de permitir a diferenciação dos parasitos em formas epimastigotas (Fig. 12 A - E).

Assim, na primeira coleta do ribeirão Forquilha, em que foram amostrados os primeiros quatro cascudos, foram utilizados apenas os meios de PO e BAB acrescidos de BME 50%. Da mesma forma que observado na coleta do rio Xopotó, somente o meio PO permitiu o isolamento e manutenção dos tripanossomas. Desta maneira, na segunda coleta no ribeirão Forquilha foi utilizado somente o meio PO acrescido de BME 50%.

De maneira geral, os primeiros tripomastigotas que puderam ser observados nos meios de cultura, 24 horas pós-inoculação (p.i.), foram semelhantes aos observados na circulação do hospedeiro vertebrado. Interessantemente, o tempo necessário para a observação dos primeiros epimastigotas nas culturas (Fig. 12 A - E) diferiu entre os dois locais de coleta, sendo de aproximadamente 120 horas p.i. para as culturas inoculadas com o sangue de peixes do rio Xopotó e 72 horas p.i. para aquelas inoculadas com o sangue dos cascudos do ribeirão Forquilha. Ao todo, foi possível a manutenção de seis isolados de tripanossomas em laboratório, sendo três de cada localidade.

Nas culturas em fase de estabelecimento foram visualizados epimastigotas menores (Fig. 12 B, C), enquanto em culturas já estabelecidas os epimastigotas mostraram-se com o corpo mais alongado (Fig. 12 A, D, E). Em ambas as fases de cultura foi notado o pleomorfismo dos epimastigotas, sendo observadas formas piriformes (Fig. 12 A, B) e formas delgadas (Fig. 12 D, E).

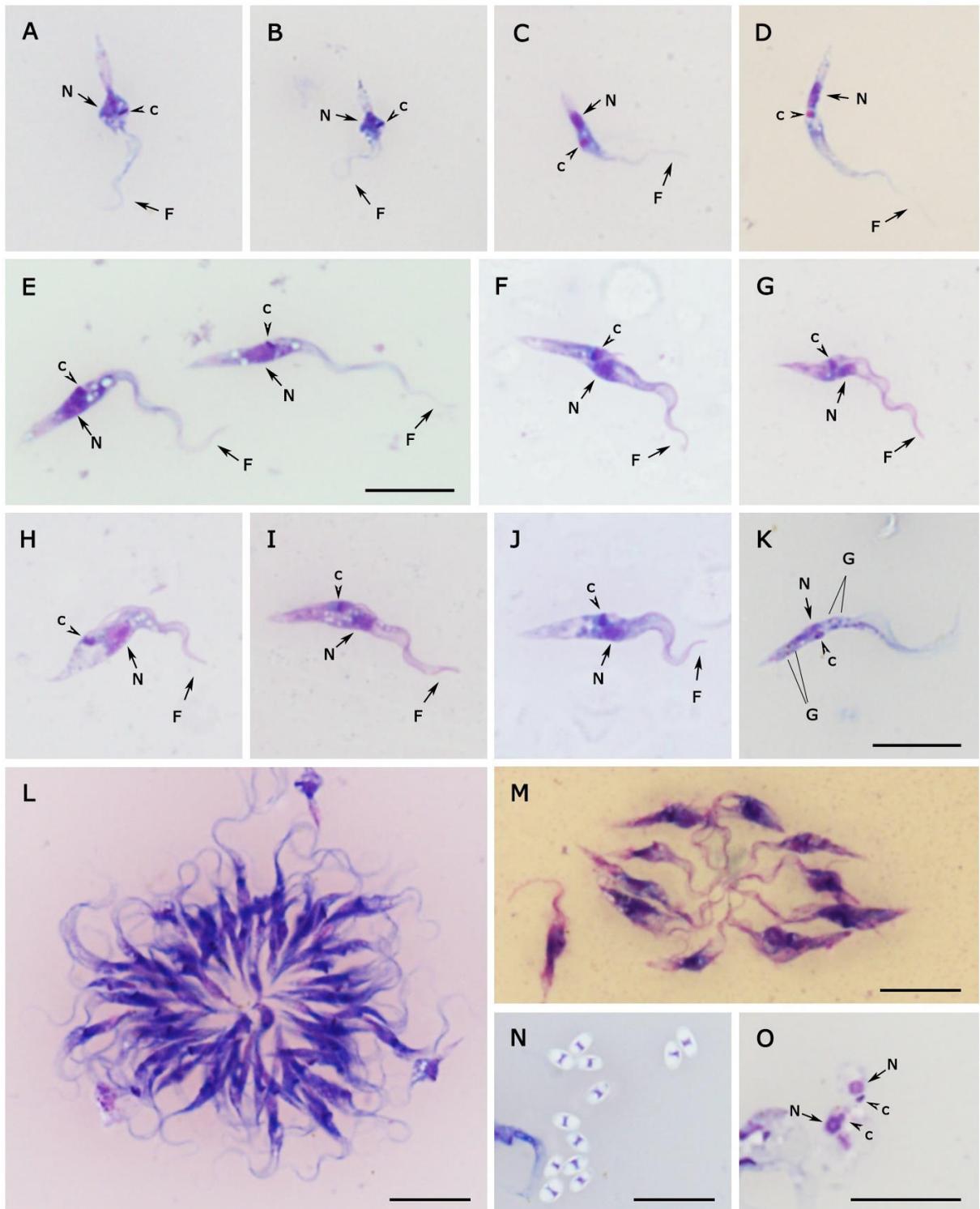
Os epimastigotas piriformes possuem as regiões anterior e mediana do corpo alargadas, enquanto a porção final é mais delgada. O cinetoplasto é em forma de barra e localiza-se muito próximo ao núcleo, sendo difícil visualizar e distinguir as duas organelas em grande parte dos parasitos observados. A porção do flagelo livre é curta e nem sempre visível. Os epimastigotas delgados não apresentam o alargamento do corpo observado nos piriformes, o cinetoplasto é normalmente circular e localizado próximo ao núcleo, mas geralmente não adjacente a ele e de fácil distinção. Alguns parasitos podem apresentar o cinetoplasto em forma de barra e mais próximos ao núcleo, mas, diferente do observado para os epimastigotas piriformes, a distinção entre as organelas é de fácil visualização. A porção do flagelo livre é longa e nem sempre visível. A morfometria destas formas evolutivas encontram-se relacionadas na Tabela 9.

Os tripomastigotas das culturas (Fig. 12 F - I) foram morfologicamente diferentes daqueles encontrados na circulação sanguínea dos peixes, sendo mais

curtos e delgados (Tabela 9). O cinetoplasto é circular ou oval e mais próximo ao núcleo do que da região terminal do corpo, por esta razão, a formação da membrana ondulante é observada, frequentemente, a partir da região mediana do corpo. A porção de flagelo livre destes parasitos é acentuadamente curta e nem sempre visualizada.

Estágios de transição entre tripomastigotas e epimastigotas foram visualizados, apresentando cinetoplasto lateral ou sobreposto ao núcleo (Fig. 12 J, K). Tanto nas formas epimastigotas, tripomastigotas e estágios de transição puderam ser observados, ocasionalmente, granulações no citoplasma (Fig. 12 K). Estas formas evolutivas foram observadas dispostas em rosetas agrupadas tanto pela região posterior (Fig. 12 L) quanto pela região anterior (Fig. 12 M) do corpo.

Interessantemente, algumas formas semelhantes a esferomastigotas foram ocasionalmente visualizadas (Fig. 12 N, O). O corpo dessas formas evolutivas apresenta formato normalmente oval com o citoplasma fracamente corado (Tabela 9). Núcleo e cinetoplasto são, na maior parte das vezes, possíveis de distinguir apenas em observação ao microscópio, pois frequentemente encontram-se sobrepostos.



**Figura 12** Formas evolutivas de tripanossomas, isolados a partir do sangue de *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* e mantidos *in vitro*, observados por microscopia de luz de campo claro. Epimastigotas (A-E), tripomastigotas (F-I), estágio de transição entre epimastigotas e tripomastigota (J, K), rosetas de parasitos agrupadas pela região posterior do corpo (L), rosetas de parasitos agrupadas pela região anterior do corpo (M), formas semelhantes a esferomastigotas (N, O). O cinetoplasto (c), o núcleo (N), o flagelo (F) e os grânulos do citoplasma (G) estão indicados. Barra = 10  $\mu$ m.

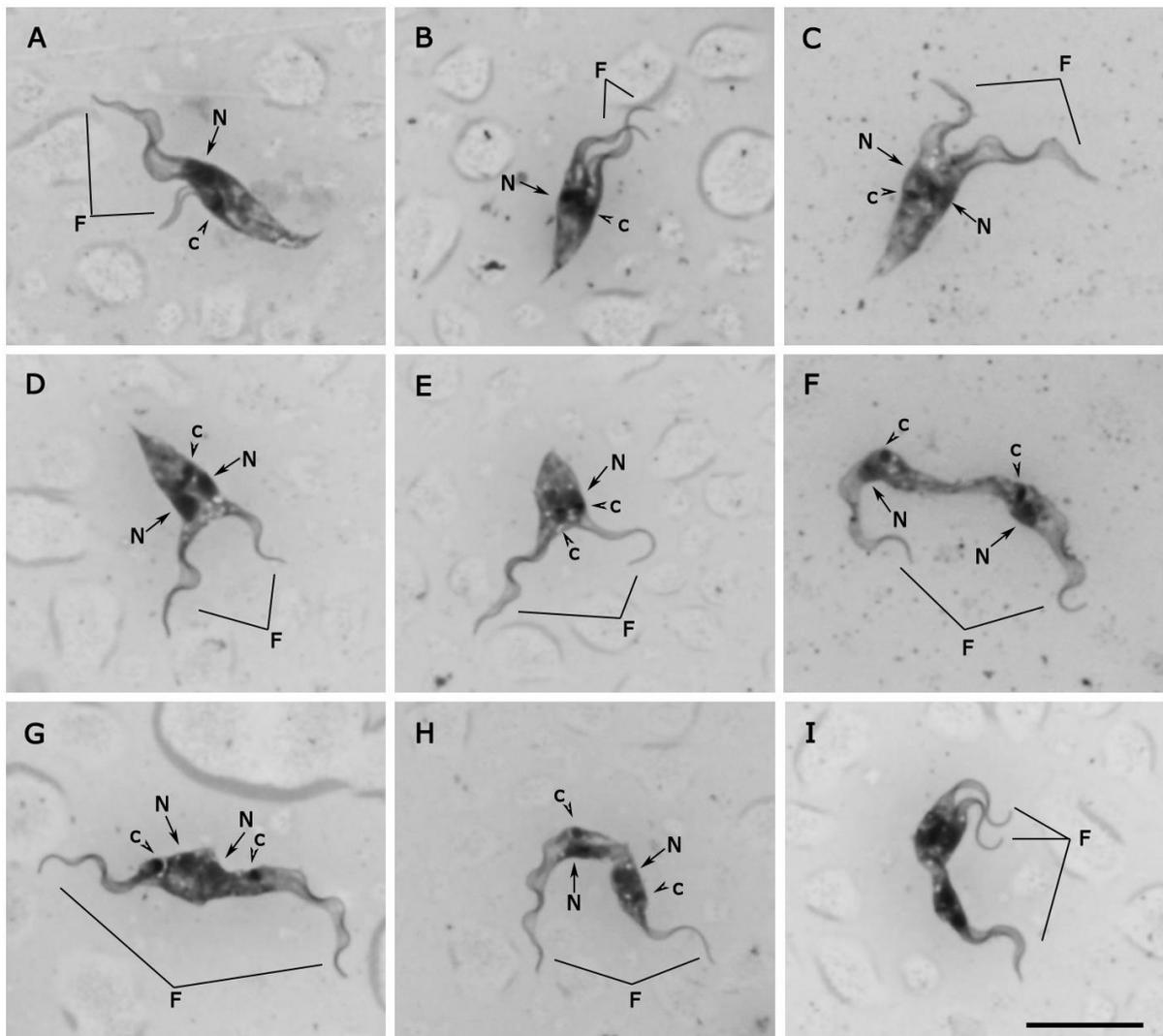
**Tabela 9** Características morfométricas das formas evolutivas dos tripanossomas de *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* observados nas culturas *in vitro*. Os valores estão apresentados em  $\mu\text{m}$  e dispostos em média  $\pm$  desvio padrão, amplitude (mínimo - máximo) e coeficiente de variação de Pearson.

Forma Evolutiva	N*	Comprimento do Corpo	Largura do Corpo	Comprimento do Flagelo Livre
<b>Epimastigota piriforme curto</b>	10	12,33 $\pm$ 0,46 (9,46 - 10,85) 0,04	2,90 $\pm$ 0,51 (1,93 - 3,43) 0,18	6,63 $\pm$ 1,18 (5,21 - 8,62) 0,18
<b>Epimastigota piriforme longo</b>	10	14,02 $\pm$ 2,12 (11,83 - 17,81) 0,15	3,15 $\pm$ 0,34 (2,73 - 3,87) 0,11	7,91 $\pm$ 1,33 (6,38 - 10,01) 0,17
<b>Epimastigota delgado curto</b>	10	14,32 $\pm$ 1,00 (13,00 - 15,49) 0,07	1,41 $\pm$ 0,23 (1,06 - 1,68) 0,16	10,33 $\pm$ 2,75 (6,28 - 15,10) 0,27
<b>Epimastigota delgado longo</b>	10	22,16 $\pm$ 1,81 (19,53 - 25,56) 0,08	1,41 $\pm$ 0,33 (1,11 - 1,94) 0,23	12,69 $\pm$ 3,16 (9,97 - 20,28) 0,24
<b>Tripomastigotas</b>	14	20,70 $\pm$ 2,84 (15,70 - 25,62) 0,14	3,12 $\pm$ 0,65 (2,02 - 4,70) 0,21	3,22 $\pm$ 1,14 (2,17 - 5,13) 0,35
<b>“Esferomastigotas”</b>	10	3,61 $\pm$ 0,35 3,10 - 4,24 0,10	2,03 $\pm$ 0,25 1,58 - 2,48 0,12	

\* Número de indivíduos amostrados

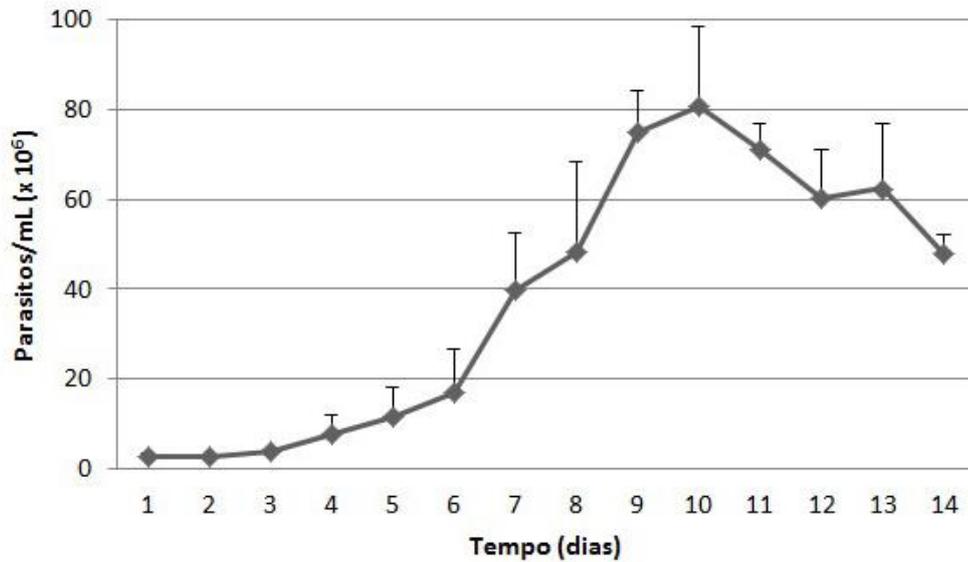
Quanto à reprodução, foram observados 135 parasitos em processo de divisão binária e, destes, foi possível a visualização da ordem de divisão das organelas em 36. A avaliação quanto à simetria da divisão foi observada somente em 31 exemplares. O primeiro sinal da divisão celular foi a formação de um novo flagelo, característica que pôde ser observada tanto em tripomastigotas (Fig. 13 A) quanto em epimastigotas (Fig. 13 B), sugerindo que ambas são replicativas. Após a formação do novo flagelo seguiu-se a divisão das organelas, que em 39% dos parasitos ocorreu com a multiplicação e segregação do núcleo anterior à do cinetoplasto (Fig. 13 C, D) e em 61% com a divisão do cinetoplasto antecedendo a do núcleo (Fig. 13 E). A divisão do citoplasma foi iniciada na parte anterior do corpo e se concretizou por constrição da extremidade posterior (Fig. 13 F). Com relação à simetria da divisão, foram registradas 84% de divisões simétricas, com a formação de dois epimastigotas ou dois tripomastigotas (Fig. 13 F, G), e 16% de divisões assimétricas, com a formação de um epimastigota e um tripomastigota (Fig. 13 H).

Além disso, algumas divisões atípicas foram ocasionalmente registradas. Nesse caso, os parasitos pareciam iniciar um outro processo de divisão sem que o primeiro tivesse sido finalizado, originando, assim, três parasitos (Fig. 13 I) ou mais.



**Figura 13** Processo de multiplicação *in vitro* dos tripanossomas de *Hypostomus affinis* e *Hypostomusluetkeni* da bacia do rio Paraíba do Sul, MG. Tripomastigota em início de divisão (A), epimastigota em início de divisão (B), divisão do núcleo anterior à do cinetoplasto (C, D), divisão do cinetoplasto anterior à do núcleo (E), divisão simétrica com formação de dois tripomastigotas (F), divisão simétrica com formação de dois epimastigotas (G), divisão assimétrica com formação de um tripomastigota e um epimastigota (H), processo de divisão anormal (I). Barra = 10  $\mu$ m.

A curva de crescimento dos tripanossomas de peixes coletados no rio Xopotó apresentou uma longa fase de crescimento exponencial (fase log) (Fig. 14). Até o 3<sup>o</sup> dia, os parasitos apresentaram uma discreta multiplicação. A fase estacionária foi atingida entre o 9<sup>o</sup> e o 11<sup>o</sup> dia e o número de tripanossomas obtido no 10<sup>o</sup> dia foi cerca de oito vezes maior do que o inóculo inicial. A curva realizada com os tripanossomas de peixes do ribeirão Forquilha apresentou características semelhantes até o 10<sup>o</sup> dia de experimento, quando a contagem foi interrompida.



**Figura 14** Curva de crescimento *in vitro* de tripanossomas isolados de *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* do rio Xopotó, MG. As marcas representam a média e o desvio padrão da quantificação dos tripanossomas à partir do experimento conduzido em triplicatas.

O processo de criopreservação não causou danos à viabilidade celular, pois ao serem descongelados os tripanossomas apresentaram eficiente capacidade de multiplicação. Além disso, os parasitos observados após descongelamento não demonstraram alterações morfológicas evidentes.

## 6 DISCUSSÃO

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* apresentam uma ampla variedade de espécies, das quais muitas são profundamente estudadas no contexto médico e veterinário. Entretanto, no que concerne aos tripanossomas de peixes, muitas lacunas ainda permanecem por serem esclarecidas, sobretudo no que se refere à variedade de espécies, sua distribuição biogeográfica e relações evolutivas, seus hospedeiros invertebrados e importância patogênica. Portanto, este trabalho teve por objetivo contribuir para o estudo desses parasitos através de sua caracterização morfológica e biológica, produzindo isolados *in vitro* que podem propiciar novos estudos em diferentes campos da protozoologia de parasitos.

### 6.1 Aspectos Relacionados à Infecção

No que se refere à infectividade, o presente estudo demonstrou a alta prevalência de tripanossomas em *H. affinis* (100%) e *H. luetkeni* (84,6%), peixes coletados na bacia do rio Paraíba do Sul e popularmente conhecidos como cascudos. No entanto, os dados de prevalência registrados para a família Loricariidae, em que se agrupam os cascudos (Tabela 1), são muito variáveis, tendo sido observadas desde prevalências baixas, como 9,5% em *Hypostomus auroguttatus* Kner, 1854 (SPLENDORE, 1910), até muito altas, como 100% em *H. punctatus*, *H. affinis*, *Pseudacanthicus spinosus* (Castelnau, 1855) e *Leporacanthicus galaxias* Isbrücker & Nijssen, 1989 (BARA, 1984; FUJIMOTO et al., 2013; LEMOS et al., 2015). Considerando as altas prevalências observadas em *H. affinis* e *H. luetkeni* neste estudo, em conjunto com os dados de prevalência apresentados por Lemos et al. (2015), 100% e 90% respectivamente, é possível sugerir que estas duas espécies apresentam uma alta tendência à infecção por tripanossomas. Entretanto, é preciso considerar que alguns fatores podem

influenciar as análises da prevalência, como o comportamento do hospedeiro vertebrado (BARA, 1984; FUJIMOTO et al., 2013), a abundância do hospedeiro invertebrado no ambiente (LETCH, 1977; OVERATH et al., 1999) e o método de diagnóstico utilizado (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; PÁDUA et al., 2011).

Apesar de o comportamento dos hospedeiros vertebrados não ter sido o foco deste estudo, sabe-se que os peixes da família Loricariidae possuem hábitos semelhantes, com comportamento agregativo durante o dia e dispersivo durante a noite (CAPPS e FLECKER, 2013), o que pode contribuir para a disseminação da infecção por facilitar a dispersão das sanguessugas entre eles. Além disso, alguns estudos sugerem que o hábito bentônico de peixes, como os cascudos, pode favorecer a infestação dos mesmos por sanguessugas (LETCH e BALL, 1979; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; FUJIMOTO et al., 2013).

Embora tenham sido encontradas sanguessugas na água do local, a coleta destes invertebrados não foi realizada, pois o fato de estarem infectados por tripanossomas não indicaria, com segurança, que estes estariam agindo como vetores dos mesmos parasitos encontrados nos peixes. De fato, sabe-se que nem mesmo o encontro da sanguessuga aderida ao peixe poderia indicar, com certeza, essa relação hospedeiro-vetor, pois estudos recentes sugerem que a análise molecular dos tripanossomas oriundos das sanguessugas é imprescindível para esta afirmação, uma vez que algumas sanguessugas encontradas parasitando peixes infectados podem estar, na realidade, infectadas por tripanossomas geneticamente distintos daqueles observados no sangue do hospedeiro vertebrado (HAYES et al., 2014; LEMOS et al., 2015).

Dentre os métodos de diagnóstico adotados neste estudo, o mais sensível foi o isolamento em meios de cultura (81,8%), seguido pela PCR (59,1%) e, finalmente, pela análise do esfregaço sanguíneo (54,6%). No entanto, foi demonstrado que, embora mais sensível, a cultura não foi eficiente para diagnosticar a infecção em dois hospedeiros. Estudos que validem a cultura como método de diagnóstico da infecção para tripanossomas de peixes ainda são necessários, visto que a maior parte das investigações realizadas até o momento foi focada na validação de protocolos a partir de hospedeiros comprovadamente positivos e na avaliação das características dos tripanossomas isolados (JONES e WOO, 1991b; DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995; OVERATH et al., 1998; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Na literatura consultada, somente Lemos (2012) empregou a cultura como método

complementar de diagnóstico aos esfregaços e impressões de órgãos, demonstrando sensibilidade de, apenas, 30% dentre os hospedeiros diagnosticados como positivos pela microscopia. Considerando que a parasitemia média observada em nosso estudo foi, pelo menos, de 10 vezes maior do que a registrada por Lemos (2012) e que o isolamento dos parasitos em cultura também demonstrou maior sensibilidade no presente estudo, é possível sugerir que o sucesso deste método também se relacione com a parasitemia no hospedeiro no momento da coleta do sangue e com a quantidade de sangue empregada para o isolamento (aproximadamente 50 µL neste estudo *versus* 30 µL daquele). Além disso, os resultados de Lemos et al. (2015) sugerem que a cultura pode agir como fator de seleção das espécies de tripanossomas. Assim, a falha da cultura poderia estar relacionada à baixa parasitemia. Por outro lado, considerando-se que em nosso estudo um dos hospedeiros apresentou alta parasitemia (Tabela 4), é possível sugerir que os tripanossomas destes peixes pertençam a espécies diferentes, o que só poderia ser confirmado por sequenciamento do DNA dos parasitos.

Conforme mencionado anteriormente, a prevalência da infecção pode ser influenciada pela técnica de diagnóstico utilizado. Nesse sentido, apesar de a PCR ter diagnosticado a infecção em um peixe negativo pela microscopia e cultivo, a mesma falhou em detectar a presença dos tripanossomas no sangue de seis hospedeiros positivos pela microscopia e/ou pelo cultivo (Tabela 3). O emprego da PCR em estudos de tripanossomas de peixes é relativamente recente e na maior parte dos casos foi utilizada para o sequenciamento de genes visando contribuir para a identificação de espécies e investigação de suas relações filogenéticas (MASLOV et al., 1996; GIBSON et al., 2005; GU et al., 2007a; GU et al., 2010; HAYES et al., 2014; LEMOS et al., 2015). Assim, dados que avaliem o seu uso no diagnóstico da infecção são escassos. Davies et al. (2005) utilizaram a amplificação de DNA e a análise de esfregaços sanguíneos como métodos de diagnóstico para tripanossomas de peixes da África e observaram que ambas as técnicas apresentaram falhas na detecção dos parasitos, no entanto, apesar das limitações impostas pela quantidade e qualidade do DNA utilizado, os autores consideraram a PCR o método mais sensível de diagnóstico. Outro aspecto que aparentemente pode limitar a sensibilidade do diagnóstico pela PCR é a parasitemia (QVARNSTROM et al., 2012) e, também por esta razão, o diagnóstico molecular de tripanossomas de mamíferos, como *T. cruzi*, tem sido constantemente aprimorado

(QVARNSTROM et al., 2012; BUA et al., 2013; MOREIRA et al., 2013). Considerando, no entanto, que em nosso estudo alguns dos hospedeiros negativos pela PCR apresentaram alta parasitemia (Tabela 3, 4), é possível sugerir que outros fatores, que não os níveis de parasitos circulantes, possam influenciar no resultado de técnicas moleculares. Desta forma, é provável que o diagnóstico tenha sido negativo, assim como sugerido por Davies et al. (2005), devido a problemas na etapa de obtenção do DNA dos tripanossomas no sangue total.

O diagnóstico por análise de esfregaços sanguíneos mostrou-se menos sensível, mas foi capaz de detectar a infecção em um hospedeiro com alta parasitemia e negativado pelas outras duas técnicas (Tabela 3, 4). De fato, diferentes estudos relataram a menor sensibilidade do diagnóstico por esfregaço quando comparado a outros métodos, como de aglomeração dos parasitos, observações a fresco e PCR (BARA e SERRA-FREIRE, 1985; DAVIES et al., 2005; PÁDUA et al., 2011). Os resultados obtidos por Bara e Serra-Freire (1985) demonstraram que o esfregaço detectou a infecção em apenas 72,9% dos cascudos positivamente infectados e que a sua sensibilidade poderia flutuar de acordo com as parasitemias. Por outro lado, em estudo recente foi observada elevada sensibilidade do diagnóstico por meio de preparações sanguíneas, detectando a infecção em 98% dos hospedeiros, apesar das baixas parasitemias médias registradas (LEMOS et al., 2015). Nesse caso, uma possível explicação seria o fato de ter sido utilizado sangue da circulação visceral para as preparações, através da impressão de órgãos como coração e rins, que, por sua vez, podem representar sítios de maior ocorrência dos tripanossomas (LEMOS, 2012; LEMOS et al., 2015).

As parasitemias médias aqui registradas em *H. affinis* e *H. luetkeni* podem ser consideradas de intensidade mediana ( $2,3 \times 10^3$  parasitos/mL e  $6,3 \times 10^3$  parasitos/mL, respectivamente) quando comparadas a outros estudos de infecções naturais. Por exemplo, a menor parasitemia média registrada por Bara e Serra-Freire (1985) em cascudos *H. punctatus* foi de  $1,2 \times 10^5$  parasitos/mL, enquanto a maior foi de  $9,6 \times 10^5$  parasitos/mL. Por outro lado, Lemos et al. (2015) registraram parasitemias de  $0,9 \times 10^2$  e  $1 \times 10^2$  parasitos/mL em cascudos *H. affinis* e *H. luetkeni*, respectivamente. Dentre os vários fatores que poderiam explicar as diferenças na parasitemia dos hospedeiros, pode-se ressaltar a ocorrência de flutuação sazonal, a influência da idade dos hospedeiros e, também, a resposta imune desencadeada (HORTA, 1910; TANDON e JOSHI, 1973; COTTRELL, 1977;

LETCH e BALL, 1979; BARA, 1984; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; CRUZ, 1995; JOERINK et al., 2006; LEMOS, 2012; LEMOS et al., 2015).

Com relação à flutuação sazonal da parasitemia, a temperatura é apontada como o fator de influência preponderante. Em países do hemisfério Norte, as estações do ano de maior infectividade variaram de acordo com o local em que o estudo foi conduzido (COTTRELL, 1977; LETCH e BALL, 1979; CRUZ, 1995). Já no Brasil, as maiores parasitemias e, também prevalências, da infecção foram observadas nos meses de inverno e/ou primavera (HORTA, 1910; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; LEMOS, 2012). Por serem ectotérmicos, os peixes tem seu sistema imune afetado pela temperatura da água e, ainda, cada espécie de peixe possui uma temperatura ótima para que tanto o sistema imune inato quanto o adquirido sejam completamente ativos (DITTMAR et al., 2014). Além disso, os tripanossomas podem apresentar alterações no metabolismo e, conseqüentemente, na velocidade de multiplicação em diferentes temperaturas (ISLAM e WOO, 1992; CRUZ, 1995). Finalmente, as mudanças na temperatura também afetam o comportamento das sanguessugas (ELLIOT e TULLET, 1986; ELLIOT e KUTSCHERA, 2011).

Além disso, foi observada a correlação negativa da carga parasitária com o comprimento e o peso dos hospedeiros, o que também poderia explicar a parasitemia média mais alta observada nos cascudos *H. luetkeni* (Tabela 4). De maneira geral, o comprimento dos hospedeiros pode ser entendido como a idade, significando, assim, que hospedeiros menores seriam também os mais jovens. Infecções por diferentes espécies de tripanossomas em cascudos do Brasil também demonstraram que os hospedeiros mais jovens apresentavam maiores cargas parasitárias (HORTA, 1910; BARA, 1984; BARA e SERRA-FREIRE, 1985; LEMOS, 2012). Considerando que a tripanossomíase em peixes tem curso crônico (KHAN, 1976; LETCH, 1980; ISLAM e WOO, 1991b) e que a resposta imunológica pode não só auxiliar no controle da parasitemia de uma infecção em curso, como também promover memória imunológica no hospedeiro exposto (JOERINK et al., 2006; OLADIRAN e BELOSEVIC, 2012), é possível que os hospedeiros mais jovens apresentem parasitemias mais altas devido à recente exposição ao parasito e à falta de memória imunológica.

Com relação às altas parasitemias associadas ao menor peso dos hospedeiros, é possível sugerir que exista uma relação entre a carga parasitária e um efeito patogênico, conforme relatado em diferentes estudos (KHAN, 1985; ISLAM

e WOO, 1991a, 1991b; AHMED et al., 2011; SU et al., 2014). De acordo com o que foi demonstrado por Islam e Woo (1991b), peixes-dourados experimentalmente infectados por *T. danilewskyi* podem apresentar diminuição do consumo de comida durante o período de altas parasitemias. Este resultado vai ao encontro da observação de Tandon e Joshi (1973), que relataram menor peso dos peixes que estavam infectados por *Trypanosoma maguri* Tandon & Joshi, 1973. Entretanto, para confirmar o potencial patogênico dos tripanossomas de *H. affinis* e *H. luetkeni* são necessários outros estudos em condições controladas de laboratório.

Diante do exposto, é possível notar que os resultados deste estudo corroboram dados apresentados na literatura com relação à prevalência e tendências das cargas parasitárias. Além disso, nota-se que a realização de pesquisas adicionais, visando o aprimoramento das técnicas de diagnóstico e a investigação do potencial patogênico dos parasitos, é de fundamental importância para o estudo dos tripanossomas de peixes.

## **6.2 Características Morfológicas e Morfométricas dos Tripomastigotas Sanguíneos**

Neste trabalho foram definidos quatro morfotipos de tripomastigotas sanguíneos encontrados nos peixes coletados. Embora o agrupamento em morfotipos tenha sido realizado de maneira independente da localidade de coleta, os morfotipos 1, 2 e 3 foram observados somente nos peixes coletados no rio Xopotó, enquanto o morfotipo 4 foi registrado apenas nos peixes do ribeirão Forquilha. No entanto, devido ao grande pleomorfismo dos tripanossomas e a não-especificidade quanto ao hospedeiro vertebrado (WOO e BLACK, 1984; CRUZ, 1995; EIRAS et al., 2012), não é possível definir se esses morfotipos representam ou não espécies distintas. Além disso, a distribuição biogeográfica também não pode ser utilizada como critério de distinção para estes parasitos, pois resultados recentes demonstraram uma grande plasticidade adaptativa de *T. abeli* que foi encontrado

infectando peixes de diferentes biomas do Brasil (LEMOS et al., 2015). Desta forma, os morfotipos são assim chamados apenas para fins de comparações morfológicas neste estudo, mas análises moleculares posteriores são necessárias para a definição taxonômica destes tripanossomas.

Atualmente são descritas no Brasil 63 espécies de tripanossomas de peixes de água doce (Tabela 1) e, destas, apenas *T. abeli* representa uma espécie bem definida, com identificação baseada em isolamento em cultura e filogenia molecular (LEMOS et al., 2015). Entretanto, embora bem caracterizada molecularmente, a morfologia dos tripomastigotas sanguíneos desta espécie não pôde ser definida devido ao encontro de infecções mistas nos hospedeiros vertebrados (LEMOS et al., 2015). Desta forma, as comparações morfológicas deste estudo serão limitadas às demais espécies de tripanossomas, enquanto *T. abeli* será priorizado nas comparações das características de cultura.

Precedendo a essa discussão, é importante notar que, nas descrições de espécies realizadas no Brasil, os autores desconsideraram a possibilidade de infecções mistas e descreveram distintos tipos morfológicos para uma mesma espécie. Assim, é possível que equívocos tenham sido cometidos na descrição desses tipos.

O morfotipo 1 deste estudo apresenta muitas semelhanças com a espécie descrita por Splendore (1910), identificada como *Trypanosoma hypostomi*, no que concerne às características do citoplasma granular, corpo afilado nas duas extremidades, área de descoloração próxima ao cinetoplasto, núcleo com grânulos de cromatina e posicionado na região central ou levemente deslocado para a região anterior. No entanto, vale ressaltar que o autor descreve uma área clara próxima ao núcleo, que não é apresentada por todos os indivíduos do morfotipo 1, mas por grande parte deles, e que são apresentados somente dois desenhos pouco detalhados dos parasitos, tornando essa comparação morfológica pouco precisa. Além disso, dentre os poucos parâmetros aferidos, as dimensões do comprimento do corpo e do flagelo livre são distintas. Outra espécie de tripanossoma que poderia apresentar semelhanças com esse morfotipo foi descrita por Fróes et al. (1979) como *Trypanosoma comersonii*. Essa semelhança pode ser percebida na morfometria e, na ausência de uma descrição detalhada, em algumas características morfológicas observadas no desenho, como aparente granulação do citoplasma, áreas de descoloração próxima ao núcleo, e ao cinetoplasto e, por fim, evidente

contorno do corpo pelo flagelo. Entretanto, é importante destacar que os próprios autores relataram que *T. comersonii* apresentava muitas semelhanças com outra espécie descrita por eles em 1978, identificada como *T. guaibensis*, e que a única justificativa para a definição de uma nova espécie seria a aparente ausência de uma porção livre do flagelo neste último. Interessantemente, os desenhos de *T. guaibensis* sugerem que não há granulação no citoplasma e tampouco a presença de vacúolos, assim como as medidas de largura do corpo diferem do morfotipo 1 e de *T. comersonii*. Outro ponto de destaque é que uma das fotos apresentadas para *T. guaibensis* pelos autores assemelha-se muito mais ao morfotipo 4 descrito neste estudo do que ao 1, o que é confirmado pelo trabalho de Bara (1984). Assim, considerando que, segundo os autores desta espécie, ela seria semelhante a *T. comersonii*, pode-se desconsiderar a possível semelhança entre este e o morfotipo 1 sugerida pelos desenhos e morfometria.

O morfotipo 2 apresenta algumas características compartilhadas com *Trypanosoma chetostomi* tipo I e *Trypanosoma albopunctatus* tipo III descritos por Fonseca e Vaz (1928, 1929). As características similares a *T. chetostomi* tipo I são referentes ao aspecto granuloso do citoplasma, descoloração em algumas áreas, que poderiam corresponder aos vacúolos descritos neste estudo, cinetoplasto alongado em sentido transversal em alguns parasitos e as medidas de CN e LN. Entretanto, não existem semelhanças com relação às descrições de pouca afinidade do núcleo com o corante, extremidade posterior descrita como “romba” e a distância entre o centro do cinetoplasto e a extremidade posterior (FONSECA e VAZ, 1929). Além disso, os autores não disponibilizaram desenhos esquemáticos ou fotos deste parasito, dificultando a comparação. Com relação a *T. albopunctatus* tipo III, são notadas semelhanças com relação ao aspecto geral do corpo, com citoplasma granuloso e levemente descorado ao redor do cinetoplasto. Além disso, como visto em alguns exemplares deste estudo, o núcleo pode exibir cromatina evidenciada e normalmente ocupa toda a largura do corpo do parasito. Contudo, o cinetoplasto não parece extravasar os limites da célula, de acordo com o desenho esquemático disponível, e o flagelo não é bem marcado pelo corante (FONSECA e VAZ, 1928; FONSECA, 1935). Além deste, *Trypanosoma venustissimum* tipo I descrito por Fróes et al. (1979), apresenta medidas de alguns parâmetros similares e também é sugerido, pelo desenho, que o cinetoplasto parece extravasar os limites do corpo, conforme relatado para o morfotipo 2. Contudo, os parâmetros morfométricos

aferidos são poucos, a descrição não é detalhada e, conforme observado para *T. comersonii*, as interpretações baseadas somente em desenhos podem não condizer com a realidade.

O morfotipo 3 é, dentre todos, o mais peculiar por apresentar a região posterior do corpo alargada, cinetoplasto deslocado lateralmente e núcleo sempre deslocado para a região anterior do corpo. Desta forma, chamam a atenção as descrições de *T. chetostomi* tipo II e *Trypanosoma ferreirae* tipo I Fonseca & Vaz, 1928 devido a esse deslocamento lateral do cinetoplasto. Entretanto, a posição relativa do núcleo não é informada e tampouco o alargamento da região posterior (FONSECA e VAZ 1928, 1929). Além disso, o único espécime de *T. chetostomi* tipo II não é representado por desenho ou fotografia, as medidas apresentadas para os poucos espécimes de *T. ferreirae* tipo I são distintas das obtidas no morfotipo 3, sendo muito mais longos que este e com cinetoplasto maior, e no desenho esquemático não é representado o alargamento da região posterior (FONSECA, 1935).

O morfotipo 4 pode ser considerado o mais semelhante aos tripanossomas já descritos no Brasil. Foram considerados correlatos a ele, tanto em morfologia quanto em morfometria, *Trypanosoma saadi* tipo I descrito por Lopes et al. (1990b) em bagres, *Trypanosoma birmani* tipo I e *Trypanosoma britskii* tipo II registrados por Ribeiro et al. (1991) e Lopes et al. (1991a), respectivamente, em cascudos. É importante considerar que estas descrições consideraram as características morfológicas, sem suporte estatístico, a ocorrência geográfica e a espécie do hospedeiro para serem identificadas como novas (LOPES et al., 1990b; LOPES et al., 1991a; RIBEIRO et al., 1991).

Considerando os resultados estatísticos das análises de variância, é possível notar que os parâmetros LK, PK, PN e NK apresentam diferenças significativas entre todos os morfotipos e que a correlação revela que os morfotipos 1 e 4 apresentam relações lineares exclusivas, o que contribui para a sua diferenciação dos demais. Por outro lado, nem todos os parâmetros contribuem para a diferenciação entre os grupos, como no caso de F. A aparente fragilidade deste parâmetro para a diferenciação de espécies foi registrada por Karlsbakk e Nylund (2006), que destacaram a importância em se avaliar grandes números de parasitos para a observação desse caráter, pois muitas vezes ele pode estar sobreposto pelo corpo do parasito ou não evidenciado devido ao protocolo de coloração adotado.

Frente aos resultados obtidos a partir da Análise de Componentes Principais, é possível perceber que muitas vezes a morfometria por si só não é capaz de identificar as grandes diferenças morfológicas observadas entre os tripanossomas. Além disso, o resultado do critério de informação de Akaike, que revelou que o modelo mais parcimonioso diante dos dados morfométricos consegue explicar apenas 42,4% dos dados, demonstra a importância de se observar um número estatisticamente satisfatório de tripomastigotas sanguíneos, visando diminuir os desvios dentro da população. Estes dados vão ao encontro dos registros de Karlsbakk e Nylund (2006), que sugerem a existência de aspectos morfológicos similares dentro de uma espécie, independentemente de variações morfométricas, como o comprimento do corpo do tripanossoma.

Diante do exposto, torna-se evidente a dificuldade em se realizar comparações morfológicas dentre os tripanossomas de peixes do Brasil, devido a poucas fotografias disponíveis, desenhos pouco detalhados, descrições muitas vezes superficiais e falta de padronização entre as características morfométricas observadas. Ainda assim, seria possível considerar o morfotipo 1 semelhante a *T. hypostomi* e o morfotipo 4 a *T. saadi* tipo I, *T. birmani* tipo I e *T. britskii* tipo II. Os morfotipos 2 e 3 não foram considerados correlatos a nenhuma outra espécie descrita. Além disso, os resultados matemáticos evidenciam, uma vez mais, o inconveniente gerado nas identificações de espécies baseadas apenas em características morfológicas e/ou morfométricas de poucos tripomastigotas sanguíneos. Assim, é possível comprovar a necessidade do uso de ferramentas complementares à morfologia, sobretudo análises moleculares com o sequenciamento de genes que propiciem estudos filogenéticos.

### **6.3 Características dos Tripanossomas Mantidos *In Vitro***

No contexto do estudo de tripanossomas de peixes, o desenvolvimento de técnicas de cultura podem trazer grandes benefícios no que tange o conhecimento

de aspectos biológicos desses parasitos, proporcionando não só o aprofundamento dos conhecimentos sobre o metabolismo e a fisiologia desses organismos, mas também permitindo estudos que necessitem de grandes quantidades de indivíduos e de condições controladas, como ensaios imunológicos.

No presente trabalho, o isolamento e manutenção *in vitro* de tripanossomas de peixes de diferentes locais da bacia do rio Paraíba do Sul, MG, foi possível somente em meio PO recoberto por BME 50%. Os outros dois meios bifásicos testados (BAB e PO.8) permitiram apenas o isolamento dos parasitos sem a diferenciação em epimastigotas. O emprego de meios de cultura bifásicos no estudo de tripanossomas de peixes pode promover seu isolamento e manutenção em laboratório, sugerindo que a difusão gradual de nutrientes da fase sólida para a fase líquida favorece seu crescimento *in vitro* (STOHLMAN, MASTRIGHT e KAZAN, 1973; JONES e WOO, 1991b; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Além disso, a osmolaridade do meio de cultura pode interferir no crescimento dos tripanossomas (PRESTON, 1966; JONES e WOO, 1991b), sugerindo preferências fisiológicas destes organismos. Estes aspectos foram observados em *T. phaleri* e em *T. abeli*, que demonstraram tolerância ao crescimento em meios hipo, iso e hiperosmóticos (JONES e WOO, 1991b; LEMOS, 2012; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015). Considerando que o meio PO é hiposmótico e que o meio PO.8 é isosmótico (JONES e WOO, 1991b), é possível considerar que os tripanossomas isolados neste estudo apresentaram preferência pelo crescimento em meio hiposmótico e intolerância ao meio isosmótico, uma vez que não foi possível sua manutenção neste último. Estes resultados assemelham-se às observações realizadas para *T. catostomi*, parasito de peixes de água doce registrado na América do Norte (JONES e WOO, 1991b). Assim, os isolados obtidos neste trabalho apresentam fisiologia diferente da única espécie de tripanossoma de peixe isolado no Brasil até o momento.

Outra característica interessante, observada para os tripanossomas deste estudo, é que os isolados de cada localidade apresentaram divergências no tempo de diferenciação em epimastigotas, sendo maior para aqueles obtidos na coleta do rio Xopotó. Neste caso, é importante considerar que a coleta do rio Xopotó ocorreu no mês de abril, que apresentou temperaturas menores (aproximadamente 21 °C no dia da coleta) do que as dos meses de coleta do ribeirão Forquilha (fevereiro e março; aproximadamente 25 °C). Observando que pequenas alterações na

temperatura podem interferir na velocidade de multiplicação dos parasitos (ISLAM e WOO, 1992; CRUZ, 1995), não é possível afirmar que os distintos tempos de diferenciação dos isolados estejam necessariamente atrelados a diferenças metabólicas entre os tripanossomas de cada localidade.

As formas evolutivas registradas em cultura foram “esferomastigotas”, epimastigotas pleomórficos e tripomastigotas menores e mais delgadas do que os observados na circulação do hospedeiro vertebrado. Além disso, foram registradas formas de transição entre epimastigotas e tripomastigotas. Diferenças morfológicas entre os tripomastigotas sanguíneos e os mantidos *in vitro*, observadas neste estudo, foram relatadas para *T. granulosum* (DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995) e *T. abeli* (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015). A observação de epimastigotas, indicações de seu pleomorfismo e formas de transição entre epimastigotas e tripomastigotas foram relatadas para diferentes espécies de tripanossomas em cultura (JONES e WOO, 1991b; DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995; LEMOS, 2012; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015).

Considerando que os meios de cultura podem simular tanto o organismo do hospedeiro vertebrado quanto do invertebrado (VISVESVARA e GARCIA, 2002) e que, por esta razão, podem influenciar nas formas evolutivas dos tripanossomas (PRESTON, 1966), é possível sugerir que o meio PO simule o organismo das sanguessugas. Tal sugestão pode ser corroborada pelas diferenças observadas entre os tripomastigotas do cultivo e do hospedeiro vertebrado, que também foram notadas nos tripomastigotas presentes nas sanguessugas (LETCH, 1980; D’AGOSTO e SERRA-FREIRE, 1993; LEMOS, 2012), sendo estas formas menores e mais delgadas consideradas tripomastigotas metacíclicos (KHAN, 1976; LETCH, 1980). Além disso, em sanguessugas também foram registradas formas epimastigotas, conforme observado nas culturas deste trabalho (D’AGOSTO e SERRA-FREIRE, 1993; LEMOS, 2012; HAYES et al., 2014; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015).

A formação de grandes rosetas pelos tripanossomas em cultura, observadas em nosso estudo, corrobora registros da literatura para *T. abeli*. (LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014; LEMOS et al., 2015), *T. granulosum* (DAVIES et al., 1992; CRUZ, 1995), *T. phaleri* (JONES e WOO, 1991b) e *Trypanosoma rajae* (Laveran & Mesnil, 1902) (PRESTON, 1966). Em 1995, Cruz relacionou o surgimento destes

aglomerados com a fase de crescimento exponencial do cultivo de *T. granulorum*, porém a investigação desta relação não foi realizada neste estudo.

Em relação a divisão dos parasitos, foi possível observar que essa iniciou-se com a formação de um novo flagelo livre, tanto em epimastigotas quanto em tripomastigotas, corroborando o que foi observado para distintas espécies de tripanossomas (JONES e WOO, 1991b; BURRESON e KARLSBAKK, 2007; LEMOS, 2012; LEMOS et al., 2015). Após esta etapa seguiu-se a divisão das organelas, que na maior parte dos parasitos ocorreu com a divisão do cinetoplasto precedendo à do núcleo. Esta sequência de divisão é relatada para tripanossomas de peixes de água doce, no entanto, acreditava-se que a divisão do núcleo anterior à do cinetoplasto, que também foi observada neste estudo, ocorresse somente em tripanossomas de peixes de água salgada (JONES e WOO, 1991b; BURRESON e KARLSBAKK, 2007; LEMOS, 2012; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Assim, os isolados de cascudos do rio Xopotó e do ribeirão Forquilha apresentam um padrão de divisão das organelas que ainda não havia sido registrado em tripanossomas de peixes de água doce, incluindo *T. abeli*, o que torna esse achado também inédito. No entanto, outros experimentos, como microscopia de fluorescência, devem ser realizados para confirmar essa observação.

O final da divisão, por sua vez, ocorreu por constrição da extremidade posterior do corpo, originando normalmente dois parasitos iguais, produtos de uma divisão simétrica. Em menor frequência, foram observadas divisões assimétricas, com formação de um epimastigota e um tripomastigota. Estas características de divisão foram relatadas para *T. phaleri* e *T. catostomi* (JONES e WOO, 1991b). Além disso, neste estudo foi registrado um processo que sugere uma divisão anormal destes parasitos, tendo sido registrados três ou mais flagelos, e organelas correspondentes, ainda ligados pelo citoplasma. Essa observação poderia estar relacionado a algum erro durante a fissão binária e já foi relatado para *T. phaleri*, sendo identificados como corpos multinucleados (JONES e WOO, 1991b).

Quanto ao desenvolvimento dos parasitos *in vitro*, observou-se, por meio de curvas de crescimento, padrões semelhantes para as duas localidades. Comparando este resultado com o padrão de crescimento de *T. abeli* é possível notar que as multiplicações dos isolados deste estudo são substancialmente mais lentas (LEMOS, 2012; LEMOS e SOUTO-PADRÓN, 2014). Embora a observação das características de desenvolvimento *in vitro* seja importante para a caracterização

de espécies destes parasitos (CASTELLANI e WILEY, 1905 apud JONES e WOO, 1991b), conforme mencionado anteriormente, as diferenças de temperatura em que os meios foram mantidos podem ser responsáveis pelos padrões de crescimento distintos, não sendo possível afirmar que *T. abeli* e os presentes isolados representem espécies diferentes devido às suas características metabólicas.

Assim, embora as diferenças metabólicas observadas entre os isolados deste estudo e *T. abeli* não possam ser consideradas devido às diferenças de temperatura, é possível sugerir que eles pertençam a espécies distintas baseado em suas características fisiológicas e no padrão de multiplicação apresentado.

Diante de todo o exposto, é possível concluir que este estudo apresenta resultados interessantes acerca da biologia dos tripanossomas de peixes do Brasil e abre futuras perspectivas para a investigação destes protozoários. Frente à taxonomia tão controversa, é possível perceber que as incongruências sobre as espécies de tripanossomas de peixes do Brasil persistem, devido à falta de detalhes e rigorosidade nas classificações, direcionando a solução para a taxonomia molecular. Existem ainda muitos pontos a serem investigados sobre os tripanossomas obtidos neste estudo, como o potencial patogênico destes isolados e sua relação filogenética com *T. abeli*.

## 7 CONCLUSÕES

1. Os cascudos *Hypostomus affinis* e *Hypostomus luetkeni* provenientes da Bacia do Rio Paraíba do Sul apresentam infecção por protozoários do gênero *Trypanosoma*;
2. O uso simultâneo de distintos métodos de diagnóstico faz-se necessário para a obtenção de dados mais fidedignos quanto à prevalência da infecção por tripanossomas em peixes;
3. Apesar de dois dos morfotipos (1 e 4) descritos neste estudo se assemelharem a espécies já descritas na literatura, os morfotipos 2 e 3 não são correlatos a qualquer espécie de tripanossomas já registrados no país;
4. Os modelos estatísticos utilizados neste estudo demonstram que análises puramente morfométricas podem não refletir claramente as diferenças morfológicas dos tripomastigotas sanguíneos;
5. Os tripanossomas isolados de *H. affinis* e *H. luetkeni* apresentam propensão ao crescimento em meio de cultura hiposmótico (PO), o que o diferencia fisiologicamente da única espécie já isolada no Brasil;
6. As formas evolutivas *in vitro* dos tripanossomas provenientes de *H. affinis* e *H. luetkeni* são epimastigotas e tripomastigotas. Apesar de formas semelhantes a esferomastigotas terem sido observadas, por meio de esfregaços corados com Giemsa, técnicas mais sensíveis devem ser realizadas para comprovar esse encontro;
7. Os tripanossomas em cultura foram observados agrupados em rosetas tanto pela região anterior quanto posterior do corpo, o que os diferencia do padrão descrito para *T. abeli*;
8. A sequência de divisão das organelas dos isolados deste estudo não segue um padrão único, podendo ocorrer tanto com segregação do cinetoplasto anterior ao núcleo, conforme relatado para tripanossomas de peixes de água doce, quanto

com a divisão do núcleo anterior à do cinetoplasto, característica de tripanossomas de peixes de água salgada;

9. Os dados biológicos aqui apresentados sugerem que os parasitos isolados neste estudo podem pertencer a uma espécie de tripanossoma ainda não descrita na literatura. No entanto, somente ferramentas moleculares poderão confirmar essa hipótese.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLARIN, M. O. 1970. A note on the trypanosomes from the African freshwater fish and some comments on the possible relationship between taxonomy and pathology in trypanosomes. **Bulletin of Epizootic Diseases of Africa**, **18**: 221-228.

ADAMS, E. R.; HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C. 2010. African trypanosomes: celebrating diversity. **Trends in Parasitology**, **26**: 324–328.

AHMED, M. S.; SHAFIQ, K.; ALI, H.; OLLEVIER, F. 2011. Pathogenic effects associated with *Trypanosoma danilewskyi* strain fcc 1 infection in juvenile common carp, *Cyprinus carpio* L. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, **21** (4): 800-806.

AHMED, N. H. 2014. Cultivation of parasites. **Tropical Parasitology**, **4** (2): 80-89.

ARDELLI, B. F.; WOO, P. T. K. 1998. Improved culture media for piscine hemoflagellates, *Cryptobia* & *Trypanosoma* (Kinetoplastida). **The Journal of Parasitology**, **84** (6): 1267-1271.

BARA, M. A. **Etiologia da tripanosomíase em *Hypostomus punctatus* Valenciennes, 1840 (Osteichthyes, Loricariidae): taxonomia, prevalência e transmissão**. 1984. Dissertação de Mestrado (Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, Seropédica, 108 p.

BARA, M. A.; SERRA-FREIRE, N. M. 1985. Aspectos epidemiológicos da infecção por tripanossomas em *Hypostomus punctatus* Valenciennes, 1840 (Osteichthyes, Loricariidae) no lago Açú da UFRRJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, **7** (2): 46-49.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, **24** (4): 655–681.

BIENEK, D. R.; BELOSEVIC, M. 1997. Comparative assessment of growth of *Trypanosoma danilewskyi* (Laveran & Mesnil) in medium containing fish or mammalian serum. **Journal of Fish Diseases**, **20**: 217-221.

BOTELHO, J. C. 1907. Sur deux nouveaux trypanosomes de poissons. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie**, **59**: 128-129.

BOTERO, A.; THOMPSON, C. K.; PEACOCK, C. S.; CLODE, P. L.; NICHOLLS, P. K.; WAYNE, A. F.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. 2013. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, **2**: 77-89.

BOWDEN, T. J.; THOMPSON, K. D.; MORGAN, A. L.; GRATACAP, R. M. L.; NIKOSKELAINEN, S. 2007. Seasonal variation and the immune response: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, **22**: 695-706.

BOWDEN, T. J. 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish & Shellfish Immunology**, **25**: 373-383

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D. C. Kinetoplast DNA minicircle database. 1998. **Parasitology Today**, **14 (11)**: 437-438.

BUA, J.; VOLTA, B. J.; PERRONE, A. E.; SCOLLO, K.; VELÁZQUEZ, E. B.; RUIZ, A. M.; DE RISSIO, A. M.; CARDONI, R. L. 2013. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **7 (10)**: e2476.

BURRESON, E. M.; KARLSBAKK, E. 2007. Multiplication of *Trypanosoma pacifica* (Euglenozoa: Kinetoplastea) in english sole, *Parophrys vetulus*, from Oregon coastal waters. **The Journal of Parasitology**, **93 (4)**: 932-933.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, **83**: 575–583.

CAPELLA-GUTIERREZ, S.; KAUFF, F.; GABALDÓN, T. 2014. A phylogenomics approach for selecting robust sets of phylogenetic markers. **Nucleic Acids Research**, **29**: 1-11.

CAPPS, K. A.; FLECKER, A. S. 2013. Invasive fishes generate biogeochemical hotspots in a nutrient-limited system. **PLoS ONE**, **8(1)**: e54093.

COTTRELL, B. J. 1977. A trypanosome from the plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, **11**: 35-47.

CRUZ, C. M. B. D. F. 1995. **Protozoários parasitas do sangue de *Anguilla anguilla* em Portugal: *Trypanosoma granulorum* (Mastigophora) e *Babesiosoma* sp. (Apicomplexa)**. Tese de Doutorado (Biologia), Universidade do Porto, Portugal, Porto, 188 p.

D'AGOSTO, M.; SERRA-FREIRE, N. M. 1993. Estádios evolutivos de tripanossomas de *Hipostomus punctatus* Valenciennes (Osteichthyes, Loricariidae) em infecção natural de *Batracobdella gemmata* Blanchard (Hirudinea, Glossiphoniidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **10 (3)**: 417-423.

D'ARCHIVIO, S.; COSSON, A.; MEDINA, M.; LANG, T.; MINOPRIO, P.; GOYARD, S. 2013. Non-invasive *in vivo* study of the *Trypanosoma vivax* infectious process consolidates the brain commitment in late infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **7 (1)**: 1-9.

DAVIES, A. J.; MASTRI, C.; ARIYANAYAGAM, M. R.; SAPPALAND, G. K.; WILKINS, T. A. 1992. Simple methods for culturing and preserving *Trypanosoma granulorum* Laveran & Mesnil from european eels (*Anguilla anguilla*). **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, **12 (1)**: 8-10.

DAVIES, A. J.; THORBORN, D. E.; MASTRI, C.; DASZAK, P. 1999. Ultrastructure of culture forms of the eel trypanosome, *Trypanosoma granulorum* Laveran & Mesnil, 1902, exposed to polyamine biosynthesis inhibitors. **Journal of Fish Diseases**, **22**: 285-298.

DAVIES, A. J.; GIBSON, W.; FERRIS, V.; BASSON, L.; SMIT, N. J. 2005. Two genotypic groups of morphologically similar fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. **Diseases of Aquatic Organisms**, **66 (3)**: 215-220.

DITTMAR, J.; JANSSEN, H.; KUSKE, A.; KURTZ, J.; SCHARSACK, J. P. 2014. Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). **Journal of Animal Ecology**, **83**: 744–757.

DOLEZEL, D.; JIRKU, M.; MASLOV, D. A.; LUKES, J. 2000. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **50**: 1943–1951.

DYKOVÁ, I.; LOM, J. 1979. Histopathological changes in *Trypanosoma danilewskyi* Laveran & Mesnil, 1904 and *Trypanoplasma borelli* Laveran & Mesnil, 1902 infections of goldfish, *Carassius auratus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, **2**: 381-390.

ECHODU, R.; SISTROM, M.; BATETA, R.; MURILLA, G.; OKEDI, L.; AKSOY, S.; ENYIOHA, C.; ENYARU, J.; OPIYO, E.; GIBSON, W.; CACCONE, A. 2015. Genetic diversity and population structure of *Trypanosoma brucei* in Uganda: implications for the epidemiology of sleeping sickness and nagana. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **9** (2): e0003353.

EIRAS, J. C.; PAVANELLI, G. C. 1989. *Trypanosoma scrofae* sp. n. (Protozoa, Kinetoplastida) parasitizing *Prochilodus scrofa* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná River. **Revista Ibérica de Parasitologia**, **49**: 111-115.

EIRAS, J. C.; REGO, A. A.; PAVANELLI, G. C. 1989. *Trypanosoma guairaensis* sp. n. (Protozoa, Kinetoplastida) parasita de *Megaloancistrus aculeatus* (Perugia, 1891) (Pisces, Loricariidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **84** (3): 389-392.

EIRAS, J. C.; REGO, A. A.; PAVANELLI, G. C. 1990. *Trypanosoma nupelianus* sp. n. (Protozoa, Kinetoplastida) parasitizing *Rhinelepis aspera* (Osteichthyes, Loricariidae) from Paraná river, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **85** (2): 183-184.

EIRAS, J. C. 1991. Quatro novas espécies de tripanossomas (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes do Rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, **51**: 301-306.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; LUQUE, J. L. 2012. Checklist of protozoan parasites of fishes from Brazil. **Zootaxa**, **3221**: 1–25.

ELLIOTT, J. M.; TULLETT, P. A. 1986. The effects of temperature, atmospheric pressure and season on the swimming activity of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (Hirudinea; Hirudinidae), in a Lake District tarn. **Freshwater Biology**, **16**: 405–415.

ELLIOTT, M.; KUTSCHERA, U. 2011. Medicinal leeches: Historical use, ecology, genetics and conservation. **Freshwater Reviews**, **4**: 21-41.

FAO. Agriculture and Consumer Protection. **A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis**. 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/x0413e04.htm>>. Acesso em: 11 de junho de 2015.

FERMINO, B. R.; PAIVA, F.; SOARES, P.; TAVARES, L. E. R.; VIOLA, L. B.; FERREIRA, R. C.; BOTERO-ARIAS, R.; DE-PAULA, C. D.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P. 2015. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, **4(3)**: 368-378.

FIGUEROA, F.; MAYER, W. E.; LOM, J.; DYKOVÁ, I.; WELLER, M.; PECKOVÁ, H.; KLEIN, J. 1999. Fish trypanosomes: their position in kinetoplastid phylogeny and variability as determined from 12s rRNA kinetoplast sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, **46**: 473-481.

FONSECA, F.; VAZ, Z. 1928a. Novos trypanozomas de peixes brasileiros. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, **3**: 69-94.

FONSECA, F.; VAZ, Z. 1928b. *Trypanosoma francirochai* n. sp. parasito de *Otocinclus francirochai* Ihering, 1928 (peixe de água doce do Estado de São Paulo). **Boletim Biológico**, **11**: 4-5.

FONSECA, F.; VAZ, Z. 1929. Novas espécies de tripanossomas de peixes brasileiros de água doce. **Boletim Biológico**, **13**: 36-41.

FONSECA, F. 1935. Tripanossomas de peixes brasileiros. Descrição de uma nova espécie. **Memórias do Instituto Butantan**, **9**: 151-184.

FRÓES, O. M.; FORTES, E.; LIMA, D. F.; LEITE, V. R. V. 1978. Três espécies novas de tripanossomas de peixes de água doce do Brasil (Protozoa, Kinetoplastida). **Revista Brasileira de Biologia**, **38**: 461-468.

FRÓES, O. M.; FORTES, E.; LIMA, D. F.; LEITE, V. R. V. 1979. Tripanossomas (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes de água doce do Brasil. II Novos tripanossomas de cascudos (Pisces, Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**, **39**: 425-429.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. 2005. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/search.php>>. Acesso em: 22 de abril de 2013.

FUJIMOTO, R. Y.; NEVES, M. S.; SANTOS, R. F. B.; SOUZA, N. C.; COUTO, M. V. S.; LOPES, J. N. S.; DINIZ, D. G.; EIRAS, J. C. 2013. Morphological and hematological studies of *Trypanosoma* spp. infecting ornamental armored catfish from Guamá River-PA, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **85(3)**: 1149-1156.

GIBSON, W.; BINGLE, L.; BLENDAMAN, W.; BROWN, J.; WOOD, J.; STEVENS, J. 2000. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **107 (2)**: 269–277.

GIBSON, W. C.; LOM, J.; PECKOVÁ, H.; FERRIS, V. R.; HAMILTON, P. B. 2005. Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using SSU rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. **Parasitology**, **130 (4)**: 405-412.

GIBSON, W. 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. **International Journal for Parasitology**, **37**: 829–838.

GREIF, G.; RODRIGUEZ, M.; REYNA-BELLO, A.; ROBELLO, C.; ALVAREZ-VALIN, F. 2015. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. **Mutation Research**, **773**: 69-82.

GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; LOSEV, A.; KOSTYGOV, A. Y.; LUKES, J.; YURCHENKO, V. 2014. High prevalence of trypanosome co-infections in freshwater fishes. **Folia Parasitologica**, **61**: 495-504.

GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; GONG, X. 2007a. Redescription of *Trypanosoma siniperca* Chang 1964 from freshwater fish of China based on morphological and molecular data. **Parasitology Research**, **100 (2)**: 395-400.

GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; KE, X.; GONG, X. 2007b. Morphological and genetic differences of *Trypanosoma* in some Chinese freshwater fishes: difficulties of species identification. **Parasitology Research**, **101 (3)**: 723-730.

GU, Z.; WANG, J.; ZHANG, J.; LI, M.; KE, X.; GONG, X. 2007c. Ultrastructure of the bloodstream forms of the fish trypanosome *Trypanosoma pseudobagri* Dogiel et Achmerov, 1959. **Acta Protozoologica**, **46**: 139-45.

GU, Z.; WANG, J.; KE, X.; LIU, Y.; LIU, X.; GONG, X.; LI, A. 2010. Phylogenetic position of the freshwater fish trypanosome, *Trypanosoma ophiocephali* (Kinetoplastida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **Parasitology Research**, **106 (5)**: 1039-1042.

GUPTA, N. 2006. Historical review of piscine trypanosomiasis and survey of Indian *Trypanosoma*. **Journal of Parasitic Diseases**, **30 (2)**: 101-115.

GUPTA, N.; GUPTA, D. K. 2012. Erythropenia in piscine trypanosomiasis. **Trends in Parasitology Research**, **1**: 1-6.

HAYES, P. M.; LAWTON, S. P.; SMIT, N. J.; GIBSON, W. C.; DAVIES, A. J. 2014. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. **Parasites and Vectors**, **7**: 50.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, **66 (4)**: 411-453.

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HORTA, P. 1910. *Trypanosoma chagasi* n. sp. parasito de *Plecostomus punctatus*. **Brasil-medico**, **24**: 273.

HORTA, P.; MACHADO, A. 1911. Estudos citológicos sobre o "*Trypanosoma chagasi*" n. sp. encontrado em peixes do gênero *Plecostomus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **3**: 344-366.

IBAMA. **Lista de espécies permitidas**. [2008?]. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-recursos-pesqueiros/lista-de-especies-permitidas>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2015.

INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. **Óleo de cravo: um anestésico alternativo para o manejo de peixes**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2007.

ISLAM, A. K. M. N.; WOO, P. T. K. 1991a. Anemia and its mechanism in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**, **11 (1)**: 37-43.

ISLAM, A. K. M. N.; WOO, P. T. K. 1991b. Anorexia in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**, **11 (1)**: 45-48.

ISLAM, A. K.; WOO, P. T. 1992. Effects of temperature on the in vivo and in vitro multiplication of *Trypanosoma danilewskyi* Laveran et Mesnil. **Folia Parasitologica**, **39 (1)**: 1-12.

- JOERINK, M.; FORLENZA, M.; RIBEIRO, C. M. S.; DE VRIES, B. J.; SAVELKOUL, H. F. J.; WIEGERTJES, G. F. 2006. Differential macrophage polarisation during parasitic infections in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, **21**: 561-571.
- JONES, S. R. M.; WOO, P. T. K. 1990. The biology of *Trypanosoma phaleri* n. sp. from bowfin, *Amia calva* L., in Canada and the United States. **Canadian Journal of Zoology**, **68 (9)**: 1956-1961.
- JONES, S. R. M.; WOO, P. T. K. 1991a. Development and infectivity of *Trypanosoma phaleri* in leech and fish hosts. **Canadian Journal of Zoology**, **69 (6)**: 1522-1529.
- JONES, S. R. M.; WOO, P. T. K. 1991b. Culture characteristics of *Trypanosoma catostomi* and *Trypanosoma phaleri* from North American freshwater fishes. **Parasitology**, **103**: 237-243.
- JONES, S. R. M.; WOO, P. T. K. 1992. Vector specificity of *Trypanosoma catostomi* and its infectivity to freshwater fishes. **The Journal of Parasitology**, **78 (1)**: 87-92.
- KARLSBAKK, E.; HAUGEN, E.; NYLUND, A. 2005. Morphology and aspects of growth of a trypanosome transmitted by the marine leech *Johanssonia arctica* (Piscicolidae) from Northern Norway. **Folia Parasitologica**, **52 (3)**: 209-215.
- KARLSBAKK, E.; NYLUND, A. 2006. Trypanosomes infecting cod *Gadus morhua* L. in the North Atlantic: a resurrection of *Trypanosoma pleuronectidium* Robertson, 1906 and delimitation of *T. murmanense* Nikitin, 1927 (emend.), with a review of other trypanosomes from North Atlantic and Mediterranean teleosts. **Systematic Parasitology**, **65**: 175–203.
- KELLY, S.; IVENS, A.; MANNA, P. T.; GIBSON, W.; FIELD, M. C. 2014. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. **Scientific Data**, **1**: 1-7.
- KHAN, R. A. 1976. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. **Canadian Journal of Zoology**, **54 (11)**: 1840-1849.
- KHAN, R. A. 1985. Pathogenesis of *Trypanosoma murmanensis* in marine fish of the northwestern Atlantic following experimental transmission. **Canadian Journal of Zoology**, **63 (9)**: 2141-2144.

KLINGBEIL, M. M.; DREW, M. E.; LIU, Y.; MORRIS, J. C.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. 2001. Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. **Protist**, **152**: 255-262.

KOLESNIKOV, A. A.; JIRKU, M.; PECKOVÁ, H.; POLÁK, A.; MASLOV, D. A.; LUKES, J. 1995. Analysis of kinetoplast DNA of freshwater fish trypanosomes. **Folia Parasitologica**, **42 (4)**: 251-254.

LEMOS, M. 2012. **Tripanossomas de peixes brasileiros: isolamento, caracterização ultraestrutural e taxonomia**. Tese de Doutorado (Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, Rio de Janeiro, 145 p.

LEMOS, M.; SOUTO-PADRÓN, T. 2014. Isolation and in vitro maintenance of trypanosomes from naturally infected and commercially important Brazilian fish. **Journal of Parasitology**, **100 (5)**: 687-691.

LEMOS, M.; FERMINO, B. R.; SIMAS-RODRIGUES, C.; HOFFMANN, L.; SILVA, R.; CAMARGO, E. P.; Teixeira, M. M. G.; SOUTO-PADRÓN, T. 2015. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. **Parasites and Vectors**, **8**: 573.

LETCH, C. A. 1977. Leech (*Hemiclepsis marginata*) as vector of fish trypanosomes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **71**: 380-381.

LETCH, C. A.; BALL, J. 1979. Prevalence of *Trypanosoma cobitis*, Mitrophanow, 1883 in fishes from the river Lee. **Parasitology**, **79**: 119-124.

LETCH, C. A. 1980. The life-cycle of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow 1883. **Parasitology**, **80 (1)**: 163-169.

LEWIS, J. W.; BALL, S. J. 1980. Ultrastructure of the epimastigotes of the fish trypanosome *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1883, in the crop of the leech vector, *Hemiclepsis marginata*. **The Journal of Parasitology**, **66**: 948-53.

LIMA, L. 2011. **Diversidade genética, morfológica e biológica, relações filogenéticas e taxonomia de tripanossomas (Trypanosomatidae: Trypanosoma) de morcegos do Brasil e Moçambique (África)**. Tese de Doutorado (Ciências), Universidade de São Paulo, Brasil, São Paulo, 57 p.

LOM, J. Biology of trypanosomes and trypanoplasms of fish. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Orgs.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. p. 269-337. 2 v.

LOPES, R. A.; SATAKE, T.; BRENTGANI, L. G.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A.; RIBEIRO, R. D. 1989. Trypanosomes of brazilian fishes. III. *Trypanosoma dominguesi* sp. n. from armored catfish *Hypostomus alatus* Castelnau1855 (Pisces, Loricariidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, **64**: 83-88.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; NUTI SOBRINHO, A. ; GARCIA, T. A. R. 1990a. Trypanosomes of brazilian fishes. II. *Trypanosoma barrettoi* sp. n. from *Hypostomus paulinus* (Siluriformes, Loricariidae). **Angewandte Parasitologie**, **31**: 11-14.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; BRITSKI, H. A. 1990b. Tripanossomos de peixes brasileiros. XII. *Trypanosoma saadi* sp. n. encontrado no bagre *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard 1824 (Pisces, Pimelodidae) do rio Ribeira de Iguapé, município de registro, estado de São Paulo, Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **12**: 269-276.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; GARCIA, T. A. R. 1991a. Trypanosomes of brazilian fishes. VII. *Trypanosoma britskii* sp. n. from the sword-armored catfish *Loricaria lentiginosa* Isbrücker, 1979 (Pisces, Loricariidae). **Acta Parasitologica Polonica**, **36 (1)**: 1-3.

LOPES, R. A.; LOPES, O. V. P.; RIBEIRO, R. D.; ALBUQUERQUE, S.; SATAKE, T.; GARAVELLO, J. C. 1991b. *Trypanosoma* of brazilian fishes. XI. *Trypanosoma valerii* sp. n. from *Pterodoras granulosus* Valenciennes 1833 (Pisces, Doradidae). **Naturalia**, **16**: 19-24.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; LEME DOS SANTOS, H. S.; OLIVEIRA, C.; ZUIM, S. M. F.; SATAKE, T. 1992a. Trypanosomes of brazilian fishes. X. *Trypanosoma garavelloei* sp. n. from *Rhamdia hilarii* Valenciennes 1840 (Pisces, Pimelodidae). **Revista Regional de Ciências**, **1 (1)**: 109-113.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; GARAVELLO, J. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T. Tripanossomos de peixes brasileiros. XIX. *Trypanosoma vallei* n. sp. encontrado em *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae) do córrego Laureano, município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. In: 44<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992b. p. 742-743.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; ZUIM, S. M. F.; GARAVELLO, J. C.; CARRARO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; SATAKE, T. Tripanossomos de peixes brasileiros. XX. *Trypanosoma affonsoi* n. sp. encontrado no cascudo *Hypostomus tietensis* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae), do rio Piracicaba, localidade de Santa Maria da Serra (Represa de Barra Bonita), estado de São Paulo, Brasil. In: 44ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44ª Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992c. p. 744-745.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; GARAVELLO, J. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; LOPES, O. V. P.; SATAKE, T. Tripanossomos de peixes brasileiros. XXII. *Trypanosoma watanabei* sp. n. encontrado em *Pterygoplichthys lituratus* Kner 1864 (Pisces, Loricariidae), do rio Tocantins, localidade de Itaguatins, estado de Goiás, Brasil. In: 44ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44ª Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992d. p. 748-749.

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; BRENTGANI, L. G.; WATANABE, I.; SOARES, T. R. S.; BAHLS, A. S. 1993a. Tripanossomos de peixes brasileiros. XV. *Trypanosoma salae* sp. n. encontrado na traíra *Hoplias malabaricus* Bloch 1794 (Pisces, Erythrinidae), do rio Paraná, município de Porto Rico, estado do Paraná, Brasil. **Revista Regional de Ciências, 2 (1): 115-122.**

LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; COSTA, J. R. V.; SATAKE, T.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A. 1993b. Trypanosomes of brazilian fishes. XVII. *Trypanosoma camposi* sp. n. from the catfish *Pimelodus maculatus* Lacépère 1803 (Pisces, Pimelodidae), from Furnas dam, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, 15: 47-52.**

LUCKINS, A. G. **Methods for diagnosis of trypanosomiasis in livestock**. 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/FEEDback/War/u6600b/u6600b0a.htm>>. Acesso em: 11 de junho de 2015.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot Cell, 1 (4): 495-502.**

MALOVIC, I.; HEMMINGSEN, W.; MACKENZIE, K. 2010. Trypanosome infections of marine fish in the southern Barents Sea and the invasive red king crab *Paralithodes camtschaticus*. **Marine Pollution Bulletin, 60 (12): 2257–2262.**

MARTINS, M. L.; CARDOSO, L.; MARCHIORI, N.; PÁDUA, S. B. 2015. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, **24 (1)**: 1-20.

MASLOV, D. A.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **75 (2)**: 197-205.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96 (3)**: 397-402.

MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, J.; LUKES, J. 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, **29 (1)**: 43-52.

MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. 2006. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 ITS-1 do DNA ribossômico nas espécies do cluster Buzzatii de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). **Ambiência**, **2 (1)**: 89-96.

MCGHEE, R. B.; CROSGROVE, W. B. 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological Reviews**, **44 (1)**: 140-173.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **54**: 1861-1875.

MOREIRA, O. C.; RAMÍREZ, J. D.; VELÁZQUEZ, E.; DIAS MELO, M. F. A.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A.; BRITTO, C. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta Tropica**, **125 (1)**: 23-31.

MUIEED, M. A.; CHAUDHARY, Z. I.; SHAKOORI, A. R. 2010. Comparative studies on the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) and microscopic examination for the detection of *Trypanosoma evansi* in horses. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, **34 (6)**: 507-512.

NEIVA, A.; PINTO, C. 1926. Contribuição para o estudo dos hematozoários do Brasil. **Annaes da Faculdade de Medicina de São Paulo**, **1**: 79–82.

NUTI-SOBRINHO, A.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; RIBEIRO, R. D.; GARCIA, T. A. R.; GARAVELLO, J. C. 1987. Tripanossomos de peixes brasileiros. I. *Trypanosoma satakei* n. sp. encontrado em bagres *Rhamdia quelen* capturados na represa da usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo. **Ars Veterinaria**, **3**: 263-268.

OLADIRAN, A.; BELOSEVIC, M. 2009. *Trypanosoma carassii* hsp70 increases expression of inflammatory cytokines and chemokines in macrophages of the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, **33**: 1128–1136.

OLADIRAN, A.; BELOSEVIC, M. 2010. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis. **Developmental and Comparative Immunology**, **34**: 396–405.

OLADIRAN, A.; BELOSEVIC, M. 2012. Recombinant glycoprotein 63 (Gp63) of *Trypanosoma carassii* suppresses antimicrobial responses of goldfish (*Carassius auratus* L.) monocytes and macrophages. **International Journal for Parasitology**, **42**: 621-633.

OLSEN, O. W. **Animal Parasites**. Baltimore: University Park Press, 1974.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal**, **7 (1)**: 113-123.

OVERATH, P.; RUOFF, J.; STIERHOF, Y. D.; HAAG, J.; TICHY, H.; DIKOVÁ, I.; LOM, J. 1998. Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma carassii*, a common parasite of freshwater fish. **Parasitology Research**, **84 (5)**: 343-347.

OVERATH, P.; HAAG, J.; MAMEZA, M. G.; LISCHKE, A. 1999. Freshwater fish trypanosomes: definition of two types, host control by antibodies and lack of antigenic variation. **Parasitology**, **119**: 591-601.

PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M.; SATAKE, F.; JERÔNIMO, G. T.; PILARSKI, F. 2011. First record of *Trypanosoma* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) in tuvira (*Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*) in the Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **20 (1)**: 85-87.

- PATERSON, W. B.; WOO, P. T. K. 1984. Ultrastructural studies on mitosis in *Trypanosoma danilewskyi* (Mastigophora: Zoomastigophora). **Canadian Journal of Zoology**, **62**: 1167-1171.
- PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. 2014. Molecular markers in phylogenetic studies - A review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, **2(2)**: 1-9.
- PHILIPPE, H.; BRINKMANN, H.; LAVROV, D. V.; LITTLEWOOD, D. T. J.; MANUEL, M.; WÖRHEIDE, G.; BAURAIN, D. 2011. Resolving difficult phylogenetic questions: Why more sequences are not enough. **PLoS Biology**, **9(3)**: e1000602.
- PRESTON, T. M. 1966. In vitro cultivation of *Trypanosoma rajae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 10.
- PRESTON, T. M. 1969. The forms of the cytostome-cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiiae* Laveran & Mesnil. **Journal of Protozoology**, **16**: 320-33.
- QVARNSTROM, Y.; SCHIJMAN, A. G.; VERON, V.; AZNAR, C.; STEURER, F.; DA SILVA, A. J. 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **6 (7)**: e1689.
- RANGEL, T. F.; DINIZ, J. A. F.; BINI, L. M. 2010. SAM: A comprehensive application for spatial analysis in macroecology. **Ecography**, **33**: 46-50.
- RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRENTGANI, L. G.; BRITSKI, H. A.; LOPES, R. A. 1989. Trypanosomes of brazilian fishes. IV. *Trypanosoma lopesi* sp. n. from armored catfish *Rhinelepis aspera* Agassiz 1829 (Teleostei, Loricariidae). **Zoologischer Anzeiger**, **222**: 244-248.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A. 1990a. Trypanosomes of brazilian fishes. VIII. *Trypanosoma itoi* sp. n. from armored catfish *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), from Moji-Guaçu river, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. **Ciência e Cultura**, **42**: 1192-1195.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A. 1990b. Trypanosomes of brazilian fishes. IX. *Trypanosoma pinto* sp. n. from armored catfish *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), from Mogi-Guaçu river, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, **50**: 559-562.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; BRITSKI, H. A. 1991. Trypanosomes of brazilian fishes. XIII. *Trypanosoma birmani* sp. n. from *Hypostomus comersonii* Valenciennes 1840 (Pisces, Loricariidae), from Ribeira de Iguapé river, SP, Brazil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **13 (2)**: 75-84.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; GARAVELLO, J. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T.; GARCIA, T. A. R. Tripanossomos de peixes brasileiros. XVIII. *Trypanosoma brenteganii* sp. n. encontrado no cascudo *Hypostomus emarginatus* Valenciennes (Pisces, Loricariidae), do rio Tocantins, localidade de Itaguatins, estado de Goiás, Brasil. In: 44ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44ª Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992a. p. 740-741.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; GARAVELLO, J. C.; SATAKE, T.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A. Tripanossomos de peixes brasileiros. XXIV. *Trypanosoma vasconcelosi* sp. n. encontrado em *Pterygoplichthys multiradiatus* Hancock 1828 (Pisces, Loricariidae), do rio Tocantins, localidade de Itaguatins, estado de Goiás, Brasil. In: 44ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44ª Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992b. p. 750.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SANTOS, H. S. L.; OLIVEIRA, C.; ZUIM, S. M. F.; WATANABE, I.; GARCIA, E. L. 1993a. Trypanosomes of brazilian fishes. VI. *Trypanosoma nutii* sp. n. from pacú-caranha *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Pisces, Serrasalminidae). **Revista Regional de Ciências**, **2**: 109-114.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; COSTA, J. R. V. 1993b. Tripanossomos de peixes brasileiros. XIV. *Trypanosoma pradoi* n. sp. em *Hypostomus ancistroides* Ihering 1901 (Pisces, Loricariidae), capturado no córrego Laureano, município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, **15**: 37-45.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. **Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: ICMBio, 2005. 2 v.

ROSENBLATT, J. E. 2009. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. **Medical Microbiology** **49**: 1103-1108.

SATAKE, T.; RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; BRENTGANI, L. G.; WATANABE, I.; SOARES, T. R. S.; BAHLS, A. S. Trypanosomes of brazilian fishes. XXI. *Trypanosoma costae* sp. n. from piapara *Leporinus elongatus* Valenciennes 1849 (Pisces, Anostocuidae), from Paraná river, municipality of Porto Rico, state of

Paraná, Brazil. In: 44<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1992, São Paulo. **Anais da 44<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC**. São Paulo: 1992. p. 746-747.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. 2002. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. **Clinical Microbiology Reviews**, **15 (3)**: 374-389.

SILVA, R. N. 2009. **Leishmaniose visceral: estudo da carga parasitária em cães submetidos a tratamento com miltefosine (hexadecilfosfocolina)**. Dissertação de Mestrado (Ciências e Saúde), Universidade Federal do Piauí, Brasil, Teresina, 67 p.

SILVA, T. M. F.; OLINDA, R. G.; RODRIGUES, C. M. F.; CÂMARA, A. C. L.; LOPES, F. C.; COELHO, W. A. C.; RIBEIRO, M. F. B.; FREITAS, C. I. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; BATISTA, J. S. 2013. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research**, **44**: 1.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. 2000. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **97**: 6986–6993.

SIMPSON, A. G. B.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W.; ROGER, A. J. 2004. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. **Protist**, **155**: 407-422.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **TRENDS in Parasitology**, **22**: 168-174.

SPLENDRE, A. 1910. Trypanosomes de poissons brésiliens. Bulletin de la Société de pathologie **Exotique**, **3**: 521-524.

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, **15 (11)**: 432-437.

STEVENS, J. R. 2008. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, **15 (3)**: 226-232.

STOHLMAN, V.; MASTRIGHT, G.; KAZAN, B. H. 1973. Diffusion of nutrients in a biphasic medium for the cultivation of trypanosomes. **Zeitschrift für Parasitenkunde-Parasitology Research**, **41**: 231–238.

SU, Y.; FENG, J.; JIANG, J.; GUO, Z.; LIU, G.; XU, L. 2014. *Trypanosoma epinepheli* n. sp. (Kinetoplastida) from a farmed marine fish in China, the Brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). **Parasitology Research**, **113 (1)**: 11-18.

TANDON, R. S.; JOSHI, B. D. 1973. Studies on the physiopathology of blood of fresh water fishes infected with two new forms of trypanosomes. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie**, **185**: 207-221.

THOMSON, J. D. 1908. Cultivation of the trypanosome found in the blood of the gold-fish. **Journal of Hygiene**, **8**: 75-82.

VALENTIN, P. 1841. Ueber ein entozoon in blute von *Salmo fario*. **Archives of the Anatomy and Physiology Wiss. Medicine**: 435-436.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R. N. M.; BENSCH, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. **The Journal of Parasitology**, **94 (6)**: 1395-1401.

VICKERMAN, K. 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, **5 (1)**: 163-193.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Orgs.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. p. 1-30. 1 v.

VISVESVARA, G. S.; GARCIA, L. S. 2002. Culture of protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, **15 (3)**: 327-328.

VOTÝPKA, J.; RÁDROVÁ, J.; SKALICKÝ, T.; JIRKU, M.; JIRSOVÁ, D.; MIHALCA, A. D.; D'AMICO, G.; PETRZELKOVÁ, K. J.; MODRÝ, D.; LUKEŠ, J. 2015. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. **International Journal for Parasitology**, **45**: 741–748.

WENYON, C. M. Protozoology - **A manual for medical men, veterinarians and zoologists**. London: Baillière, Tindall and Cox, 1926.

WIEGERTJES, G. F.; FORLENZA, M. 2010. Nitrosative stress during infection-induced inflammation in fish: lessons from a host-parasite infection model. **Current Pharmaceutical Design**, **16**: 4194-4202.

WOO, P. T. K. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, **47 (5)**: 921-923.

WOO, P. T. K. 1981. *Trypanosoma danilewskyi*: a new multiplication process for *Trypanosoma* (Protozoa: Kinetoplastida). **The Journal of Parasitology**, **67**: 522-526.

WOO, P. T. K.; BLACK, G. A. 1984. *Trypanosoma danilewskyi*: host specificity and host's effect on morphometrics. **The Journal of Parasitology**, **70**: 788-793.

WOO, P. T. K. Diplomonadida (Phylum Parabasalia) and Kinetoplastea (Phylum Euglenozoa). In: \_\_\_\_\_. **Fish diseases and disorders: protozoan and metazoan infections**. 2. ed. [S.l.]: CAB International, 2006. p. 46-115. 1 v.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104 (7)**: 1051-1054.