JULIANA ISABEL GIULI DA SILVA FERREIRA

**Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero
Trypanosoma em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação
Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais**

São Paulo

2015

JULIANA ISABEL GIULI DA SILVA FERREIRA

Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

De acordo:

Orientador

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3141
FMVZ

Ferreira, Juliana Isabel Giuli da Silva

Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais / Juliana Isabel Giuli da Silva Ferreira. -- 2015.
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. *Trypanosomatidae*. 2. Filogenia. 3. Anfíbios. 4. Marsupiais. 5. Insular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da Ilha Pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais", protocolado sob o nº 2896/2013, utilizando amostras de sangue e fezes de pequenos roedores, quirópteros, anfíbios e répteis, sob a responsabilidade do Dr. Arlei Marcili, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Diversity, isolation and phylogeny of the genus *Trypanosoma* parasites in wild vertebrates Island rain and Ecological Station Pirapitinga, Minas Gerais", protocol number 2896/2013, utilizing samples of blood and feces from small rodents, bats, amphibians and reptiles, under the responsibility Dr. Arlei Marcili, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 4 de agosto de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Juliana Isabel Giuli da Silva

Título: Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais Ivan e Maria Angela e ao meu esposo Ademar, como forma de agradecimento e reconhecimento por todo o apoio e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde;

Agradeço aos meus pais por me apoiarem em minhas decisões e principalmente pelos conselhos;

Ao meu esposo Ademar de Oliveira Ferreira pelo carinho, amizade, incentivo e pelos agradáveis momentos em sua companhia;

Ao meu irmão Marcelo que eu admiro e pela ajuda em momentos importantes;

Ao Dr. Arlei Marcili pela orientação, pela oportunidade e confiança;

Aos professores Dra. Solange Maria Gennari e ao Dr. Marcelo Bahia Labruna pelos ensinamentos no decorrer do trabalho;

A toda equipe e colaboradores da Esec Pirapitinga, em especial João, Albino e Tiago, pela grande ajuda e colaboração

Ao pessoal da biblioteca pela ajuda nas correções da dissertação, em especial a Elza

Faquim e da secretaria da pós graduação, em especial Henrique

A professora Dra. Terezinha Knobl pelo incentivo inicial na área de pesquisa;

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP contribuíram para aprendizado nesta caminhada; Gislene Fournier, Danilo Saraiva, Diego Ramirez, Erick Zambelli, Jairo Roldan, Bruna M. Sampaio, Thiago Martins, Felipe Krawczak, Monize Gerardi, Jonas Filho, Tatiana Ueno, Amália Barbieri, João Fábio, Francisco Costa, pela amizade, companhia, convívio e por proporcionarem um ambiente agradável e especialmente, Andréa P. da Costa pela ajuda direta nesse trabalho;

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Renato, Pedro, Marcos, Hilda, Sheila, Sueli, Danival, Virginia, Cristina, Zenaide ;

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Faculdade de Saúde Pública e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que contribuíram de forma determinante para a minha formação;

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro (Universal n. 470276/2012-6) e a CAPES (bolsa mestrado).

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)**

RESUMO

FERREIRA, J. I. G. S. **Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais.** [Diversity, isolation and phylogeny of the genus *Trypanosoma* parasites in wild vertebrates of island rain and Pirapitinga Ecological Station, Minas Gerais]. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias. A maioria das espécies não é patogênica, *T. cruzi* é a única espécie patogênica para o homem nas Américas. Estudos realizados com algumas espécies de tripanossomas apontam uma grande complexidade do ciclo silvestre. Ressalta-se o fato que existam poucos trabalhos realizados no estado de Minas Gerais em animais silvestres. Até o momento, poucos estudos avaliaram os pequenos mamíferos terrestres e morcegos como reservatórios silvestres destes parasitas neste estado, com ausência de estudos com outros grupos de vertebrados. O presente projeto tem por objetivo principal, o conhecimento da diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em animais silvestres da ilha pluvial e Estação ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais através do isolamento, caracterização molecular e estudos filogenéticos com marcadores tradicionais. Foram realizadas duas campanhas de captura nos meses de outubro de 2013 e março de 2014 totalizando 183 pequenos mamíferos terrestres, de 12 espécies pertencentes, a três diferentes Ordens (*Calomys callosus*, *Cerradomys subflavus*, *Rhipidomys* sp., *Akodon* sp., *Hylaemys megacephalus*, *Delomys* sp., *Oligoryzomys* sp., *Didelphis albiventris*, *Micoreus* sp., *Gracilinanus agilis*, *Monodelphis domestica* e *Cabassous unicinctus*, a espécie mais abundante foi *Calomys* sp, capturados com pitfalls e Shermann. Foram capturados 57 indivíduos de morcegos, com o auxílio de redes de neblina, de seis diferentes espécies (*Glossophaga soricina*, *Artibeus* sp., *Platyrrhinus* sp., *Noctilio albiventris*, *Myotis* sp., *Choeronicus minor*), a espécie mais abundante foi *Glossophaga soricina*.

Todos os quirópteros foram negativos para tripanossomatídeos e dentre os pequenos mamíferos somente oito exemplares da espécie *Monodelphis domestica* foram positivas para o parasita, porém foram estabelecidas nove culturas (um dos animais estava parasitado por duas espécies de tripanossomas). Os isolados de *M. domestica* foram identificados como *T. cruzi* e uma nova espécie com morfologia distinta, mas agrupada nas filogenias com SSU rDNA e gGAPDH no Clado Lagartos/Cobras. Esta nova espécie foi denominada *T. gennarii*. Os anuros e répteis foram capturados através de busca ativa e foram capturados 14 indivíduos de répteis pertencentes a 6 espécies e 88 indivíduos de anuros pertencentes a 4 espécies. Do total de anuros capturados 7 (7,95%) apresentaram hemocultura positivas e 2 (2,27%) de *Leptodactylus latrans* foram estabelecidas e criopreservadas com morfologia compatível a parasitas do gênero *Trypanosoma*. Filogenias baseadas em SSU rDNA segregou os isolados do Cerrado em um novo grupo denominado AN05 e a inclusão destes isolados evidenciaram um outro grupo, AN06 compostos de isolados obtidos de flebotomíneos.

Palavras-chave: *Trypanosomatidae*. Filogenia. Anfíbios .Marsupiais. Insular .

ABSTRACT

FERREIRA, J. I. G. S. **Diversity isolation and phylogeny of the genus *Trypanosoma* parasites in wild vertebrates of island rain and Pirapitinga Ecological Station, Minas Gerais.** [Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da Ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais]. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The species of the genus *Trypanosoma* parasites of all vertebrate classes (Fish, amphibians, reptiles, birds and mammals) and have life cycles alternating between vertebrates and invertebrates. Most species develops in blood-sucking arthropods, which may belong to different orders and families. Most species are not pathogenic, *T. cruzi* is the only species pathogenic to humans in the Americas. Studies with some species of trypanosomes indicate a great complexity of the sylvatic cycle in biomes. We highlight the fact that there are few studies in the state of Minas Gerais in wild animals. To date, few studies have evaluated small terrestrial mammals and bats as wild reservoirs of these parasites in this state, with no studies with other groups of vertebrates. This project's main objective, knowledge of *Trypanosoma* parasites of the genus diversity in wild animals of the rain Island and Ecological Pirapitinga Station, Minas Gerais through isolation, molecular characterization and phylogenetic studies with traditional markers. Two arrest campaigns were conducted between October 2013 and March 2014 totaling 184 small terrestrial mammals, 12 species belonging to three different Orders (*Calomys callosus*, *Cerradomys subflavus*, *Rhipidomys* sp., *Akodon* sp., *Hylaemys megacephalus*, *Delomys* sp., *Oligoryzomys* sp., *Didelphis albiventris*, *Micoreus* sp., *Gracilinanus agilis*, *Monodelphis domestica* e *Cabassous unicinctus*, the most abundant species was *Calomys callosus*, captured with pitfalls and Shermann. The bats were captured with mist net and caught 57 individuals from six different species (*Glossophaga soricina*, *Artibeus* sp., *Platyrrhinus* sp., *Noctilio albiventris*, *Myotis* sp., *Choeronicus minor*), the most abundant species was *Glossophaga soricina*. All were negative for trypanosomatids bats and small mammals among only eight copies of *Monodelphis domestica* species were positive for the parasite, but nine cultures were established (one animal was

infested by two species of trypanosomes). Isolates of *M. domestica* were identified *T. cruzi* and a new species with distinct morphology, but grouped in phylogenies with SSU rDNA and gGAPDH in Clade Lizards/ Snakes. This new species was named *T.gennarii*. Frogs and reptiles were captured through active search and were captured 14 individuals of reptiles belonging to 6 species of frogs and 88 individuals belonging to four species. Of the total of frogs captured 7 (7,95%) had positive blood culture and 2 (2.27%) of *Leptodactylus latrans* were established and cryopreserved with morphology compatible with the parasites of the genus *Trypanosoma*. Phylogenies based on SSU rDNA segregated the Cerrado isolated in a new group called AN05 and the inclusion of these isolates showed another group of compounds AN06 isolates from sand flies.

Keywords: *Trypanosomatidae*. Phylogeny. Amphibians. Marsupials. Insulate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa de localização das áreas de coleta	28
Figura 2 -	A máxima parcimônia e árvore Bayesiana inferida a partir de sequências de genes SSU rDNA de 48 tripanossomas com <i>T. avium</i> como grupo externo (827 caracteres; 296 sites de parcimônia-informativo) que foi usado para a máxima parcimônia e inferência Bayesiana. Números em nós são os valores de suporte para os principais ramos (probabilidade de bootstrap / posteriori; 500 repetições). As sequências obtidas neste estudo estão em negrito	34
Figura 3 -	A. Microscopia de luz de <i>Trypanosoma gennarii</i> . Microfotografias (Giemsa-coradas) de cultura em LIT de <i>Trypanosoma gennarii</i> . nov. Formas epimastigotas com cinetoplasto (C), núcleo (N), flagelo livre (F), membrana ondulante (MO) indicado nas setas (a-c). Formas tripomastigotas metacíclicas de fase estacionária (d). B. Microscopia eletrônica de varredura de <i>T. gennarii</i> . Formas epimastigotas (a-d) e formas metacíclicas tripomastigotas com flagelo longo livre (e-f). Barra de escala 10µm. C. Microscopia eletrônica de transmissão em <i>T. gennarii</i> . Fase logarítmica e estacionária de formas epimastigota (a, b, c). Organização ultra-estrutural, mitocôndrias, núcleo e cinetoplasto comum para <i>Trypanosoma</i> (a-c). Cinetoplasto grande e frouxo (d, e). Várias reservossomos (R) (c). Flagelo (F), bem desenvolvidos bolsa flagelar e corpos basais em uma estrutura que abriga o flagelo em formas epimastigotas (f).....	49
Figura 4 -	A máxima parcimônia e árvore Bayesiana inferida a partir de sequências de genes SSU rDNA. Números em nós são os valores de suporte para os principais ramos (probabilidade de bootstrap / posteriori; 500 repetições). As sequências obtidas neste estudo estão em destaque	50
Quadro 1 -	Espécies de tripanossomas, hospedeiros e origem geográfica das sequencias utilizadas nas análises filogenéticas	29

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Hospedeiros e positividade para tripanossomas dos anuros examinados neste estudo	31
Tabela 2 - Espécies de hospedeiros e hemocultura positiva em pequenos mamíferos examinados	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CBT	Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTUs	unidades discretas de digitação
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
gGAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITS	“internal transcribed sequence”
kDa	kilodalton
LIT	“liver infusion tryptose”
LPS	lipopolissacarídeos
M	molar
mM	milimolar
mm	milímetros
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	cloreto de magnésio
N ₂	nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
pb	pares de bases
PBS	phosphate buffer solution (solução salina tamponada)
PCR	reação em cadeia pela polimerase (“polymerase chain reaction”)
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSU rDNA	subunidade menor do gene ribossômico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TBE	tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TRIS	tris (hidroximetil) amino metano
Tris HCl	tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico
Tris-borato	tris (hidroximetil) amino metano com borato
UI	unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
U.V.	ultravioleta
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
X	vezes
μM	micromolar
μL	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
2	TRIPANOSSOMAS DE ANUROS: RELAÇÕES FILOGENÉTICAS REVELANDO NOVOS CLADOS NO BRASIL	25
2.1	INTRODUÇÃO	26
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.2.1	Área de estudo e animais capturados	27
2.2.2	Isolamento de tripanossomas de anuros	27
2.2.3	Os dados moleculares e análise filogenética	28
2.3	RESULTADOS	30
2.4	DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	36
3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE UMA NOVA ESPÉCIE DE TRIPANOSSOMA, <i>Trypanosoma gennarii</i> sp. nov., EM <i>Monodelphis domestica</i> CAPTURADOS EM UMA ÁREA DE CERRADO BRASILEIRO	40
3.1	INTRODUÇÃO	41
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.2.1	Área e Captura dos pequenos mamíferos silvestres	42
3.2.2	Isolamento e manutenção na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos	43
3.2.3	Caracterização morfológica	44
3.2.4	Análise molecular e filogenética	44
3.3	RESULTADOS	46
3.4	DISCUSSÃO/CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	54
4	CONCLUSÃO GERAL	58
	REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O filo Euglenozoa é um dos maiores grupos de eucariotos, compreendendo os organismos unicelulares flagelados de vida-livre e parasitas de todas as classes de vertebrados, invertebrados e plantas; contendo espécies de parasitas obrigatórios, como as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* que são responsáveis por doenças de grande importância médica humana e veterinária, assim como algumas espécies de *Phytomonas* também podem ser patogênicas., (HOARE, 1972; DOLEZEL et al., 2000; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006).

A ordem Kinetoplastida tem como característica a presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas, localizadas na base do flagelo e que contém o DNA mitocondrial (kDNA). Esta ordem está dividida em duas subordens: Bodonina compreende parasitas e espécies de vida livre e Trypanosomatina que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, cujos membros são todos parasitas e estão posicionados nas árvores filogenéticas em um grande clado de flagelados. (VICKERMAN, 1976; STUART; FEAGIN, 1992; CAVALIER-SMITH, 2004, 2010).

Originalmente, o gênero *Trypanosoma* foi proposto por Gruby (1843) para classificar um hemoflagelado de rã que foi denominado *Trypanosoma sanguinis*. Como o organismo observado apresentava uma estrutura similar a de um parasita descrito alguns meses antes, com o nome de *Amoeba rotatoria* (MAYER, 1843), essa espécie passou a ser classificada como *Trypanosoma rotatorium*.

Os tripanossomatídeos, depois dos nematóides são os eucariotos que apresentam a maior diversidade de hospedeiros (infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens) e distribuição geográfica (VICKERMAN, 1976; STEVENS; RAMBAUT, 2001; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006). Estes parasitas estão divididos em 12 gêneros: parasitas monoxênicos de insetos (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Rynchoidomonas*, *Sergeia*, *Blechomonas*); o gênero *Phytomonas* albergam espécies heteroxênicas de insetos e plantas e ainda os

parasitas, cujos ciclos ocorrem alternância entre hospedeiros invertebrados (vetores) e vertebrados: *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum* (WALLACE, 1966; VICKERMAN, 1976; PODLIPAEV, 1990; CAMARGO, 1998; SVOBODOVÁ et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2011; VOTÝPKA et al., 2013).

Estudos em filogenia, baseados em análises de proteínas e genes mitocondriais, sustentam a hipótese que os organismos mais próximos dos Kinetoplastídeos não são os euglenídeos, e sim, um grupo menos estudado, os diplomonídeos que são protozoários de vida livre ou parasita facultativo de vários invertebrados (MASLOV et al., 1999; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006). Análises semelhantes mostram que dentro dos kinetoplastídeos, os tripanossomatídeos, foi formado um grupo monofilético que divergiu, aparentemente, dos bodonídeos de vida livre (MOREIRA; LOPEZ-GARCIA; VICKERMAN, 2004; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006; DESCHAMPS et al., 2011).

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (mamíferos, peixes, anfíbios, répteis e aves), com ciclos de vida e alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas, flebotomíneos e mosquitos (culicídeos) (FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008).

Hoare (1964) dividiu os parasitas de mamíferos do gênero *Trypanosoma* nas Secções Salivaria e Stercoraria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor. A Secção Salivaria abrange as espécies que no inseto vetor, desenvolvem-se no tubo digestivo e glândulas salivares (exceto *T. vivax* nas Américas), sendo transmitidas com a inoculação, durante a picada do vetor, de formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas glândulas salivares. Esta Secção compreende os subgêneros *Duttonella* (espécie - tipo *T. vivax*), *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Pycnomonas* (*T. suis*) e *Nannomonas* (*T. congolense*), que abrangem todos os tripanossomas africanos patogênicos para mamíferos. *T. vivax* e *T. evansi* adaptaram-se à transmissão mecânica, portanto são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano, inclusive nas Américas. *T. equiperdum* considerado doença

venérea por transmissão direta (HOARE, 1972; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007; STEVENS et al., 2008).

Já a Secção Stercoraria compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (HOARE, 1972), esses se desenvolvem exclusivamente, no tubo digestivo do inseto vetor, sendo transmitidas pela contaminação com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes dos vetores. Os tripanossomas desta Secção apresentam ampla distribuição geográfica. No entanto, algumas espécies como *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e *T. rangeli* (*Herpetosoma*) são encontradas apenas nas Américas (HOARE, 1972; GUHL; VALLEJO, 2003; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009). Na grande maioria das espécies desta Secção não é patogênica para seus hospedeiros vertebrados e não infecta o homem, com exceção de *T. cruzi* e poucos casos relatados em humanos de infecção por *T. lewisi*-“like” e *T. rangeli* (SARATAPHAN et al., 2007).

Apenas *Schizotrypanum* se mostrou um grupo monofilético, embora ainda com controvérsias. Os subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* se revelaram polifiléticos, confirmando que os parâmetros taxonômicos tradicionais não são suficientes para classificar os tripanossomas em subgêneros (STEVENS; RAMBAUT, 2001; MAIA DA SILVA et al., 2004a; RODRIGUES et al., 2006). As espécies do subgênero *Schizotrypanum* são morfologicamente indistinguíveis. Porém, enquanto *T. cruzi* parasita uma grande variedade de mamíferos, inclusive morcegos, as demais espécies desse subgênero são exclusivas de morcegos. Os morcegos têm sido encontrados infectados na África, Europa, Ásia e Américas, com diversas descrições no Brasil, por tripanossomas dos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum* (HOARE, 1972; MOLINEUX, 1991).

As espécies de tripanossomas desse gênero apresentam vários estágios, presentes em diferentes combinações, no sangue e/ou tecidos nos hospedeiros vertebrados/ invertebrados. As formas comumente encontradas são: amastigota, epimastigota, tripomastigota e, raramente, promastigota em seus ciclos de vida. Tais formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994). As formas tripomastigotas são encontradas

nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos). As outras formas são espécies dependentes, ou seja, ocorre nos vertebrados (amastigostas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas). O local de desenvolvimento e diferenciação das formas infectantes nos invertebrados determina a via de transmissão dos tripanossomas, podendo ser o tubo digestivo ou as glândulas salivares (HOARE, 1972).

A espécie tipo do subgênero *Schizotrypanum* é o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas humana, com ocorrência restrita ao continente americano e com evidências que esses tripanossomas são patogênicos para primatas não humanos. Contudo, não se tem evidências que sejam patogênicos para outros animais silvestres (mais de 110 espécies de várias ordens descritas infectadas). Os morcegos, são espécies de vida longa e a infecção por *T. cruzi* pode persistir por anos, foram relatados parasitas na musculatura esquelética, cardíaca e do estômago (GARDNER; MOLYNEUX, 1988; MAIA DA SILVA et al., 2008; MARCILI et al., 2009a). Grande parte dos morcegos infectados é insetívora, devendo a infecção ocorrer principalmente, por via oral após a ingestão dos vetores infectados que habitam palmeiras, fendas em árvores e rochas, cavernas, forros de residências e tocas de animais (MARINKELLE, 1976).

Trypanosoma cruzi é formado por populações altamente heterogêneas que diferem em características biológicas (comportamento em triatomíneos e vertebrados), patológicas (virulência, mortalidade, tropismo celular), clínicas (formas cardíaca, digestiva, megassíndromes), bioquímicas e moleculares (MILES; FELICIANGELI; ARIAS, 2003; BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003; ZINGALES et al., 2012). De acordo, com os pesquisadores a grande variabilidade genética comprovada com diferentes marcadores moleculares, fez com que fosse adotado a nomenclatura de cepas do *T. cruzi* em seis genótipos (TcI -TcVI) (ZINGALES et al., 2009; 2012; TIBAYRENC; AYALA, 2013) e o genótipo identificado como Tcbat (restrito a morcegos) (MARCILI et al., 2009a). *T. cruzi* é mais relacionado a *T. cruzi marinkellei* do que a *T. dionisii*. Estas três espécies compartilham recursos morfológicos, biológicos, genômica e proteômica, no entanto, se diferem em hospedeiros, vetores e patogenicidade (STEVENS et al., 1999; MARCILI et al., 2009a; CAVAZZANA et al., 2010).

Há três ciclos de transmissão vetorial de *T. cruzi*: a) exclusivamente silvestre (raramente envolve o homem); b) doméstico, envolve o homem, animais domésticos e silvestres do peridomicílio e triatomíneos domiciliados e c) peridoméstico, com a sobreposição dos ciclos silvestre e domiciliar. Pessoas infectadas são encontradas do México até região central da Argentina e Chile. Como enzootia, a tripanossomíase americana é mais amplamente distribuída do que a infecção humana, estendendo-se do Sul dos USA até o Sul da Argentina e do Chile (MILES; FELICIANGELI; ARIAS, 2003).

A confirmação dos tripanossomas como grupo monofilético evidenciou agrupamentos chave nesse gênero que foram apoiados por diversos estudos (STEVENS; RAMBAUT, 2001; VIOLA et al., 2009a; DESCHAMPS et al., 2011). Como resultado, as interferências filogenéticas mais recentes dividiram os tripanossomas em diversos clados (HAMILTON et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a).

O clado Aquático é composto por dois subclados, um deles formado por tripanossomas isolados de peixes e de ornitorrinco, provavelmente transmitidos por sanguessugas aquáticas. O outro subclado formado pelos tripanossomas de anuros, aparentemente, transmitidos por flebotomíneos (JAKES; O'DONOGHUE; ADLARD, 2001; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007; FERREIRA et al., 2008). O clado Squamata é formado por alguns tripanossomas de lagartos e serpentes transmitidos por insetos flebotomíneos (HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a). Clado *T. avium* / *T. corvi*, formado por tripanossomas de aves, aparentemente sem restrição pela espécie hospedeira e transmitida por inúmeros artrópodes (VOTÝPKA et al., 2012).

O clado *T. theileri*, compreende tripanossomas de mamíferos ungulados da ordem Artiodáctila, bovídeos domésticos (bois, búfalos e ovelhas), silvestres (antílopes) e cervídeos, com grande especificidade pelo hospedeiro vertebrado e transmitido por tabanídeos (RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010). E é formado também, pelo *T. cyclops*, com tripanossomas de macaco da Malásia (*T. cyclops*), um de marsupial australiano *Wallabia bicolor*, um isolado de anuros e diversos de sanguessugas terrestres da família Haemadipsidae da Austrália. A presença de sanguessugas nesse grupo

sugere que estes sejam seus principais vetores (WEINMAN, 1972; HAMILTON et al., 2005a).

Clado *T. lewisi* composto por tripanossomas encontrados, principalmente, nas ordens Lagomorpha, Rodentia e Insetivora além de representar o grupo de tripanossomas do subgênero *Herpetosoma* é transmitido por pulgas e possuem especificidade por hospedeiro vertebrado (como coelhos, primatas e humanos). (HAMILTON et al., 2005b; SARATAPHAN et al., 2007; MAIA DA SILVA et al., 2010). Clado *T. brucei*, formado por tripanossomas de mamíferos de origem exclusivamente africana foi associado à transmissão pelas moscas tsé-tsé (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON et al., 2008; VAN DEN BOSSCHE et al., 2010). Clado *T. grayi*, abrange tripanossomas de crocodilianos na África e Américas (VIOLA et al., 2009b).

O clado *T. cruzi* é formado pelos tripanossomas exclusivos de morcegos do novo e velho mundo (*T. dionisi*, *T.c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. livingstonei*) e também pelo *T. conorhini* (ratos), um isolado de canguru da Austrália e um isolado de macaco sul americano. *T. rangeli* e *T. rangeli-like* formam um grupo mais relacionado com as espécies de *Schizotrypanum* (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007). O clado dos Tripanossomas australianos é composto por isolados de koala e marsupiais (THOMPSON; GODFREY; THOMPSON, 2014). O clado *T. terrestris* formado por isolados no Brasil, de *Tapirus terrestris* (ACOSTA et al., 2013).

O conhecimento a cerca da variabilidade genética de Tripanossoma em diversas localidades, podem ajudar na preservação da fauna e a compreender a história natural e evolutiva dos tripanossomatídeos. No estado de Minas Gerais existem poucos trabalhos sobre a ocorrência de parasitas do gênero Trypanosoma. Foi reportado *T. vivax* em bovinos (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010), *T. melophagium* em ovinos (COSTA et al., 1983) e *T. lewisi* em *Rattus norvegicus* (LINARDI; BOTELHO, 2002). Diversos abordam a ocorrência de *T. cruzi* em triatomíneos e mamíferos (*Calomys callosus* e *Didelphis albiventris*) (FERNANDES et al., 1991; DIOTAIUTI et al., 1995; VILLELA et al., 2010) e diversas espécies de triatomíneos. Estudos realizados com *T. cruzi*, através de microsatélites, evidenciaram a predominância do grupo TCII em humanos e triatomíneos em Minas Gerais (FREITAS et al., 2006). Estes estudos são escassos e

contemplam somente algumas espécies de mamíferos, não contemplam outras espécies de vertebrados.

Com o intuito de contribuir para o conhecimento sobre a riqueza e a diversidade de espécie de tripanossomatídeos, este estudo foi conduzido na Estação Ecológica de Pirapitinga (ESEC Pirapitinga) que é uma ilha formada pelo represamento das águas do Alto Rio São Francisco, localizado no município de Três Marias. A vegetação predominante é o Cerrado, sendo estimado como um hotspots mundial de biodiversidade de fauna e flora. O levantamento preliminar das espécies de mamíferos presentes na ESEC Pirapitinga de fevereiro de 2008 registrou a presença de 28 espécies. Destas, cinco se encontram ameaçados de extinção no Brasil (MACHADO et al., 1998): o tatu-canastra (*Priodontes maximus*), o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachiurus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e a onça-parda (*Puma concolor*), mas não há estudos da biodiversidade de microrganismos associados a animais na ilha.

Estudos abrangentes com diversos grupos de vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos) são necessários para o real entendimento de biodiversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* no estado de Minas Gerais. Assim, os poucos trabalhos realizados não abrangem o isolamento, caracterização molecular/morfológica e posicionamento filogenético destes parasitas, provenientes de diversos hospedeiros. Além disso, estudos realizados com populações insulares e que geograficamente impossibilitam o tráfego de animais, favorecem eventos de especiação nos hospedeiros vertebrados e nenhum estudo, até o momento, avaliou estes processos em hemoparasitas do gênero *Trypanosoma*.

2 TRIPANOSSOMAS DE ANUROS: RELAÇÕES FILOGENÉTICAS REVELANDO NOVOS CLADOS NO BRASIL

RESUMO

Tripanossomas de anuros e peixes pertencendo ao Clado Aquático que incluem espécies de isolados de peixes, anfíbios, tartarugas e ornitorrincos, conhecidamente transmitidos por sanguessugas e flebotomíneos. Os tripanossomas de anuros brasileiros são do mesmo grupo e parecem ter padrões coevolutivos com hospedeiros vertebrados e associação com biomas brasileiros (Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia). Neste estudo foram caracterizados os tripanossomas de anuros em duas diferentes áreas do bioma Cerrado, com base em relações filogenéticas do gene SSU rDNA. Em um total de 112 anuros de 6 espécies foram mensurados a prevalência de tripanossomas, através de hemocultura, foi encontrado 7% (8 animais positivos). Contudo, somente 3 (2,7% do total), foi possível o isolamento e a criopreservação, com representantes das duas localidades. A análise filogenética foi realizada incluindo sequências de SSU rDNA, a partir de estudos anteriores separando os tripanossomas de anuros em 6 grupos. Anteriormente foram relatados An01 a An04 e neste estudo An05 a An06. O Clado An05 compreende os isolados de *Leptodactylus latrans* e *Pristimantis* sp capturados no bioma Cerrado e também *Trypanosoma chattoni*. A inclusão do novo isolado em análise filogenética evidenciou um novo grupo (AN06) de parasitas de hospedeiros flebotomíneos. Os resultados indicam que a diversidade de espécies de tripanossomas ainda é subestimada, dado pelos poucos estudos realizados no Brasil e em outras regiões do mundo. Os anuros são um grupo extremamente diversificado e mais estudos devem ser realizados para compreender a diversidade e relações filogenéticas de tripanossomas deste grupo e seus hospedeiros.

2.1 INTRODUÇÃO

Tripanossomas são protozoários flagelados hemoparasitas que infectam todas as classes de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), com o ciclo de vida envolvendo alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos que podem pertencer a diferentes ordens e famílias, enquanto que os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos sugadores de sangue (GRUBY, 1943; HOARE, 1972; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007). *Trypanosoma rotatorium* (MAYER, 1843) isolado de *Pelophylax esculentus* L. (= *Rana esculenta*) é a primeira espécie descrita no gênero *Trypanosoma* por Gruby, 1843. Tripanossomas de anuros apresentam alta diversidade morfológica e genética e são geralmente, mais complexos e polimórficos que tripanossomas de mamíferos (BARDSLEY; HARMSEN, 1973; FERREIRA et al., 2007).

Tradicionalmente, as relações filogenéticas de *Trypanosoma* spp. baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH separaram espécies em diferentes clados, como demonstrado em associação com hospedeiros, origem geográfica e biologia do hospedeiro (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON et al., 2004; MARCILI et al., 2013). O clado Aquático inclui espécies de tripanossomas isolados de peixes, anfíbios, tartarugas e ornitorrincos conhecidamente transmitidos por sanguessugas e flebotomíneos (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON et al., 2004; FERREIRA et al., 2008). Tripanossomas de anuros brasileiros são agrupados dentro da clado Aquático juntamente com outras espécies de tripanossomas de anuros, onde parece haver padrões coevolutivos com hospedeiros vertebrados e em associação com os biomas brasileiros (Mata Atlântica, Pantanal e Floresta Amazônica), embora as lacunas de amostragem sejam enormes (FERREIRA et al., 2007; 2008).

Neste estudo, foram isolados e criopreservados tripanossomas de anuros em duas diferentes áreas do bioma Cerrado. Os novos isolados foram caracterizados molecularmente com base no gene rRNA e as relações com os outros tripanossomas de anuros do Brasil foram inferidas a partir de análises filogenéticas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo e animais capturados

Os anuros foram capturados em duas áreas do Bioma Cerrado: na reserva indígena da etnia Tapirapé, município de Confresa (10°38'22"S, 51°34'08"W), estado do Mato Grosso (temperatura anual média 27°C; precipitação anual maior que 1.800 mm), e uma ilha formada pelo represamento do rio São Francisco para a construção do reservatório da hidrelétrica Três Marias. Essa ilha foi transformada em área de conservação (Estação Ecológica de Pirapitinga), no município de Morada Nova de Minas (18° 20'S- 18°23'S e 45°17'W - 45°20'W), estado de Minas Gerais (temperatura média anual de 22 °C; precipitação anual 1.300 mm) (Figura 1). Foram utilizadas a “captura manual” e armadilhas pitfall para capturar os anuros em duas viagens de campo (dez dias) em outubro de 2013 e março de 2014. Os anuros foram identificados utilizando chaves de identificação e descrições originais. As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca. Alguns exemplares de anuros foram eutanasiados e conservados em álcool 70% para posterior fixação em formol a 10%, para depósito em coleções de museus herpetológicos e no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram capturados e manipulados de acordo com as recomendações do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio IBAMA) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brasil.

2.2.2 Isolamento de tripanossomas de anuros

Para o isolamento dos tripanossomas, a partir de amostras de sangue de anuros foram inoculadas em tubos Vacutainer contendo um meio bifásico que consiste de 15% de sangue de ovelha desfibrinado como a fase sólida BAB (base de Agar de

sangue), recobertas por meio LIT líquido suplementado com soro fetal bovino (SFB), a 20% em temperatura ambiente (25-30°C) (MARCILI et al., 2013). Formas epimastigotas de culturas positivas foram utilizadas para infectar monocamadas de células de inseto (SF9), em frascos de 25 cm², mantidos em meio TC100 contendo 10% de SFB a 28°C. Os isolados foram criopreservados em nitrogênio líquido na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos, CBT), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP. As amostras primárias (sangue) foram fixadas em etanol 100% para a detecção molecular.

Figura 1- Mapa de localização das áreas de coleta

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015).

2.2.3 Os dados moleculares e análise filogenética

O DNA foi extraído das amostras de cultura de tripanossomas, utilizando o método de fenol-clorofórmio e as amostras de partida (sangue) foram purificadas utilizando o

sistema DNA Assistente Clean-Up (Promega, Madison, EUA). As amostras de DNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região de barcoding para tripanossoma (V7 V8 do SSU rDNA) (MARCILI et al., 2013). Os produtos de PCR do tamanho esperado foram purificados e sequenciados num sequenciador automático (ABI Prism 310). As sequências nucleotídicas foram geradas depositada no GenBank (Quadro 1).

As sequências recém-geradas foram alinhadas com sequências previamente determinadas para outras espécies de tripanossomas, disponíveis no GenBank (Quadro 1), utilizando ClustalX (THOMPSON et al., 1997) e foram ajustadas manualmente usando GeneDoc (NICOLAU et al., 1997). O alinhamento foi usado para construir árvores filogenéticas usando máxima parcimônia, como implementado no PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002), com 500 réplicas de bootstrap e análise Bayesiana utilizando MrBayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), com 1.000.000 repetições. O primeiro de 25% das árvores representadas "burn-in" e as árvores restantes foram utilizados para calcular probabilidades de Bayesiana a posteriori.

Quadro 1 - Espécies de tripanossomas, hospedeiros e origem geográfica das sequências utilizadas nas análises filogenéticas

(Continua)				
Espécies de Tripanossomas	Código do Isolado	Hospedeiro	Origem geográfica	Nº acesso SSU rDNA
Tripanossomas de Anuros				
<i>T. ranarum</i> (Lankester, 1871)	...	<i>Lithobates pipiens</i> (Schreber)	EUA	AF119810
<i>T. neveulemairei</i> Brumpt, 1928	...	<i>Rana cf. esculenta</i> (Linnaeus)	Iugoslávia	AF119809
<i>T. therezieni</i> Brygoo, 1963	...	<i>Chamaeleo brevicornis</i> (Günther)	África	AJ223571
<i>T. mega</i> Dutton & Todd, 1903	...	<i>Amietophrynus regularis</i> (Reuss)	Congo	AJ223567
<i>T. fallisi</i> Martin & Desser, 1990	...	<i>Anaxyrus americanus</i> (Holbrook)	Canadá	AF119806
<i>T. rotatorium</i> Mayer, 1843	...	<i>Lithobates catesbianus</i> (Shaw)	Canadá	AJ009161
<i>T. rotatorium</i> Mayer, 1843	...	<i>Lithobates catesbianus</i> (Shaw)	EUA	U39583
<i>T. chattoni</i> Mathis & Leger, 1911	...	<i>Lithobates pipiens</i> (Schreber)	EUA	AF119807
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC305	<i>Trachycephalus typhonius</i> (Linnaeus)	Brasil	EF457286
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC315	<i>Trachycephalus typhonius</i> (Linnaeus)	Brasil	EF457287
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC358	<i>Phyllomedusa</i> sp.	Brasil	EU021235
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC406	<i>Scinax ruber</i> (Laurenti)	Brasil	EU021236
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC444	<i>Leptodactylus chaquensis</i> Ceil	Brasil	EF457288
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC646	<i>Aplastodiscus leucopygius</i> (Cruz & Peixoto)	Brasil	EF457285
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC660	<i>Scinax hayii</i> (Barbour)	Brasil	EU267075
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC322	<i>Rhinella schneideri</i> (Werner)	Brasil	EF457289
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC346	<i>Rhinella hoogmoedi</i> Caramaschi & Pombal	Brasil	EF457292
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC362	<i>Rhinella margaritifera</i> (Laurenti)	Brasil	EF457293
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC858	<i>Rhinella icterica</i> (Spix)	Brasil	EF457290
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC339	<i>Rhinella marina</i> (Linnaeus)	Brasil	EF457294
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC364	<i>Rhinella marina</i> (Linnaeus)	Brasil	EF457295
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC398	<i>Leptodactylus pentadactylus</i> (Laurenti)	Brasil	EF021227
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC399	<i>Rhinella margaritifera</i> (Laurenti)	Brasil	EU021233
<i>Trypanosoma</i> sp.	TryCC408	<i>Pristimantis gr. lacrimosus</i> (Jimenez de la Espada)	Brasil	EU021224
<i>Trypanosoma</i> sp.	CBT06 ^a	<i>Pristimantis</i> sp.	Brasil	KP019969
<i>Trypanosoma</i> sp.	CBT175 ^a	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen)	Brasil	KP019970
<i>Trypanosoma</i> sp.	CBT177 ^a	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen)	Brasil	KP019971

(Conclusão)				
Espécies de Tripanossomas	Código do Isolado	Hospedeiro	Origem geográfica	Nº acesso SSU rDNA
Tripanossomas de flebotomíneos				
<i>Trypanosoma</i> sp.	101	<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte)	Brasil	EU021242
<i>Trypanosoma</i> sp.	103	<i>Evandromyia infraspiosa</i> Mangabeira	Brasil	EU021237
<i>Trypanosoma</i> sp.	120	<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte)	Brasil	EU021243
<i>Trypanosoma</i> sp.	887	<i>Sciopemyia</i> sp.	Brasil	EU021245
<i>Trypanosoma</i> sp.	1155	<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte)	Brasil	EU021244
<i>Trypanosoma</i> sp.	IKAZ/ SKF32	<i>Phlebotomus kazeruni</i> Theodor & Mesghali	Paquistão	AB520638
Tripanossomas de peixes				
<i>T. triglae</i> Neumann, 1909	...	<i>Trigla lineata</i> Gmelin	Senegal	U39584
<i>T. boissoni</i> Ranque, 1973	...	<i>Zanobatus atlanticus</i> (Chabanaud)	Senegal	U39580
<i>T. murmanensis</i> Nikitin, 1927	...	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Linnaeus)	Canadá	DQ016616
<i>T. chelodinae</i> Johnson, 1907	...	<i>Emydura signata</i> (Gray)	Austrália	AF29708
<i>T. binneyi</i> Mackerras, 1959	...	<i>Ornithorhynchus anaticus</i> Dun	Austrália	AJ620565
<i>T. ophioccephali</i> Chen, 1964	...	<i>Channa argus</i> (Cantor)	China	EU185634
<i>T. granulosum</i> Laveran & Mesnil, 1902	...	<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus)	Portugal	AJ620552
<i>Trypanosoma</i> sp.	CLAR	<i>Clarias angolensis</i> Steindachner	África	AJ620555
Tripanossomas de sanguessugas				
<i>T. cobitis</i> Mitrophanow, 1883	...	<i>Hemiclepsis marginata</i> (Müller)	Europa	AJ009143
<i>Trypanosoma</i> sp.	K & A		Reino Unido	AJ009167
Outros Tripanossomas				
<i>T. avium</i> Danilewsky, 1885	...	<i>Corvus frugilegus</i> Linnaeus	República Tcheca	U39578
<i>T. theileri</i> (Laveran, 1902)	...	<i>Bos taurus</i> Linnaeus	Japão	AB007814
<i>T. lewisi</i> (Kent, 1880)	...	<i>Rattus</i> sp.	EUA	AJ223566

^a Sequências determinadas neste estudo e depositado no GenBank estão em negrito
 ... dados desconhecidos

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015).

2.3 RESULTADOS

Um total de 112 anuros de seis espécies foram capturados (Tabela 1). Prevalência de tripanossomas, tal como avaliado através da hemocultura, foi de 7% (n = 8). Hemoculturas positivas foram recuperadas a partir de *Rhinella schneideri*, *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus fuscus* e *Pristimanis* sp., mas apenas três cepas (ex *L. latrans* e *Pristimanis* sp.) foram estabelecidas e criopreservadas na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) (Quadro 1). Os parasitas foram inicialmente cultivados em meios de isolamento bifásico, no entanto, as formas epimastigotas começaram a morrer provavelmente por exigências nutricionais não fornecidos pelo meio de infusão fígado triptose (LIT). Com a transferência de parasitas para a monocamada de células SF9 houve o sucesso de crescimento e

isolamento dos tripanossomas. As amostras primárias (sangue) foram obtidas a partir de apenas 57 anuros, no momento em que a coleta de quantidades suficientes para estudos moleculares foi possível, com prioridade para a hemocultura (possível isolamento do parasita). Todas as amostras foram negativas para DNA barcoding de tripanossomas, incluindo o sangue dos animais positivos.

As sequências de SSU rDNA (região V7- V8), a partir de três isolados recuperados foram alinhadas com sequências de diferentes espécies de tripanossomas do clado Aquático, recuperados do GenBank (Quadro 1). As relações filogenéticas com base em sequências SSU rDNA, inferidas pela parcimônia e análise Bayesiana, corroborou com o clado Aquático e os subclados Peixe e Anura, em topologias congruentes (Figura 2). Espécie de tripanossoma do Clado Anura (máximo apoio em ambas as análises) foi separado em seis grupos, AN01 a AN04, descrito anteriormente por Ferreira et al. (2007). O AN06 compreendendo isolados de flebotomíneos anteriormente incluídas no grupo AN03 (FERREIRA et al., 2008) e An05, um novo clado, foi descoberto no presente estudo. Este último compreende na árvore, os três isolados de tripanossomas de anuros capturados no bioma Cerrado (máximo de nó de suporte), ver (Figura 2); estes (AN05) exibiram divergência intraespecífica de 0,46% e 3,62%, excluindo e incluindo *T. chattoni*, respectivamente. A divergência entre AN05 e as demais grupos dentro do Clado Anura foi 8,19%, 10,28%, 10,86%, 11,98% e 21,25% com AN03, AN06, AN02, AN01 e AN04, respectivamente.

Tabela 1 - Hospedeiros e positividade para tripanossomas dos anuros examinados neste estudo

Hospedeiro			Número de indivíduos	
Ordem	Gênero	Espécie	Examinados/Positivos HE	Total ^a
Anura	<i>Leptodactylus</i>	<i>fuscus</i> ^b	9/1	0
		<i>latrans</i> ^b	12/5	2
	<i>Rhinella</i>	<i>schneideri</i> ^b	66/1	0
		<i>mirandaribeiroi</i> ^c	22/0	0
	<i>Physalaemus</i>	<i>nattereri</i> ^b	1/0	0
	<i>Pristimantis</i>	sp ^c	2/1	1
Total	4	6	112/8	3

^a Total de isolados estabelecidos e criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos(CBT)

^b Espécies capturadas no município de Três Marias, Minas Gerais

^c Espécies capturadas no município de Confresa, Mato Grosso

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015).

2.4 DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO

A determinação de quantos tripanossomas de anuros representam espécies ou linhagens válidas é um assunto longe de ser resolvido. Diferentes autores consideram de forma diferente a validade das espécies e os caracteres morfológicos que devem ser usados para classificar os tripanossomas de anuros (DESSER, 2001; FERREIRA et al., 2007). O polimorfismo em tripanossomas de anuros nas formas sanguíneas é comum, e pode ser morfológicamente similar de acordo, com diferentes origens geográficas ou hospedeiros (DESSER, 2001; MARTIN et al., 2002; LEMOS et al., 2008). Mais de 70 tripanossomas de anuros são descritos mundialmente. No entanto, as diferentes regiões do mundo estão longe de serem amostrados de forma adequada, os isolados são difíceis de serem obtidos e a detecção do parasita é difícil ou imprecisa por causa dos baixos níveis de infecção e a inadequação de marcadores moleculares para a exploração da diversidade e estudos filogenéticos.

Muitos estudos filogenéticos têm posicionado os tripanossomas de anuros no clado Aquático, juntamente com tripanossomas de peixes, tartarugas e ornitorrinco transmitidas por sanguessugas (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON et al., 2004; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006; FERREIRA et al., 2007; BARTLETT-HEALY et al., 2009; PAPARINI et al., 2014). No entanto, tripanossomas de anuros também pode ser transmitidos por sanguessugas terrestres (HAMILTON et al., 2005), flebotomíneos (FERREIRA et al., 2008) e mosquitos (BARTLETT-HEALY et al., 2009). No Brasil, tripanossomas de anuros de diferentes biomas são encontrados e segregados em quatro subgrupos (AN01-AN04) em relação a outras espécies da América do Norte, Europa e África, com base em análises filogenéticas (FERREIRA et al., 2007). Isolados brasileiros desses grupos parece estar relacionado com diferentes espécies de hospedeiros e / ou biomas (Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia) (FERREIRA et al., 2007). As amostras provenientes de anfíbios capturados no bioma Cerrado nunca foram incluídas em uma análise filogenética; estes foram separados em um novo subgrupo que denominamos AN05. Os isolados de flebotomíneos anteriormente incluídas no AN03 (FERREIRA et al., 2008) foram segregados em subgrupo AN06. Os grupos AN01 a AN04 foram

recuperadas e sua posição dentro dos tripanossomas de anuros e dentro da clado Aquático foi confirmada.

Os subgrupos no clado Anuro não exibem uma clara associação com diferentes fatores que podem interferir e explicar a evolução do grupo. Estudos anteriores realizados por Ferreira et al. (2007, 2008) sugerem uma associação com os diferentes biomas estudados (Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica) e / ou famílias de hospedeiros. Os resultados do nosso estudo também sugerem uma associação com o bioma de origem, por causa da diferenciação do grupo AN05 separado de hospedeiros capturados no bioma Cerrado. No entanto, a recuperação do novo grupo AN06 formado por isolados de tripanossomas de flebotomíneos sugere que os padrões evolutivos em tripanossomas de anuros podem ser associados com os vetores / hospedeiros.

Apesar de parecer uma relação entre os tripanossomas de anuros brasileiros e sua origem (biomas brasileiros), as correlações são ainda frágeis devido a grandes lacunas de amostragem. Os anfíbios têm distribuições mais restritas, em comparação com outros vertebrados devido a seus nichos restritos e dispersão limitada (SMITH; GREEN, 2005; BUCKLEY; JETZ, 2007). A região Neotropical possui a maior diversidade de anuros do mundo e essa diversidade diminui de áreas molhadas para secas e com a altitude (BUCKLEY; JETZ, 2007). De modo geral, estas espécies podem ser divididas em dois grupos ecológicos, um associado com florestas e o outro associado com formações abertas (HEYER, 1988). No entanto, a variedade de história natural e modos reprodutivos das espécies são muito altas dentro destes grupos e geralmente, relacionadas à especificidade do micro-habitat.

Tripanossomas de Anuros do Cerrado apresentaram diferentes necessidades nutricionais em comparação com os outros grupos já descritos, estes exigiam uma monocamada de células de inseto para o seu desenvolvimento, enquanto os outros grupos foram cultivados em meio LIT, suplementado com soro fetal bovino. O meio LIT foi originalmente descrita para o isolamento de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) e mimetiza as condições encontradas no intestino do inseto (CAMARGO, 1964); este meio tem sido eficaz no isolamento de várias espécies de tripanossomas (FERREIRA et al., 2007; VIOLA et al., 2009 a, b). Hemoculturas podem selecionar o crescimento de diferentes espécies de tripanossomas (MAIA DA SILVA et al., 2009; MARCILI et al., 2013).

Figura 2 - A máxima parcimônia e árvore Bayesiana inferida a partir de sequências de genes SSU rDNA de 48 tripanossomas com *T. avium* como grupo externo (827 caracteres; 296 sites de parcimônia-informativo) que foi usado para a máxima parcimônia e inferência Bayesiana. Números em nós são os valores de suporte para os principais ramos (probabilidade de bootstrap / posteriori; 500 repetições). As sequências obtidas neste estudo estão em negrito

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015).

O subgrupo AN04 compreende espécies de tripanossomas descritas de África, Europa, Ásia e América do Norte, com exceção do *Trypanosoma chattoni* (MATHIS; LEGER, 1911) que foi inserido no grupo AN05. *Trypanosoma chattoni* foi descrito na América do Norte e não tinha sido até agora incluído em outros grupos filogenéticos descritos (FERREIRA et al., 2007, 2008). Apesar da grande variabilidade

morfológica no sangue em cultura de tripomastigotas e de epimastigotas, estes parasitas foram descritos em outros estudos realizados no Brasil, com morfologia semelhante ao *T. chattoni* (FERREIRA et al., 2007; LEMOS et al., 2008).

A posição dos subgrupos de tripanossomas de anuros e suas relações filogenéticas ainda são provisórias. Pois, uma vez que a inclusão de isolados de diferentes origens geográficas (Américas e de outros continentes) e ainda, as espécies de anuros com distintos micro-habitat e vetores, podem mudar as relações e a posição das espécies na filogenia. A ausência de padrões evolutivos claros reflete o pequeno número de espécies ou isolados de tripanossomas de anuros, descritos e compreendidos em estudos filogenéticos, em comparação com alta diversidade de anfíbios e flebotomíneos e outros possíveis vetores. A inclusão de novos isolados brasileiros em análise filogenética revelou uma maior diversidade, em relação a anteriormente conhecida, dentro do clado Anuro. Além do esforço de amostragem, exigências nutricionais representam outro fator importante para o isolamento de tripanossomas de anuros. O uso de novos meios de cultura em associação com monocamadas de células tem aumentado o sucesso de isolamento em conjunto com a avaliação da diversidade dentro do clado Anuro. Outros esforços devem ser concentrados no isolamento de tripanossomas de diferentes espécies de anfíbios e vetores de locais já incluídos na amostra ou diferentes, mas com meios de cultura diferentes dos utilizados em estudos anteriores.

REFERÊNCIAS

BARDSLEY, J. E.; HARMSEN, R. The trypanosomes of anura. **Advances in Parasitology**, v. 2, p.1–73, 1973.

BARTLETT-HEALY K., CRANS, W.; GAUGLER, R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 381-387, 2009.

BUCKLEY, L. B.; JETZ, W. Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. **Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences**, v. 274, p.1167-1173. 2007.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p.93 -100,1964.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 271, p.1251-1262, 2004.

DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **Journal of Parasitology**, v. 87, n.1, p. 152-160. 2001.

FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S. A.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, p.1623–1638. 2007.

FERREIRA, R. C., SOUZA, A., FREITAS, R.A. CAMPANER, TAKATA, C. S. A., BARRETTI, T.V., SHAW, J.J., TEIXEIRA, M. M. G. Phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in brazilian Amazonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n.5, p.427- 445. 2008.

GRUBY, M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie Sciences**, v. 55, p.1134 -1136,1843.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J. ; GIBSON, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal Parasitology**, v. 34, p.1393 -1404. 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.08.011.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751904001894>>. Acesso em: 12 out. 2014.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P. ; GIBSON, W. C. A new lineage of trypanosomes from australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International Journal Parasitology**, v. 35, p.431- 443, 2005.

HAMILTON, P.B., GIBSON, W.C., STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15 - 25, 2007.

HEYER, W. R. On frog distribution patterns east of the Andes. **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**, 1988.

HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, England, p. 748, 1972.

HUELSENBECK, J. P., AND RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754 – 755, 2001.

LEMOES, M. MORAIS, D. H., CARVALHO, V. T. AND D'AGOSTO M. First Record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other trypanosoma species in brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Parasitology**, v. 94, n.1, p.148 - 151, 2008.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI A.; LIMA L.; CAVAZZANA JR. M.; ORTIZ P. A.; CAMPANER M.; TAKEDA G. F.; PAIVA F.; NUNES V. L.; CAMARGO E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from central brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Tropica**, v. 109, p.199 - 207, 2009.

MARCILI, A., COSTA, A. P., SOARES, H. S., ACOSTA, I.C. L., LIMA, J. T. R., MINERVINO, A. H. H., MELO, A. T. L., AGUIAR, D. M., PACHECO, R. C. AND GENNARI, S. M. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from

different biomes in Mato Grosso, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 6, p.1071-1076, 2013.

MARTIN, D.S., WRIGHT, A.D.G., BARTA, J.R., DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant trypanosomes *Trypanosoma chanttoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.3, p.566 - 571, 2002.

NICHOLAS, K.B, NICHOLAS H.B. JR., DEERFIELD, DW II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Embnew news**, v. 4, p.14, 1997.

PAPARINI, A.; MACGREGOR, J.; IRWIN P.J.; WARREN, K.; RYAN, U.M. Novel genotypes of *Trypanosoma binneyi* from wild platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) and identification of a leech as a potential vector. **Experimental Parasitology**, v. 8, n. 145, p. 42 - 50, 2014.

SIMPSON, A.G.B.; STEVENS J.R; LUKES J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p.168-74, 2006.

STEVENS, J.R., NOYES, H.A., SCHOFIELD, C.J., GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p.1 - 56, 2001.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. **Sinauer and Associates, Sunderland**, Massachusetts. 2002.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876 - 4882, 1997.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p.1317-31, 1994.

VIOLA, L. B., ATTIAS, M., TAKATA, C. S., CAMPANER, M., DE SOUZA, W., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 594 - 602, 2009a.

VIOLA, L.B., ALMEIDA, R. S., FERREIRA, R. C., CAMPANER, M., TAKATA, C. S., RODRIGUES, A. C., PAIVA, F., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M. M. Evolutionary history of trypanosomes from south american caiman (*Caiman yacare*) and african crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v.136, p.55 - 65, 2009b.

3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE UMA NOVA ESPÉCIE DE TRIPANOSSOMA, *TRYPANOSOMA GENNARII* SP. NOV., EM *MONODELPHIS DOMESTICA* CAPTURADOS EM UMA ÁREA DE CERRADO BRASILEIRO

RESUMO

Centenas de espécies de tripanossomas já foram descritas em mamíferos de praticamente todas as ordens, em todos os continentes, com inclusive infecções mistas. Os tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, transmitidos por insetos hematófagos associados com os hospedeiros e seus respectivos ecótopos, não sendo patogênica para seus hospedeiros. Neste estudo, os pequenos mamíferos silvestres foram capturados em um fragmento de Cerrado, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Três Marias, região central do estado de Minas Gerais. Foram utilizadas armadilhas de interceptação e queda ("pittfall traps") e armadilhas do tipo gaiolas (Shermman) com diferentes atrativos. Foram capturados 184 animais pertencentes a quatro ordens Didelphimorphia, Rodentia, Chiroptera e Cingulata totalizando 12 espécies. Assim, constituíram capturadas 4 espécies de marsupiais, *Monodelphis domestica*, *Didelphis albiventris*, *Gralicinus agilis* e *Micoureus paraguayanus*. Dentre os marsupiais, somente a espécie *Monodelphis domestica* apresentou oito indivíduos positivos. Porém, foram estabelecidas nove culturas, pois um dos animais estava parasitado por duas espécies de tripanossomas. As amostras de DNA foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para o comprimento completo de genes SSU rDNA e gGAPDH. As sequências foram idênticas entre si com a denominação de *Trypanosoma gennarii* sp. nov. ;apresentaram formas grandes e com uma membrana ondulante bem desenvolvida e um exemplar compatível com *T. cruzi*. A descrição de *Trypanosoma gennarii* em *Monodelphis domestica* atenta, apesar dos muitos estudos conduzidos atualmente, para as lacunas de conhecimento na filogenia e evolução dos tripanossomas e conhecimento dos processos que propiciaram a patogenicidade em espécies como *Trypanosoma cruzi*.

3.1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) com ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados (HOARE, 1972). Centenas de espécies de tripanossomas já foram descritas em mamíferos de praticamente todas as ordens, em todos os continentes, com inclusive infecções mistas (STEVENS et al., 2001). Os tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, transmitidos por insetos hematófagos associados com os hospedeiros e seus respectivos ecótopos, não sendo patogênica para seus hospedeiros (SIMPSON; STEVENS; LUKES et al., 2006; HAMILTON et al., 2004; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007).

Os Metatheria (Marsupiais) são encontrados na Austrália, Nova Guiné, Tasmânia e nas Américas (PALMA, 2003). Nas Américas existem três ordens atuais, Didelphimorphia, Paucituberculata e Microbiotheria, mas a ordem Didelphimorphia é a mais diversa (WILSON; REEDER, 2005). Todas as espécies de marsupiais descritas são potenciais hospedeiros de diferentes espécies de tripanossomas.

Nos marsupiais australianos foram descritas diversas espécies baseadas em estudos morfológicos e filogenéticos. *Trypanosoma copemani* Austen 2009 descrito infectando *Setonix brachyurus* e *Potorous gilbertii*; *Trypanosoma gilletti* McInners 2011 e *Trypanosoma irwini* em koalas (*Phascolarctos cinereus*) McInners 2009; Wallaby (ABF) Hamilton 2004 e *Trypanosoma* sp. (H25) em cangurus Noyes 1999.

No Brasil, foi descrito *Trypanosoma freitasi* Rego, Magalhães & Siqueira 1957 parasitando animais do gênero *Didelphis*, apresentando baixa parasitemia e difícil isolamento; *Trypanosoma saloboense* Lainson, Da Silva & Franco 2008 descrito em *Monodelphis emiliae*; *Trypanosoma samueli* Mello 1977 em *Monodelphis domestica*; e *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* que foram descritos infectando diversas espécies de marsupiais (DEANE, 1972; MAIA DA SILVA et al., 2004). Porém somente, *T. cruzi* e *T. rangeli* foram posicionados em estudos filogenéticos.

Neste estudo foram posicionados em árvores filogenéticas isolados de tripanossomas obtidos de marsupiais silvestres capturados em uma área de Cerrado brasileiro no estado de Minas Gerais. Os estudos evolutivos foram baseados nos genes de SSUrDNA e gGAPDH e complementados com estudos morfológicos

baseado em microscopia óptica de luz e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As discontinuidades morfológicas e biológicas e o posicionamento filogenético propiciaram a descrição de uma nova espécie de tripanossoma em *Monodelphis domestica*, *Trypanosoma gennarii* sp. nov.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Área e Captura dos pequenos mamíferos silvestres

Os pequenos mamíferos silvestres foram capturados em um fragmento de Cerrado, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Três Marias, em uma ilha artificial, com de 1.090ha na região central do estado de Minas Gerais. A Estação Ecológica de Pirapitinga "ESEC" (entre as coordenadas 18°20'S - 18°23'S e 45°17'W - 45°20'W) está localizada no município de Morada Nova de Minas e consiste principalmente de vegetação por elementos arbóreos com até aproximadamente 25m de altura e densidade variável. Na Estação Ecológica ocorrem duas fitofisionomias distintas: florestal e savânica, sendo que a primeira predomina em relação à segunda (AZEVEDO et al., 1987; GIÁCOMO, 2009).

Para a captura dos animais silvestres foram utilizados diferentes métodos de acordo com os grupos pretendidos. Para captura de pequenos mamíferos silvestres foram utilizadas armadilhas de interceptação e queda ("pittfall traps"). Cada armadilha consiste de quatro baldes (30 L) enterrados no solo, com três dispostos como se fossem vértices de um triângulo equilátero e o quarto balde colocado no centro do triângulo. Faixas de lona plástica de 5,0 X 0,5 m ligando os baldes periféricos ao balde central foram fixadas com estacas de madeira. Também utilizamos armadilhas do tipo gaiolas (Shermman) com diferentes atrativos como iscas (mortadela e uma mistura de fubá, sardinha e pasta de amendoim). As armadilhas foram vistoriadas diariamente e os animais capturados foram transportados em sacos de pano. Para a captura de morcegos foram utilizadas

redes de neblina (“mist nest”) com 3,0 X 6,0 m de comprimento, que foram armadas no início do entardecer e mantidas abertas por um período de 5 a 6 horas. Para algumas espécies de morcegos foram realizadas buscas ativas em abrigos e os animais capturados foram transportados em sacos de pano.

Os animais foram identificados com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais. Alguns exemplares de animais cuja identificação da espécie não foi possível no campo de coleta foram eutanasiados, fixados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio IBAMA) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brasil

3.2.2 Isolamento e manutenção na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos

Para o isolamento de tripanossomas, as amostras de sangue obtidas através de punção cardíaca foram inoculadas em tubos Vacutainer contendo um meio bifásico que consiste de 15% de células vermelhas do sangue de ovelha como a fase sólida (base de agar de sangue), recobertas por meio líquido LIT suplementado com SFB a 20% (MARCILI et al., 2013). Os isolados foram criopreservados em nitrogênio líquido na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT), no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. As amostras de sangue foram fixadas em etanol (amostras primários) para a detecção molecular.

3.2.3 Caracterização morfológica

Epimastigotas e Tripomastigotas metacíclicas (10^6 parasitas) foram utilizadas para infectar monocamadas de células de mamíferos (Vero) e J774, que tinham sido cultivadas em meio RPMI, com 10% de FBS a 28°C, e as células de inseto (C6/36 e SF9) cultivado TC100, respectivamente, com 10% de FBS a 28°C. Esfregaços foram confeccionados a partir de culturas em meio LIT nas fases logarítmicas e estacionárias do isolado CBT160 e foram fixados em metanol e corados com Giemsa para microscopia de luz.

Para a microscopia eletrônica de varredura, as culturas cultivadas em células SF9 do CBT 160 foram fixados em Karnovsky (v/v), em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas. Após a fixação, os parasitas foram fixados em 0,1% de poli-L'Lysine em lamelas e foram desidratados numa série ascendente de etanol e acetona (95%), e em seguida, num secador de ponto crítico (Balzers CPD 030). O material processado foi tratado com ouro (usando Sputtering Balzers SCD 050) e foi observado usando um HITACHI TM3000 escaneamento digital microscópio eletrônico, no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, Rio Claro, SP, Brasil.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, após a fixação o material foi pós-fixadas em 1% v/v de tetróxido de ósmio no mesmo tampão e foi contrastada com acetato de uranilo, durante 12 h. A desidratação foi realizada utilizando acetona graduada e embutir era realizada usando resina EPON-araldite durante 12 h a 60°C. Os cortes foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 45 min e 10 min, respectivamente. Em seguida, eles foram observados em um equipamento Philips CM 100 TEM, no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, Rio Claro, SP, Brasil.

3.2.4 Análise molecular e filogenética

O DNA foi extraído das amostras de cultura de tripanossomas usando o método de fenol-clorofórmio e as amostras de sangue primárias (fixados em etanol) foram purificados utilizando o sistema DNA Clean-Up Wizard (Promega). As amostras de

DNA foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para o comprimento completo de genes SSU rDNA e gGAPDH, como previamente descrito (FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008; LIMA et al., 2012). Barcoding *Tripanossoma* foi utilizado para detectar a presença de tripanossomas em amostras primárias (MARCILI et al., 2009a; LIMA et al., 2012; MARCILI et al., 2013). Os produtos de PCR de tamanho esperado foram purificados e seqüenciados em seqüenciador automático (Applied Biosystems / PerkinElmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, Foster City, Califórnia), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas estas seqüências foram recuperados do GenBank (números de acesso: SSU rDNA / gGAPDH): *Herpetomonas samuelpessoai* (U01016 / AF047494), *H. megaseliae* (U01014 / DQ092547), *H. muscarum* (L18872 / DQ092548), *Phytomonas* sp. (AF016322 / AF047496), *Leishmania major* (AF303938 / AF047497), *L. tarentolae* (M84225 / DQ092549), *Crithidia fasciculata* (Y00055 / AF053739), *Leptomonas* sp. Nfm (AF153043 / AF339451), *L. peterhoffi* (AF153039 / AF322390), *Wallaceina brevicula* (AF153045 / AF316620), *Trypanosoma rotatorium* (AJ009161 / AJ620256), *T. Mega* (AJ009157 / AJ620253), *T. fallisi* (AF119806 / AJ620254), *T. binneyi* (AJ132351 / AJ620266), *T. sp. K & A* (AJ009167 / AJ620252), *T. granulosa* (AJ620551 / AJ620246), *T. sp. CLAR* (AJ620555 / AJ620251), *T. terrestris* (KF586846/KF586843); *T. terrestris* (KF586847/KF5868440); *T. terrestris* (KF586848/KF586845); *T. sp. Gecko* (AJ620548 / AJ620259), *T. varani* (AJ005279 / AJ-620261), *T. cascavelli* (EU095837 / FJ236511), *T. serpentis* (EU095839/FJ236512), *T. grayi* (AJ620546 / AJ620258), *T. sp 610* (EU596252 / EU596256), *T. sp 624* (EU596253 / EU596257), *T. sp 1092* (EU596254 / EU596258), *T. vivax* (U22316 / AF053744), *T. brucei rhodesiense* (AJ009142 / AJ620284), *T. evansi* (AJ009154 / AF053743), *T. simiae* (AJ009162 / AJ620293), *T. congolense* (U22318 / AJ620291), *T. sp. AAT* (AJ620557 / AJ620264), *T. avium* torre (U39578 / AJ620262), *T. avium* Tentilhão (AJ009140 / AJ620263), *T. sp. D30* (AJ009165 / AJ620279), *T. theileri* (AJ009164 / AJ620282), *T. ciclops* (AJ131958 / AJ620265), *T. sp. TL. AQ.22* (AJ620574 / AJ620280), *T. sp. ABF* (AJ620564 / AJ620278), *T. sp. H25* (AJ009168 / AJ620276), *T. amazonicus* (KR653210/KR653218); *T. erneyi* (JN040987 / JN040964), *T. erneyi* (JN040988 / JN040965), *T. dionisii* (AJ009151 / AJ620271), *T. cruzi marinkellei* (AJ009150 / AJ620270), *T. cruzi* (AJ009147 / X52898), *T. cruzi* (AJ009149 / AJ620269), *T. rangeli* (AJ009160 / AF053742), *T. rangeli* (minasense) (AJ012413 / AJ620274), *T.*

vespertilionis (AJ009166 / AJ620283), *T. conorhini* (AJ012411 / AJ620267), *T. sp. F4* (AJ620547 / AJ620260), *T. pestanai* (AJ009159 / AJ620275), *T. sp. AAP* (AJ620558 / AJ620277), *T. lewisi* (AJ009156 / AJ620272), *T. sp. R1* (AJ620568 / AJ620281), *T. microti* (AJ009158 / AJ620273), *T. sp. KG1* (AB281091 / FJ649492), *T. gilletti* (GU966588 / GU966587), *T. copemani* (GU966588 / GU966585) e *T. copemani* (AJ620588 / GU966586).

As sequências obtidas foram alinhadas com sequências previamente determinadas para outras espécies tripanossomatídeos disponíveis no GenBank, usando Clustal X Thompson et al., 1997, e foram ajustadas manualmente usando GeneDoc (NICOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997). O SSU rDNA completo e as sequências gGAPDH foram concatenados com os 2905 caracteres. O alinhamento obtido foi utilizado na reconstrução filogenética pelos métodos de máxima parcimônia implementado pelo PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2001) e análise Bayesiana foi realizada utilizando MrBayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Os primeiros 25% das árvores foram excluídas.

3.3 RESULTADOS

Foram capturados 184 animais pertencentes a quatro ordens Didelphimorphia, Rodentia, Chiroptera e Cingulata totalizando 12 espécies (Tabela 2). Foram capturadas 4 espécies de marsupiais, *Monodelphis domestica*, *Didelphis albiventris*, *Gralicinanus agilis* e *Micoureus paraguayanus*.

A ordem Didelphimorphia foi a única que apresentou hemoculturas positivas para tripanossomas com 4,37% (8 animais) de prevalência. Dentre os marsupiais, somente a espécie *Monodelphis domestica* (Tabela 2). Porém, foram estabelecidas nove culturas, pois um dos animais estava parasitado por duas espécies de tripanossomas.

Tabela 2 - Espécies de hospedeiros e hemocultura positiva em pequenos mamíferos examinados

Hospedeiros			Nº de indivíduos	
Ordem	Gênero	Espécie	Examinados/+ HE	Total ^a
Didelphiamorphia	<i>Monodelphis</i>	<i>domestica</i> ^a	18/9	9
	<i>Didelphis</i>	<i>albiventris</i>	9/0	0
	<i>Gracilinanus</i>	<i>agilis</i>	12/0	0
	<i>Micoreus</i>	<i>paraguaianus</i>	12/0	0
Rodentia	<i>Calomys</i>	<i>callosus</i>	92/0	0
	<i>Cerradomys</i>	<i>subflavus</i>	5/0	0
	<i>Hylaemys</i>	<i>megacephalus</i>	11/0	0
	<i>Akodon</i>	sp	18/0	0
	<i>Oligolyzomys</i>	sp	2/0	0
	<i>Delomys</i>	sp	2/0	0
	<i>Rhipidomys</i>	sp	2/0	0
	<i>Cabassous</i>	<i>unicinctus</i>	1/0	0
Cingulata				
TOTAL	12	12	184/9	9

^a Total de isolados estabelecidos e criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT)

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015).

Um isolado apresentou morfologia e comportamento em cultura compatível com o subgênero *Shizotrypanum*, mas os demais isolados apresentaram morfologia e comportamento singulares e bem distintos de *Schizotrypanum*. O isolado CBT 166 apresentou bom crescimento em meio axênico com LIT suplementado com soro fetal bovino e formas epimastigotas e tripomastigotas compatíveis com o subgênero *Schizotrypanum* e foi posteriormente identificada como *Trypanosoma cruzi* (TCIII) através da região de barcoding de tripanossomatídeos e 100% similar com o isolado MT3663 (AF288660).

Os demais isolados apresentaram formas grandes e com uma membrana ondulante bem desenvolvida, mas foram capazes de desenvolverem-se em meios axênicos e estes parasitas foram transferidos para células de mamíferos (Vero) e células de inseto (SF9). Somente os parasitas transferidos para célula SF9 com meio TC100 acrescido de 10% soro fetal bovino cresceram e foram criopreservados.

Os isolados obtidos de *Monodelphis domestica*, *Trypanosoma gennarii*, apresentaram morfologia semelhante e o mesmo desenvolvimento em cultura. Durante a fase estacionária, as formas epimastigotas são grandes, largas e com motilidade do flagelo (Figura 3A. a-c), o cinetoplasto é pontiforme e situado próximo ao núcleo (Figura 3A. a-b). Os tripomastigotas são longos e delgados com um

flagelo bem desenvolvido, o cinetoplasto apresenta-se próximo ao núcleo, porém mais evidente que na forma epimastigota (Figura 3A. d). As formas e estruturas foram evidenciadas e corroboradas nos diferentes métodos de microscopia empregados.

As filogenias obtidas através dos genes SSUrDNA e gGAPDH concatenados e pelos métodos de máxima parcimônia e Bayesiana geraram topologias idênticas e que corroboram as relações filogenéticas descritas para o gênero *Trypanosoma* com os diferentes clados bem suportados (100%) (Figura 1). Todos os isolados de *T. gennarii* possuem sequências de SSUrDNA e gGAPDH idênticas entre si e foram posicionadas no clado Lizard/Snake ((HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a). *Trypanosoma gennarii* agrupou-se com o *T. serpentis* e *T. cascavelli* isolados de serpentes brasileiras (VIOLA et al., 2009a).

Figura 3 - **A.** Microscopia de luz de *Trypanosoma gennarii*. Fotomicrografia (Giemsa-coradas) de cultura em LIT de *Trypanosoma gennarii*. nov. Formas epimastigotas com cinetoplasto (C), núcleo (N), flagelo livre (F), membrana ondulante (MO) indicado nas setas (a-c). Formas tripomastigotas metacíclicas de fase estacionária (d). **B.** Microscopia eletrônica de varredura de *T. gennarii*. Formas epimastigotas (a-d) e formas metacíclicas tripomastigotas com flagelo longo livre (e-f). Barra de escala 10µm. **C.** Microscopia eletrônica de transmissão em *T. gennarii*. Fase logarítmica e estacionária de formas epimastigota (a, b, c). Organização ultra-estrutural, mitocôndrias, núcleo e cinetoplasto comum para *Trypanosoma* (a-c). Cinetoplasto grande e frouxo (d, e). Várias reservossomos (R) (c). Flagelo (F), bem desenvolvidos bolsa flagelar e corpos basais em uma estrutura que abriga o flagelo em formas epimastigotas (f). Aumentos ?????

A

B

C

Fonte: (FERREIRA, J. I. G. S., 2015)

Figura 4 - Árvore filogenética baseada nos genes de SSU rDNA e gGAPDH concatenados de 77 espécies de tripanossomas e outros tripanossomatídeos e *Phytomonas* foi utilizada como grupo externo (2872 caracteres e 224 sítios informativos) que foram utilizados em análises de máxima parcimônia e Bayesiana. Os números dos nós correspondem aos valores de suporte dos ramos principais (bootstrap/ probabilidade a posteriori; 500 replicatas). *T. gennarii* evidenciados na caixa cinza

Taxonomia

Filo Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981

Classe Kinetoplastea Konigberg, 1963

Ordem Trypanosomatidae (Kent 1880) Holande, 1952

Familia Trypanosomatidae Doflein, 1901

***Trypanosoma gennarii* n. sp. Marcili**

Morfologia. Epimastigotas apresentar um longo flagelo livre com motilidade. Morfologicamente eram grandes e largos e exibiu um grande cinetoplasto arredondado posicionado próximo ao núcleo. Flagelados grandes e delgados com um cinetoplasto posterior assemelhando-se formas de cultura tripomastigota metacíclicos, mas essas formas eram muito raras em monocamadas de células. Formas de cultura de tripomastigotas metacíclicos eram representados por tripanossomas grandes e delgados

Hospedeiro tipo. Mammalia, Didelphimorphia, Didelphidae, *Monodelphis domestica*.

Vetor. Desconhecido

Localidade tipo. Os espécimes foram capturados Estação Ecológica de Pirapitinga (18°20'S-18°23'S e 45°17'W-45°20'W) no reservatório da Usina Hidrelétrica de Três Marias e localizada no município de Morada Nova de Minas, estado de Minas Gerais, Brasil.

Material tipo. Hapantótipo, isolado CBT 160. Parátipos, isolados CBT 159, CBT 161, CBT 162, CBT 163, CBT 174, CBT 176 e CBT 178. AS culturas estão depositadas Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos.

Sequências. As sequências de SSUrDNA (GenBank:) e gGAPDH (GenBank:) de *Trypanosoma gennarii* (hapantótipo, CBT 160 e parátipos CBT 161, CBT 162, CBT 163, CBT 174, CBT 176 e CBT 178, respectivamente).

Etimologia. O nome foi dado em honra da Prof. Dra. Solange Maria Gennari, grande pesquisadora da diversidade de protozoários parasitas de animais domésticos e silvestres no Brasil.

3.4 DISCUSSÃO

A grande diversidade descrita de tripanossomas de marsupiais tem origem australiana. Nos últimos anos foram descritas diversas espécies de tripanossomas que parasitam marsupiais e foram inclusas em estudos filogenéticos (NOYES et al., 1999; PAPPARINI et al., 2014 THOMPSON; GODFREY, THOMPSON, 2014). Nas Américas, são descritas *T. cruzi* e *T. rangeli* em uma grande número de espécies de marsupiais e, estas espécies de tripanossomas, foram inclusas em estudos filogenéticos (DEANE, 1972; JANSEN et al., 1991; MAIA DA SILVA, 2004 a, b; MARCILI et al., 2009, 2013). As demais espécies, como *T. freitasi*, *T. saloboense* e *T. samueli*, possuem a descrição morfológica, mas nunca foram posicionados em estudos filogenéticos.

Muitas espécies de tripanossomas que infectam marsupiais possuem requerimentos nutricionais específicos, dificultando o isolamento dos parasitos e subsequentes estudos moleculares e evolutivos. Não foi obtido crescimento de *T. gennarii* em meio axênico, sendo necessário o crescimento em monocamadas de células de inseto. A exigência nutricional de *T. gennarii* propiciou o isolamento de *T. cruzi* em um dos animais capturados e que também estava infectado por *T. gennarii*.

As filogenia baseadas nos genes de SSUrDNA e gGAPDH são eficientes no posicionamento das espécies e gêneros de tripanossomatídeos (HAAG et al., 1998; NOYES et al., 1999; HAMILTON et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; AUSTEN et al., 2009; VIOLA et al., 2009a; MCINNERS et al., 2009, 2011; GARCÍA et al., 2012; LIMA et al., 2012, 2013). As relações filogenéticas dos tripanossomas segregam as espécies em diferentes clados associados aos hospedeiros vertebrados (SIMPSON; STEVENS; LUKES et al., 2006; HAMILTON et al., 2004; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007). Os tripanossomas que infectam marsupiais estavam segregados em três clados, *T. cruzi*, *T. theileri* e Tripanossomas australianos (ACOSTA et al., 2013). Tais clados são compostos por outras espécies de tripanossomas capazes de infectar outras espécies de mamíferos. Neste estudo, *T. gennarii*, foi agrupado no clado composto por espécies que infectam lagartos e cobras no Brasil e na África.

O Clado de Lizard/Snakes (Lagartos/Cobras) é composto por *T. varani* e Trypanosoma sp. Gecko que infectam lagartos e *T. cascavelli* e *T. serpentis* que

parasitam cobras no Brasil (WENYON, 1908; PESSÔA; DE BIASI, 1972; VIOLA et al., 2009a). Morfologicamente, *T. serpentis* possui similaridades com *T. gennarii* nas formas epimastigotas obtidas de cultura. Porém, caracteres morfológicos não possuem grande importância no posicionamento de novas espécies, pois podem acarretar erros taxonômicos.

A inclusão de espécies que parasitam hospedeiros vertebrados bem distintos sugere compartilhamento de vetores. *T. serpentis* e *T. cascavelli* crescem em células de inseto da linhagem HI-5 (VIOLA et al., 2008, 2009a) e *T. gennarii* em células C6/36 e SF9 e indicam que os possíveis sejam insetos (dípteros). Entretanto, hipóteses baseadas em relação ecológicas como a predação podem ser consideradas.

Os marsupiais nas Américas evoluíram de forma isolada e foram capazes de ocupar diversos nichos, como pequenos insetívoros e roedores principalmente (TYNDALE-BISCOE, 2005). Não há registros de ordens de marsupiais anteriores ao Cretáceo tardio (ARCHER; KIRSCH, 2006), mas no início do Terciário todas as linhagens de marsupiais já eram encontradas (TYNDALE-BISCOE, 2005). Estudos baseados em arcadas dentárias e crânios (fósseis) sugerem predação (VALKENBURGH; JENKINS, 2002).

O gênero *Monodelphis* compreende 16 espécies com hábitos terrestres e semi-fossoriais, abrigando-se em tocas (CABRERA; YEPES, 1940; KIRSCH, 1977). As espécies são encontradas em florestas úmidas, cerrados, campos e em regiões semi-áridas como o Caatinga e o Chaco paraguaiano. Sua distribuição geográfica tem como limite o norte do Panamá e estendendo-se até o norte da Argentina (EMMONS; FEER, 1997).

Atualmente, diversas espécies de tripanossomas estão sendo descritas em animais silvestres, em diversas regiões do mundo e no Brasil (GRUBY, 1843; JANSEN et al., 1991; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a; MARCILI et al., 2013; PAPARINI et al., 2014). A descrição de *Trypanosoma gennarii* em *Monodelphis domestica* atentam, apesar dos muitos estudos conduzidos atualmente, para as lacunas de conhecimento na filogenia e evolução dos tripanossomas e conhecimento dos processos que propiciaram a patogenicidade em espécies como *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, I. C. L.; COSTA, A. P.; NUNES, P. H.; GONDIM, M. F. N.; GATTI, A.; ROSSI, J. L.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from atlantic rainforest of southeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 349, 2013.

ARCHER, M.; KIRSH J. **The evolution and classification of marsupials**: A bit of history: 1-21 (en) ARMATI, P.J., DICKMAN, C.R.; HUME, I.D. (eds.) Marsupials. Edimburgo: Cambridge University, 2006.

AUSTEN, J.; JEFFERIES, R.; FRIEND, T.; ADAMS, P.; RYAN, U.; REID, S. Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n.sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (*Potorous gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*). **Parasitology**, v. 136, 2009.

AZEVEDO, L.G. Ensaio Metodologico de identificacao e avaliacao de unidades ambientais na Estacao Ecologica de Pirapitinga/MG. Brasilia: SEMA/EMBRAPA/CPAC. 1987.

CABRERA, A.; J. YEPES, J. Mamíferos Sud-Americanos. Historia Natural Ediar, Compañía Argentina de Editores, Buenos Aires, p. 370, 1940.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**, v. 14, p. 461-481, 1981.

DEANE, L. M.; ALMEIDA, F. B.; NETO, J. A. F.; SILVA, J. E. DA. Trypanosoma cruzi e outros tripanossomas em primatas brasileiros. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 361, 1972.

EMMONS, I. H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals**: A Field Guide. 2. ed. Chicago: University of Chicago Press, p. 307, 1997.

FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S. A.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, p.1623–1638.2007.

FERREIRA, R. C.; DE SOUZA, A. A.; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BARRETT, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 427- 435, 2008.

GARCÍA, L.; ORTIZ, S.; OSORIO, G.; TORRICO, M. C.; TORRICO, F.; SOLARI, A. Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome b sequence and minicircle analyses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36578, 2012.

GIÁCOMO, R.G. Fitossociologia, aporte de serapilheira, estoques de carbono e nitrogênio em diferentes formações vegetais na estação ecológica de Pirapitinga – MG. Rio de Janeiro: UFRJ, 2009.

GRUBY, M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie Sciences**, v. 55, p.1134-1136, 1843.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 37-49, 1998.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammals**: a zoological monograph. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1972, p. 748.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 44, p. 15–25, 2007. doi: 10.1016/j.ympev.2007.03.203. Disponível em: <<http://groups.exeter.ac.uk/eabrg/pdf/hamilton2007.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1393–1404, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.08.011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751904001894>>. Acesso em: 12 out. 2014.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MR BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

JANSEN AM, LEON L, MACHADO GM, DA SILVA MH, SOUZA-LEÃO SM, DEANE MP. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: Parasitological and serological follow-up of the acute infection. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 249-259, 1991.

KIRSCH, J. A. W. The comparative serology of Marsupialia, and a classification of Marsupials. **Australian Journal of Zoology**, Supplementary Series, v. 52, p. 1-152, 1977.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 221, 2013.

LIMA, L.; MAIA DA SILVA, F.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and allied species. **Protist**, v. 163, p. 856-872, 2012.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; TEIXEIRA, M. M. G. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641–655, 2009a. doi: 10.1017/S0031182009005861. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5531824&fileId=S0031182009005861>>. Acesso em: 18 mai. 2014.

MARCILI, A.; COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; MINERVINO, A. H. H.; MELO, A. L. T.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; GENNARI, S. M. Isolation and phylogenetic relationships of bats trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. **Journal of Parasitology**, 2013.

MCINNES, L. M.; GILLET, A.; RYAN, U. M.; AUSTEN, J.; CAMPBELL, R. S.; HANGER, J.; REID, S. A. *Trypanosoma irwini* n.sp. (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) from the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Parasitology**, v. 136, p. 875-885, 2009.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr.; DEERFIELD, D. W. **GeneDoc**: analysis and visualization of genetic variation. *Ebnew News*, v.4, p.14, 1997.

NOYES, H.A., STEVENS, J.R., TEIXEIRA, M., PHELAN, J., HOLZ, P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 331–339, 1999.

PALMA, R. E. Evolution of American marsupials and their phylogenetic relationships with Australian metatherians. In: Jones, M., Dickman, C. & Archer, M. (eds). **Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials**. CSIRO Publishing, 2003.

PAPARINI A.; MACGREGOR J.; IRWIN P.J.; WARREN K.; RYAN U.M. Novel genotypes of *Trypanosoma binneyi* from wild platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) and identification of a leech as a potential vector. **Experimental Parasitology**.v. 8, n.145, 42-50, 2014.

PESSÔA, S. B.; DE BIASI, P. *Trypanosoma cascavelli* sp. n. parasita da cascavel: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 67–70, 1972.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.**Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; GIBSON, W. C. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 669- 676, 1998.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. C. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 1–56, 2001.

SWOFFORD, D. L. **PAUP**: Phylogenetic analysis using parsimony. Beta Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer and Associates, 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignement aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THOMPSON, C. K; GODFREY, S. S.; THOMPSON, R. C. A. Trypanosomes of Australian mammals: a review. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** , v. 3, p. 57–66, 2014.

TYNDALE-BISCOE, H. The life of marsupials. CSIRO Publishing. 2005.

VAN VALKENBURGH; JENKINS, I. Evolutionary Patterns in the History of Permo-Triassic and Cenozoic Synapsid Predators. In: Michael Kowaleswski and Patricia H. Kelley (eds.), The fossil record of predation. **The Paleontological Society papers**, vol. 8, p. 267-288. 2002.

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, A. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, M. R.; GREGO, K. F.; BARRETT, T. V.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by ssu rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 595-605, 2008.

VIOLA, L. B., ATTIAS, M., TAKATA, C. S., CAMPANER, M., DE SOUZA, W., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**.v. 56, p.594-602, 2009a.

WENYON, C. M. 1908. Report of the travelling pathologist and protozoologist. In Third report of the Wellcome Research Laboratories of the Gordon Memorial College. Balfour, Khartoum A. Baillière, Tindall and Cox. London, U.K. p. 121–168, 1908.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (editors). **Mammal Species of the world. A taxonomic and geographic reference** (3rd ed), Johns Hopkins University Press.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A riqueza de animais encontrados em uma área de isolamento foi surpreendente e condiz com os levantamentos feitos anteriormente. Um aumento do esforço de amostragem, de modo a detectar a maior parte das espécies na área exemplo anuros, como rã e sapos e os répteis, como jacarés e serpentes e ainda morcegos piscívoros e insetívoros com rede de neblina na água.

Acredito que a dificuldade sobre algumas espécies de animais aconteceu dado uma seca atípica na época de fevereiro/março/ 2014 devendo ser o período de cheia do reservatório, havendo migração de animais para regiões da ilha que não foi feito o planejamento para coletar nestas áreas.

A inclusão de novos isolados brasileiros em análise filogenética revelaram uma maior diversidade, em relação a anteriormente conhecida, dentro do clado Anuro. Além do esforço de amostragem, exigências nutricionais representam outro fator importante para o isolamento de tripanossomas de anuros. O uso de novos meios de cultura em associação com monocamadas de células tem aumentado o sucesso de isolamento em conjunto com a avaliação da diversidade dentro do clado Anuro.

Outros esforços devem ser concentrados no isolamento de tripanossomas de diferentes espécies de anfíbios e vetores de locais já incluídos na amostra ou diferentes, mas com meios de cultura diferentes dos utilizados em estudos anteriores.

A posição dos subgrupos de tripanossomas de anuros e marsupiais e suas relações filogenéticas ainda são provisórias. A inclusão de novos isolados de diferentes origens geográficas (Américas e de outros continentes) e hospedeiros poderá gerar mudanças nas relações e na posição das espécies na filogenia.

Somente os indivíduos de *M. domestica* foram positivas nas hemoculturas 4,37% (8 animais) de prevalência. Os tripanossomas foram posicionados com *T. cruzi* e uma nova espécie *T. gennarii*.

A descrição de *Trypanosoma gennarii* em *Monodelphis domestica* ressalta, que apesar dos muitos estudos conduzidos atualmente, ainda há lacunas de conhecimento na filogenia e evolução dos tripanossomas e conhecimento dos processos que propiciaram a patogenicidade em espécies como *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L.; COSTA, A. P.; NUNES, P. H.; GONDIM, M. F. N.; GATTI, A.; ROSSI, J. L.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from atlantic rainforest of southeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 349, 2013.
- BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 419-427. 2003.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1998.
- CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D.C.; FACURY FILHO, E. J.; PAES, P. R.; RIBEIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 769-71. 2008.
- CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**, v. 14, p. 461- 481, 1981.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoon root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.
- CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B.**, v. 271, p. 1251-162, 2004.
- CAVAZZANA, J. R. M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; DA SILVA, F. M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 345-355, 2010. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.08.015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751909003701>>. Acesso em: 12 out. 2014.
- COSTA, J. O; LIMA, W.S.; LEITE, A. C. R.; GUIMARAES, M. P.; TORRES, L.D. *Melophagus ovinus* e *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* em ovinos no estado de minas gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 1, p. 101-103, 1983.
- CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.;RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak

of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3–4, 11, p. 320-326. 2010.

DESCHAMPS, P.; LARA, E.; MARANDE, W.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; EKELUND, F.; MOREIRA, D. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. **Molecular Biological Evolution**, v. 28, p. 53-58, 2011.

DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, A.S.; LOIOLA, C.F.; FERNANDES, A.J.; SCHOFIELD, J.C.; DUJARDIN, J.P.; DIAS, J.C.P.; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in minas gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n.4, p. 443-8, 1995.

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

FERNANDES, A.J.; CHIARI, E.; RODRIGUES, R.R.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in bambuí, minas gerais state. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n.1, p. 81- 5, 1991.

FERREIRA, R. C.; DE SOUZA, A. A.; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BARRETT, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 427- 435, 2008.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; MACEDO, C.R.; PENA, S.D.J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Pathogens**. v. 2, n.3, 2006.

GARDNER, R. A.; MOLYNEUX, D. H. Schizotrypanum in British bats. **Parasitology**, v. 97, p. 43–50, 1988.

GRUBY, M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie Sciences**. v. 55, p.1134-1136.1843.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.

HAMILTON, P. B.; ADAMS, E. R.; NJIOKOU, F.; GIBSON, W. C.; CUNY, G.; HERDER, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in african terrestrial mammals. **Infection Genetics Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81-86, 2009.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 44, p. 15–25, 2007. doi: 10.1016/j.ympev.2007.03.203. Disponível em: <<http://groups.exeter.ac.uk/eabrg/pdf/hamilton2007.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1393–1404, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.08.011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751904001894>>. Acesso em: 12 out. 2014.

HAMILTON, P.B.; ADAMS, E.R.; MALELE, II.; GIBSON, W.C. A novel, high-throughput for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 26-33, 2008.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage of trypanosomes from australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 431-43, 2005a.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; HOLZ, P.; BOAG, B.; COOKE, B.; GIBSON, W.C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n.10, p. 3167-75. 2005b.

HOARE, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the Systematics. **Journal Protozoologists**, v. 11, n. 2, p. 200-207, 1964.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammals**: a zoological monograph. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1972, p. 748.

HONIGBERG, B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: LUDVIK, J.; LOM, J.; VAVRA, J. (Ed.). **Progress in protozoology**. New York: Academic Press, p. 68. 1963.

JAKES, K.A.; O'DONOGHUE, P.J.; ADLARD, R.D. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. **Parasitology**, v. 123, n. 5, p. 483-7. 2001.

LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R. Prevalence of *Trypanosoma lewisi* in *rattus norvegicus* from Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.3, p. 411-14, 2002.

MACHADO, A. B. M.; FONSECA, G. A. B.; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S.; LINS, L. V. **Livro vermelho das espécies quase ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. p.608.

MAIA DA SILVA F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.V.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, p. 549-561. 2004a.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; ORTIZ, P.A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAO-DIAS, J. L.; SHAW, J. J.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *lewisi* from domestic rats to primates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 522-9, 2010.

MAIA DA SILVA, F.; NAIFF, R.D.; MARCILI A.; GORDO, M.; D'AFFONSECA NETO, J.A.; NAIFF, M.F.; FRANCO, A.M.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, S.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.; MILES, MA. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging saguinus bicolor (Callitrichidae), a critically endangered primate of the amazon rainforest. **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 168-73. 2008.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; TEIXEIRA, M. M. G. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641–655, 2009a. doi: 10.1017/S0031182009005861. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5531824&fileId=S0031182009005861>>. Acesso em: 18 maio 2014.

MARINKELLE, C. J. Biology of the trypanosomes of bats. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. **Biology of the kinetoplastida**. London: Academic Press, v. 1, p. 175-216. 1976.

MASLOV, D. A.; YASUHIRA, S.; SIMPSON, L. Phylogeny affinities of Diplonema within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. **Protist**, v. 150, n.1, p. 33-42, 1999.

MAYER, A. F. I. C. Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in *Raiis anelectricis* et de haematozois. Bonnae, 1843.

MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; ARIAS, A. R. American trypanossomiasis (chagas' disease) and role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **British medical journal**, v. 326, p.1444-1448, 2003.

MOLYNEUX, D. H. Trypanosomes of bats. In: KREIER, J. P.; BAKER, J. R. (Ed.). **Parasitic protozoa**. 2. ed. London: Academic Press, p. 195-223. 1991.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.

PODLIPAEV, S. A. Catalogue of world fauna of trypanosomatidae (Protozoa). **Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences. Leningrad**, v. 217, p. 1-177, 1990.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215-224, 2006.

RODRIGUES, A.C.; GARCÍA, H.A.; BATISTA, J.S.; MINERVINO, A.H., GOES-CAVALCANTE, G.; MAIA DA SILVA, F.; FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M. M. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. **Parasitology**. v. 137, n.1, p. 111-22, 2010.

SARATAPHAN, N.; VONGPAKORN, M.; NUANSRICHAY, B.; AUTARKOOL, N.; KEOWKARNKAH, T.; RODTIAN, P.; STICH, R. W.; JITTAPALAPONG, S. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1118-1121, 2007.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

STEVENS, J. R.; RAMBAUT, A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. **Infection Genetics and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 143-150, 2001.

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite Journal**, v.15, p. 226–232, 2008.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. Á.; DOVER, G. A.; GIBSON, W. C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, v.118, p. 107-116, 1999.

STUART, K.; FEAGIN, J. E. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. **International Review of Cytology**, v.141, p. 65-88, 1992.

SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOV, L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKES, J.; VOT PKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 423 -432, 2007.

TEIXEIRA, M. M. G.; BORGHESAN, T. C.; FERREIRA, R. C.; SANTOS, M. A.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; MILDER, R. V.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**, v. 162, p. 503-524, 2011.

THOMPSON, C.K.; GODFREY, S.S.; THOMPSON, R.C.A. Trypanosomes of Australian mammals: a review. **International Journal for Parasitology: parasites and wildlife**, v. 3, p. 57–66. 2014.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 29, n.6, p. 264-9. 2013.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae - *Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VAN DEN BOSSCHE P.; DE LA ROCQUE S.; HENDRICKX G.; BOUYER J. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 236-43. 2010.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMDSEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. New York: Academic Press, p. 1-34. 1976.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal of Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317-1331, 1994.

VILLELA, M. M.; RODRIGUES, V.L.C.C.; CASANOVA, C.; DIAS, J.C.D. Análise da fonte alimentar de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) e sua atual importância como vetor do *Trypanosoma cruzi* no Estado de Minas Gerais. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 43, n.2, p. 125-128. 2010.

VIOLA, L. B., ATTIAS, M., TAKATA, C. S., CAMPANER, M., DE SOUZA, W., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analyses based on small subunit

rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p.594-602, 2009a.

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, A. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, M. R.; GREGO, K. F.; BARRETT, T. V.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by ssu rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 595-605, 2008.

VIOLA, L.B., ALMEIDA, R. S., FERREIRA, R. C., CAMPANER, M., TAKATA, C. S., RODRIGUES, A. C., PAIVA, F., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M. M. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v.136, p.55-65, 2009b.

VOTÝPKA J.; SUKOVÁ E.; KRAEVA N.; ISHEMGULOVA A.; DUŽÍ I.; LUKEŠ J.; YURCHENKO V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, p. 763-81. 2013.

VOTÝPKA, J.; SZABOVÁ, J.; RÁDROVÁ, J.; ZÍDKOVÁ, L.; SVOBODOVÁ, M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n.3, p. 745-54. 2012.

WALLACE, F. G. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. New York: Academic Press, p. 213-240, 1979.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 124-193, 1966.

WEINMAN, D. *Trypanosoma cyclops* n. sp.: a pigmented trypanosome from the Malaysian primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 628-636, 1972.

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. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-53, 2012.