IGOR DA CUNHA LIMA ACOSTA

**Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e
Trypanosoma em animais silvestres de uma unidade de
conservação e animais domésticos do seu entorno no
Estado do Espírito Santo**

São Paulo

2013

IGOR DA CUNHA LIMA ACOSTA

Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres de uma unidade de conservação e animais domésticos do seu entorno no Estado do Espírito Santo

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:

Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2013

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.2892
FMVZ

Acosta, Igor da Cunha Lima

Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres de uma unidade de conservação e animais domésticos do seu entorno no Estado do Espírito Santo / Igor da Cunha Lima Acosta. -- 2013.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dr. Arlei Marcili.

1. *Leishmania*. 2. *Trypanosoma*. 3. Cães. 4. Diagnóstico. 5. Animais Silvestres. 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 de parasitas dos gêneros Leishmania e Trypanosoma em animais silvestres de duas unidades de conservação e domésticos de seu entorno no Estado do Espírito Santo", protocolado sob o nº 2566/2012, utilizando amostras biológicas de nº indeterminado de cães e mamíferos silvestres, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, 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 14/3/2012.

We certify that the Research "Diversity of parasites of the genus Leishmania and Trypanosoma in wild animals in two conservation areas and their surroundings in the home state of Espírito Santo", protocol number 2566/2012, utilizing biological samples of unknown number of dogs and wild mammals, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, 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 3/14/2012.

São Paulo, 20 de março de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ACOSTA, Igor da Cunha Lima

Título: Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres de uma unidade de conservação e animais domésticos do seu entorno no Estado do Espírito Santo

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 Sidemar de Lima Acosta e Eliane da Cunha Lima Acosta, 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 irmão Iuri que eu admiro e pela ajuda em momentos importantes;

À minha noiva Luana D'Avila Centoducatte pelo carinho, amizade, apoio, incentivo, apoio e pelos agradáveis momentos em sua companhia e grande ajuda;

Ao Dr. Arlei Marcili pela orientação, pelos ensinamentos e apoio oferecido;

À professora Dra. Solange Maria Gennari pela oportunidade e confiança;

Ao professor Dr. Marcelo Bahia Labruna pelos ensinamentos no decorrer do trabalho e por proporcionar algumas risadas;

Aos professores Dr. João Luiz Rossi Júnior e Dra. Flaviana Guião Leite pelo incentivo inicial a pesquisa;

A toda equipe e colaboradores do projeto Pró-Tapir, especialmente a coordenadora do projeto, Andressa Gatti;

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

Aos amigos Jonas Morales Filho, Tatiana Ueno, Amália Barbieri, Felipe Krawczak, Thiago Martins, Diego Ramirez, João Fabio Soares, Francisco Costa, Ricardo Arrais, Carlos Pruêncio, Mariana Spolidorio, Eveline Zu, Monize Gerardi, e Washington pela amizade, companhia, convívio e por proporcionarem um ambiente agradável, quase que familiar, durante esses anos, especialmente Andréa P. Costa, Herbet Soares e Júlia Lima pela ajuda direta nesse trabalho;

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP que direta ou indiretamente contribuíram para minha adaptação e aprendizado nesta jornada;

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a todos os seus funcionários;

À FAPESP pelo auxílio financeiro processo 2011/15311-6.

RESUMO

ACOSTA, I. C. L. **Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres de uma unidade de conservação e animais domésticos do seu entorno no Estado do Espírito Santo.** [Diversity of parasites of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* in a wildlife conservation area and pets from their surroundings in Espírito Santo]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e as espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos no Velho e Novo Mundo. 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. Os tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, associados com os hospedeiros e seus respectivos ecótopos. A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos. Estudos realizados com algumas espécies de tripanossomas apontam uma grande complexidade do ciclo silvestre em biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica e a diversidade genética de *L. (L.) infantum chagasi* no Brasil ainda não é conhecida. Ressalta-se o fato que existem poucos trabalhos realizados no Estado do Espírito Santo. Até o momento, não foram avaliados os pequenos mamíferos terrestres, grandes mamíferos (*Tapirus terrestris*) e morcegos como reservatórios silvestres destes parasitas neste Estado. O presente estudo tem por objetivo principal, o conhecimento da diversidade de parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres da Reserva Biológica Córrego do Veado e domésticos do seu entorno na cidade de Pinheiros no estado do Espírito Santo através do isolamento, caracterização molecular e estudos filogenéticos com marcadores tradicionais utilizados para o grupo. Foram realizadas duas campanhas de captura nos meses de junho e novembro de 2012 totalizando um esforço de 28800 armadilhas/dia para os pequenos mamíferos terrestres e 12600 h/m² com um total de 157 indivíduos, pertencentes a cinco ordens distintas, 23 gêneros e 27 espécies. Do total de animais capturados 18 (11.46%) apresentaram hemocultura

positivas e 11 (7.01%) culturas foram estabelecidas e criopreservadas com morfologia compatível a parasitas do gênero *Trypanosoma*. Os isolados foram identificados e posicionados através de sequências da região V7V8 SSU rDNA e um isolados de *T. cruzi marinkellei* e oito de *T. dionisii* foram detectados em hospedeiros quirópteros e dois isolados de *Tapirus terrestris* apresentaram morfologia distinta das já descritas para o gênero *Trypanosoma* e a caracterização parcial através do gene 18S rDNA completo e gGAPDH apontam para uma nova espécie deste gênero e tratam-se dos primeiros isolados obtidos nestes hospedeiros. Nos cães, foram obtidas cultura de linfonodo poplíteo bilateral e todos animais foram negativos. Além disso, a análise sorológica também foi negativa para todos os animais domésticos amostrados no entorno.

Palavras-chave: *Leishmania*. *Trypanosoma*. Cães. Diagnóstico. Silvestres.

ABSTRACT

ACOSTA, I. C. L. **Diversity of parasites of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* in a wildlife conservation area and pets from their surroundings in Espírito Santo.** [Diversidade de parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres de uma unidade de conservação e animais domésticos do seu entorno no Estado do Espírito Santo]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The species of the genus *Trypanosoma* parasites of all vertebrate classes (fish, amphibians, reptiles, birds and mammals) and the genus *Leishmania* parasites mammals in the New World and have life cycles with alternating between vertebrates and invertebrates. Most species develops in arthropod vectors, which may belong to different orders and families. Trypanosomes circulating in sylvatic enzootic diseases as associated with the hosts and their ecotopes. Most species are not pathogenic, Visceral Leishmaniasis is an important zoonosis and has wild and domestic canids as important reservoirs known. Studies in some species of trypanosomes show a great complexity of the sylvatic cycle in biomes, including the Atlantic and genetic diversity of *L. (L.) infantum chagasi* in Brazil is not known. We emphasize the fact that there are few studies in the State of Espírito Santo. So far, have not been evaluated small terrestrial mammals, large mammals (*Tapirus terrestris*) and wild bats as reservoirs of these parasites in this state. This study's main objective, knowledge of the diversity of parasites of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* in wild Biological Reserve Stream Deer and domestic of your surroundings in the Pinheiros city in the state of Espírito Santo through isolation, characterization and molecular studies with traditional phylogenetic markers used for the group. There were two campaigns capture in June and November 2012 totaling an effort of 28,800 trap / day for small terrestrial mammals and h.m2 12600 with a total of 157 individuals belonging to five distinct orders, 23 genera and 27 species. Of the total of 18 animals captured (11:46%) had positive blood cultures and 11 (7.1%) cultures were established and cryopreserved with morphology the parasites of the genus *Trypanosoma*. Isolates were identified and positioned through V7V8 region sequences of SSU rDNA and one isolate of *T. cruzi marinkellei* and eight *T. dionisii* hosts were detected in bats and two isolates showed a distinct morphology *Tapirus*

terrestris those already described for the genus *Trypanosoma* and partial characterization by 18S rDNA gene gGAPDH complete and point to a new species of this genus and these are the first isolates from these hosts. In domestic animals, dogs were obtained culture of popliteal lymph node of both hind legs and all animals were negative. Furthermore, serological analysis was also negative for all dogs sampled in the vicinity of the Biological Reserve of Deer Creek.

Keywords: *Leishmania*. *Trypanosoma*. Dogs. Diagnosis. Wild Animals.

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

IgG = Imunoglobulina G

ITS = “Internal Transcribed Sequence”

kDa = Kilodalton

LIT = “Liver Infusion Tryptose”

LT = Leishmaniose Tegumentar

LV = Leishmaniose Visceral

LVC = Leishmaniose Visceral Canina

LPS = Lipopolissacarídeos

M = Molar

mM = Milimolar

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ = Cloreto de Magnésio

N₂ = Nitrogênio

NaCl = Cloreto de sódio

pb = Pares de bases

PBS = Phosphate Buffer Solution (Solução Salina Tamponada)

PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase

pH = Potencial Hidrogeniônico

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta

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 = *Thermus aquaticus*

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	17
1.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE	17
1.2 O GÊNERO <i>Leishmania</i>	18
1.3 O GÊNERO <i>Trypanosoma</i>	20
1.3.1 Filogenia e Evolução das Espécies do Gênero <i>Trypanosoma</i>	22
1.3.2 Subgênero <i>Schizotrypanum</i>	24
1.4 TRIPANOSSOMAS EM PERISSODÁCTILOS	27
1.5 REMANESCENTES FLORESTAIS E TRIPANOSSOMATÍDEOS NO ESPÍRITO SANTO	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 GERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 ÁREA AMOSTRADA	37
4.2 CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	39
4.3 COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO	40
4.4 ISOLAMENTO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS	41
4.5 PRESERVAÇÃO DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS NA COLEÇÃO DE CULTURAS	41
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	42
4.6.1 Extração da Biomassa dos Parasitas	42
4.6.2 Extração das Amostras diretas (sangue e tecidos)	42
4.6.3 Soluções e tampões utilizados	43
4.6.4 Amplificação de DNA por PCR ("Polymerase Chain Reaction")	43
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	44
4.8 PURIFICAÇÃO/SEQUENCIAMENTO	44
4.9 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS	45
4.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA	45
4.10.1 Microscopia óptica	45
4.10.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46

4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	46
4.11 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	47
5 SURVEY OF <i>Trypanosoma</i> AND <i>Leishmania</i> IN WILD AND DOMESTIC ANIMALS IN AN ATLANTIC RAINFOREST FRAGMENT AND SURROUNDINGS IN ESPIRITO SANTO STATE, BRAZIL	50
5.1 INTRODUCTION	50
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	51
5.2.1 Study area and small mammals caught	51
5.2.2 Isolation of trypanossomatids	53
5.2.3 Serologic diagnosis of <i>Leishmania infantum chagasi</i>	53
5.2.4 Molecular and Phylogenetic analysis	54
5.3 RESULTS.....	54
5.4 DISCUSSION	58
ACKNOWLEDGEMENTS	60
REFERENCES	61
6 MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF A NEW SPECIES OF TRYPANOSOME IN <i>Tapirus terrestris</i> (BRAZILIAN TAPIR), <i>Trypanosoma teixeirae</i> SP. NOV., IN ATLANTIC RAINFOREST OF SOUTHEASTERN BRAZIL	67
6.1 INTRODUCTION	67
6.2 MATERIALS AND METHODS.....	68
6.2.1 Study areas and tapirs caught.....	68
6.2.2 Isolation of tapir trypanosomes through culturing.....	69
6.2.3 Growth behavior and Morphological characterization	70
6.2.4 Molecular and Phylogenetic analysis	71
6.3 RESULTS.....	72
6.3.1 Culture of Tapir trypanosomes.....	72
6.3.2 Growth Behaviour and Morphology	73
6.3.3 Phylogenetic analysis.....	76
ACKNOWLEDGEMENTS	83
REFERENCES	84
REFERÊNCIAS GERAIS.....	91

1 INTRODUÇÃO GERAL

No decorrer do texto serão apresentados aspectos sobre a biologia, filogeneia e epidemiologia dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, temas da presente dissertação.

1.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

Os tripanossomatídeos são protozoários uniflagelados pertencentes ao reino Protozoa (CAVALIER-SMITH, 2010) filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida (HONIBGERG, 1963; CAVALIER-SMITH, 1981, 1998, 2004, 2010). A ordem Kinetoplastida caracteriza-se pela 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) (SIMPSON, 1987; STUART; FEAGIN, 1992).

As espécies da ordem Kinetoplastida estão divididas em duas subordens: a) Trypanosomatina, no qual os membros são todos endoparasitas obrigatórios; b) Bodonina, que compreende protozoários de água doce ou salgada (vida livre), ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos. A subordem Trypanosomatina possui apenas a família Trypanosomatidae, com uma diversidade de hospedeiros, plantas e animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição nos diferentes continentes (SIMPSON et al., 2006; STEVENS, 2008).

A família Trypanosomatidae, de acordo com a taxonomia tradicional (baseada em parâmetros morfológicos, hospedeiros de origem e nos ciclos de vida), foi classificada em oito gêneros. Destes, seis compreendem parasitas monoxênicos (que apresentam um único hospedeiro) de insetos (gêneros *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia* e *Blastocrithidia*), heteroxênicos (quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros) de insetos e plantas (gênero *Phytomonas*), heteroxênicos de hospedeiros invertebrados e vertebrados (gêneros

Leishmania, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*) (WALLACE, 1966; VICKERMAN, 1976; CAMARGO, 1998). Dois gêneros de espécies monoxênicas foram propostos, *Wallaceina* e *Sergeia* (PODLIPAEV, 2001; SVOBODOVA et al., 2007). Recentemente foram propostos mais dois gêneros, *Angomonas* e *Strigomonas* (TEIXEIRA et al., 2011).

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 et al., 2006). Análises semelhantes mostram que dentro dos kinetoplastídeos, os tripanossomatídeos, formaram um grupo monofilético que divergiu, aparentemente, dos bodonídeos de vida livre (MOREIRA et al., 2004; SIMPSON et al., 2006; DESCHAMPS et al., 2011).

1.2 O GÊNERO *Leishmania*

O gênero *Leishmania* é constituído por cerca de 30 espécies que infectam diferentes ordens de mamíferos e são transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae. Está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (DESJEUX, 2004).

Possui dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, os quais indicam a região do tubo digestivo onde o promastigota se desenvolve no vetor até a forma metacíclica ou infectante (LAINSON; SHAW, 1987).

O gênero *Leishmania* inclui espécies que causam sinais clínicos viscerais e cutâneos que, classicamente, são subdivididos em duas formas: leishmaniose tegumentar (LT), que apresenta sinal cutâneo, cutâneo difuso ou mucocutâneo e leishmaniose visceral (LV), uma das formas mais graves, com alterações sistêmicas e algumas vezes cutâneas (MICHALSKY et al., 2002), comuns em cães e humanos.

Considerando as diferentes manifestações clínicas em humanos, as principais espécies de *Leishmania* podem ser classificadas em três complexos: o complexo *L.*

donovani, que compreende a *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, responsáveis pela doença visceral; o complexo *L. mexicana* que inclui a *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) enrietti*, e são responsáveis pela doença em sua forma cutânea; e o complexo *L. braziliensis* que abrange as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) equatoriensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) shawi*, responsáveis pela doença em sua forma mucosa ou mucocutânea (LAINSON; SHAW, 1987).

No novo mundo, atualmente são conhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. Contudo, no Brasil são conhecidas ao menos oito espécies de *Leishmania* responsáveis por doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, enquanto a *L. (L.) chagasi* é a responsável pela doença visceral (GRIMALDI; TESH, 1993; BRASIL, 2007). Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, a vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE; FURTADO, 2005).

As espécies de leishmanias podem se apresentar sob a forma amastigota e promastigota em seus ciclos de vida. Estas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre (HOARE, 1972; VICKERMAN, 1994).

A LV é a forma mais grave da doença, com uma estimativa global de 500.000 casos humanos com 59 mil mortes a cada ano, sendo um grave problema de saúde pública (POSTIGO, 2010). As espécies causadoras de LV são: *L. (L.) donovani*, na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão; *L. (L.) infantum*, na região do Mediterrâneo (Europa e África) e *L. (L.) chagasi* em diferentes países da América (Novo Mundo) (LAINSON, 1983; LUKES et al., 2007). A taxonomia da espécie causadora de LV nas Américas foi revista e sugeriu-se o uso de *L. (L.) infantum chagasi*, pois diversos estudos baseados em biologia celular e molecular não conseguiram distinguir *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, sendo o principal vetor *Lutzomyia longipalpis* (MAURÍCIO et al., 1999; QUISPE-TINTAYA et al., 2005).

Dentre os hospedeiros vertebrados, para *Leishmania infantum chagasi*, destacam-se o homem e os cães domésticos, que são considerados os principais reservatórios, além de mamíferos silvestres. Os principais reservatórios silvestres são canídeos (DEANE; DEANE, 1954; FIGUEIREDO et al., 2008), felinos (SAVANI et al., 2004; DAHROUG et al., 2010), roedores (LAINSON; RANGEL, 2005), marsupiais do gênero *Didelphis* (TRAVI et al., 1994; LAINSON; RANGEL, 2005) e morcegos (DE LIMA et al., 2008).

As relações filogenéticas para o gênero *Leishmania* foram determinadas por diferenças na história natural de seus hospedeiros vertebrados, especificidade vetorial, manifestações clínicas, distribuição geográfica e, mais recentemente, por abordagens moleculares com diferentes marcadores (SHAW, 1994; FRAGA et al., 2010; BOITE et al., 2012).

1.3 O GÊNERO *Trypanosoma*

Originalmente proposto por Gruby (1843), o gênero *Trypanosoma* foi formado para classificar um hemoflagelado de *Rana esculenta* (rã) na Europa, denominado *Trypanosoma sanguinis*. Desde então, várias espécies de tripanossomas têm sido descritas em grande número de hospedeiros vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), vetores invertebrados e plantas (HOARE, 1972; BUSSE, PREISFELD, 2003; VON DER HEYDEN et al., 2004; SIMPSON et al., 2006).

O gênero *Trypanosoma* é formado por espécies que infectam vertebrados de todas as ordens, transmitidas por vários invertebrados hematófagos, geralmente artrópodes hematófagos pertencentes a diversas ordens e famílias. Normalmente, os tripanossomas de mamíferos são transmitidos por moscas, hemípteros e pulgas, enquanto os de aves podem ser veiculados por uma variedade de artrópodes. Já os tripanossomas de peixes e outros vertebrados aquáticos são transmitidos por sanguessugas. Em anuros e lagartos terrestres os tripanossomas são transmitidos principalmente por flebotomíneos e mosquitos (culicídeos) (FERRERIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008a).

Muitas espécies de tripanossomas foram descritas em mamíferos, com mais de uma espécie podendo infectar o mesmo hospedeiro em infecções mistas. Somente *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* na África e *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas infectam o homem. Com exceção de *T. rangeli*, essas espécies são consideradas patogênicas para o homem. Estes tripanossomas não estão restritos a infecções humanas e se mantêm na natureza no ciclo silvestre, infectando diversas ordens de mamíferos (antropozoonoses). A maioria das espécies de tripanossomas circula apenas no ciclo silvestre (zoonoses) e não é patogênica para seus hospedeiros. (HOARE, 1972; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007).

As espécies de tripanossomas podem se apresentar sob as formas, 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 (amastigotas 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).

De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido por Hoare (1964) nas Secções Stercoraria e Salivaria. A Secção Salivaria abrange as espécies que no inseto vetor, se desenvolvem 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 (HOARE, 1972; VENTURA et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; STEVENS et al., 2008).

Na Secção Stercoraria, que compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (*T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (HOARE, 1964, 1972), estão classificadas as espécies que 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 et al., 2003; VALLEJO et al., 2009). 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” (SARATAPHAN et al., 2007).

1.3.1 Filogenia e Evolução das Espécies do Gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitas de mamíferos foram distribuídas em vários subgêneros de acordo com as características morfológicas e biológicas (HOARE, 1972). Estudos iniciais baseados nas sequências de SSU rDNA apontaram para uma origem parafilética dos tripanossomas (MASLOV; SIMPSON, 1995). No entanto, análises posteriores, incluindo um número maior de taxa, sugeriram a origem monofilética destes organismos. Portanto, a monofilia do gênero *Trypanosoma* tornou-se a hipótese mais aceitável em filogenias derivadas das sequências dos genes SSU rDNA e gGAPDH (HAAG et al., 1998; FERREIRA et al., 2007; VIOLA et al., 2009a; GARCÍA et al., 2012). Portanto, estes estudos indicam que todas as espécies de tripanossomas de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos se originaram de um único ancestral (HAMILTON et al., 2004).

A confirmação dos tripanossomas como grupo monofilético evidenciou agrupamentos chave nesse gênero que foram apoiados por diversos estudos (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; VIOLA et

al., 2009a,b; DESCHAMPS et al., 2011). Consequentemente, as interferências filogenéticas mais recentes dividiram os tripanossomas em diversos clados (HAMILTON et al., 2004, 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a,b).

O clado aquático é composto por dois subclados, um deles formado por tripanossomas isolados de peixes, principalmente, e um isolado de ornitorrinco, provavelmente transmitidos por sanguessugas aquáticas, e outro subclado formado pelos tripanossomas de anuros, aparentemente transmitidos por flebotomíneos (JAKES et al., 2001a,b; HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008).

Clado squamata é formado por alguns tripanossomas de lagartos e cobras transmitidos por insetos flebotomíneos (HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008, 2009a,b).

Clado *T. avium/T. corvi*: formado por tripanossomas de aves, aparentemente sem restrição pela espécie hospedeira e transmitidos por inúmeros artrópodes (VOTYPKA et al., 2002, 2012).

Clado *T. cyclops*: formado por tripanossomas de macaco da Malásia (*T. cyclops*) um de marsupial Australiano, *Wallabia bicolor*, um isolado de anuro 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*: compreendido por tripanossomas encontrados, principalmente, nas ordens Lagomorpha, Rodentia e Insetívora além de representar o grupo de tripanossomas do subgênero *Herpetosoma*. São transmitidos por pulgas e possuem especificidade por hospedeiro vertebrado. Além de coelhos, primatas e infecções em humanos foram relatadas (HAMILTON et al., 2005b, 2007; SARATAPHAN et al., 2007; MAIA DA SILVA et al., 2010).

Clado *T. brucei*: formado por tripanossomas de mamíferos de origem exclusivamente africana e associados com as moscas tsetse (STEVENS et al., 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).

Clado *T. theileri*: compreende tripanossomas de mamíferos ungulados da ordem Artiodátala, 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).

Clado *T. cruzi*: formado pelas espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) e tripanossomas exclusivos de morcegos do novo e velho mundo (*T. dionissi*, *T.c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. livingstonei*, entre outros), *T. conorhini* de ratos e um isolado de canguru da Austrália. Neste caso, *T. rangeli* e *T. rangeli-like* formam um grupo homogêneo, mais relacionado com as espécies de *Schizotrypanum* (STEVENS et al., 2001, 2008; HAMILTON et al., 2007; LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013).

1.3.2 Subgênero *Schizotrypanum*

O subgênero *Schizotrypanum* compreende espécies restritas aos quirópteros (Morcegos), sendo as mais relatadas: *Trypanosoma verspertilionis* na Europa, Américas, África e Ásia; *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma pipistrelli*, *Trypanosoma erneyi* e *Trypanosoma livingstonei* na África; *Trypanosoma dionisii* na América do Sul; *Trypanosoma pteropi* e *Trypanosoma hipposideri* na Austrália, *Trypanosoma hedricki* e *Trypanosoma myotis* na América do Norte; *Trypanosoma phyllostomae* e *T. c. marinkellei* na América Central e do Sul; *Trypanosoma cruzi* em toda a América Latina, sul e sudoeste dos Estados Unidos (HOARE 1972; MARINKELLE 1976; MOLYNEUX 1991; MARCILI et al., 2009c; CAVAZZANA et al., 2010; LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013). Estas espécies foram descritas utilizando apenas parâmetros morfológicos e as formas sanguíneas de todas as espécies deste subgênero são morfologicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*, devido a isso, são frequentemente referidos como *T. cruzi-like*.

A origem evolutiva deste subgênero iniciou-se quando se especulou que a divergência de *T. brucei* e *T. cruzi* seguiu a separação da África e da América do Sul 100 milhões de anos atrás (BRISSE et al., 2003). A colocação do tripanossoma de canguru no clado *T. cruzi*, sugeriu uma origem para *T. cruzi*, possivelmente em

marsupiais, no supercontinente Austral (~65 milhões de anos), que nos dias atuais compreende Antártica, Austrália e América do Sul (STEVENS et al., 1999, 2001; TEIXEIRA et al., 2012). O alinhamento de tripanossomas de mamíferos terrestres africanos de macaco (*Cercopithecus nictitans*) e geneta (*Genetta genetta*) ao "clado *T. cruzi*", perto de *T. vespertilionis* de morcegos, sugeriu que a transferência intercontinental ocorreu após a separação dos continentes, e os morcegos provavelmente desempenharam um papel na disseminação desses tripanossomas (HAMILTON et al., 2009, 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

Até o momento, apenas tripanossomas com ocorrência no Brasil (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*), Bélgica, Inglaterra (*T. dionisii* e *T. vespertilionis*) e África (*Trypanosoma erneyi* e *Trypanosoma livingstonei*) foram confirmados através de análises filogenéticas (MOLYNEUX, 1991; HAMILTON et al., 2007, 2012; MAIA DA SILVA et al., 2009a; MARCILI et al., 2009; CAVAZZANA et al., 2010; LIMA et al., 2012, 2013).

As espécies do Brasil foram caracterizadas por uma combinação de critérios de comportamento biológico (comportamento em cultura e desenvolvimento intracelular) e análises filogenéticas (MARCILI et al., 2009a,b; CAVAZZANA et al., 2010) assim como *Trypanosoma erneyi* e *Trypanosoma livingstonei* na África (LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013).

A espécie tipo do subgênero é o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas humana, tendo sua ocorrência restrita ao continente americano, com evidências que esses tripanossomas são patogênicos para primatas não humanos, contudo, não se tem evidências que sejam patogênicos para outros animais silvestres, embora esses pequenos mamíferos terrestres voadores sejam espécies de vida longa e a infecção pode persistir por anos, com a localização de parasitas em musculatura esquelética, cardíaca e estômago (GARDNER; MOLYNEUX, 1988; MOLYNEUX, 1991; MAIA DA SILVA et al., 2008; MARCILI et al., 2009a).

Trypanosoma cruzi é formado por um complexo de isolados geneticamente heterogêneos e o comitê de especialistas reconheceu que a nomenclatura de cepas de *T. cruzi* deveriam ser classificados em seis grupos (TcI -TcVI) (ZINGALES et al., 2009) e o genótipo identificado como Tcbat. *T. cruzi* é mais relacionado a *T. c.*

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 (STEVENSON et al., 1999, 2001; HAMILTON et al., 2007; MARCILI et al., 2009a,b; CAVAZZANA et al., 2010).

Triatomíneos, que podem viver em buracos de árvores e cavernas, palmeiras, forros de residências, tocas de animais silvestres, telhados, folhas de palmeiras e outros abrigos de morcegos, podem ser vetores de *T. cruzi* entre os quirópteros. Grande parte dos quirópteros infectados é insetívora, devendo a infecção ocorrer principalmente por via oral após a ingestão dos vetores infectados (MARINKELLE, 1976).

Trypanosoma cruzi marinkellei também é transmitido por triatomíneos, parece restringir-se ao gênero *Cavernicola*, cujas espécies vivem geralmente associadas com colônias de morcegos em cavernas e palmeiras. *T. cruzi* tem seu desenvolvimento em triatomíneos de praticamente todos os gêneros e espécies (HOARE, 1972; MARINKELLE, 1976, 1982; MOLYNEUX, 1991). Também são diferentes de *T. vespertilionis* e *T. dionisii*, provenientes da Europa, pertencentes ao mesmo gênero (BAKER, 1985; MOLYNEUX, 1991). Até o momento, essa espécie foi encontrada em morcegos da Colômbia, Venezuela e em região norte, nordeste e central do Brasil (MARINKELLE, 1976, 1982a; BARNABÉ et al., 2003; CAVAZZANA et al., 2010; GARCÍA et al., 2012).

Cimicídeos são vetores de *T. dionisii* e *T. vespertilionis*. Infecções experimentais demonstraram o desenvolvimento completo em cimicídeos (HOARE, 1972; GARDNER; MOLYNEUX, 1988; MOLYNEUX, 1991). A distribuição mundial e alta prevalência do *Trypanosoma dionisii* são explicadas provavelmente pela ausência de hospedeiro preferencial (MOLYNEUX, 1991). *T. c. marinkellei* e *T. dionisii* apresentam ciclos de vida semelhantes ao de *T. cruzi*. O desenvolvimento intracelular de *T. dionisii* foi estudado em macrófagos (BAKER; LISTON, 1978) e em células não fagocíticas (GLAUERT et al., 1982). Este parasita, cuja capacidade de invadir células não fagocíticas é inibida por tratamento com citocalasina e pela imobilização dos parasitas por aquecimento, invade estas células sem ser interiorizados por pseudópodes, provavelmente, utilizando a mesma estratégia de *T.*

cruzi (BAKER et al., 1972,1985; MOLYNEUX, 1991; MORTARA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

A infecção e diferenciação *in vitro* também podem ser usadas como parâmetro taxonômico. As espécies de *Schizotrypanum* são as únicas descritas até o momento que infectam células de mamíferos e se multiplicam no interior destas como amastigotas. A capacidade de infectar camundongos pode ser utilizada para separar *T. cruzi* das demais espécies desse subgênero. O desenvolvimento desses tripanossomas em vetores (triatomíneos e cimiúdeos) pode ser utilizado para distinguir espécies (HOARE, 1972; BAKER, 1985; MOLYNEUX, 1991; TELLERIA et al., 2010).

Assim como as outras espécies de *Schizotrypanum*, exceto *T. cruzi*, *T. dionisii* não infecta o homem, e alguns mecanismos de morte deste parasita foram propostos: morte extracelular de parasitas revestidos por anticorpos, por citotoxicidade mediada por linfócitos, na ausência de complemento (MKWANANZI et al., 1976); destruição no interior dos fagossomas, sendo os neutrófilos mais eficientes que monócitos na fagocitose, que ocorre na presença ou não de anticorpos específicos, e na destruição dos parasitas fagocitados (THORNE et al., 1979, 1981).

Semelhante ao de *T. cruzi*, as formas amastigotas de *T. dionisii* desenvolvem-se nos músculos cardíacos, estriados e do estômago (HOARE, 1972). Contudo, diferente de *T. cruzi* e de *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* produz pseudocistos de formas epimastigotas no coração, diafragma, músculos do esterno, na mucosa intestinal e no ovário, além de ninhos de formas amastigotas (BAKER et al., 1972; MOLYNEUX, 1991).

1.4 TRIPANOSSOMAS EM PERISSODÁCTILOS

A ordem Perissodactyla compreende os ungulados de cascos ímpares e herbívoros. Esta ordem inclui a família Equidae, que apresentam um único dedo, e são descritas cerca de oito espécies existentes de cavalos, jumentos e zebras; a família Tapiridae, que apresentam três dedos nos membros posteriores e quatro

dedos nos membros anteriores, com quatro espécies de antas descritas e a Rhinocerotidae, também com três dedos, abrangendo cinco espécies de rinocerontes em quatro gêneros (WILSON; REEDER, 2005).

A Família Tapiridae é composta por quatro espécies, duas estão presentes na América do Sul (*Tapirus terrestris* e *Tapirus pinchaque*), uma na América Central (*Tapirus bairdii*) e Ásia (*Tapirus indicus*). *T. terrestris* é amplamente distribuída em grande parte da América do Sul, incluindo a Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina. *T. pinchaque* é encontrada na reigão Norte e Central dos Andes e é adaptada para viver em montanhas de grande altitude, na Venezuela, Colômbia, Equador e norte do Peru. *T. bairdii* é distribuído a partir do sudeste do México e em toda a América Central (exceto El Salvador) nos Andes ocidental, no Chocó colombiano e equatoriano. *T. indicus* vive em uma área muito fragmentada do Vietnã, Camboja, Birmânia, Sumatra, Tailândia, Malásia e ilhas Toba (BROOKS et al., 1997).

Tapirus terrestris (LINNAEUS, 1758) é considerada o maior mamífero terrestre da América do Sul e sua distribuição geográfica estende-se por toda a América do Sul a leste dos Andes, desde a Venezuela até o nordeste da Argentina e Paraguai. A espécie ocorre em 11 países incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (NOWAK; PARADISO, 1983; EMMONS, 1999; TABER et al., 2006; MEDICI et al., 2007). A anta possui papéis ecológicos importantes (JANZEN, 1981) na formação e manutenção da diversidade biológica (EISENBERG, 1990). Contudo, a espécie encontra-se na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza como “Vulnerável à Extinção”. É considerada vulnerável devido ao declínio populacional causado por caça ilegal, atropelamentos, por perda e fragmentação de habitat e doenças (IUCN, 2008).

A Família Equidae, principalmente cavalos, burros e jumentos, possui alta importância no desenvolvimento de diversas atividades humanas. Este grupo de vertebrados pode ser infectado com diversas espécies de tripanossomas em todo o mundo. *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. congolense* e *T. b. brucei* são agentes de doenças de grande importância para esses animais na África, Ásia e Américas Central e do Sul. Tais espécies são patogênicas para bovinos, bubalinos, ovinos,

caprinos, equinos e suínos, sendo que todas possuem origem no continente africano, onde circulam entre ungulados silvestres que atuam como reservatórios e raramente apresentam sinais clínicos de doença. A distribuição está diretamente associada à presença de vetores hematófagos (DESQUESNES; DIA, 2004).

Trypanosoma vivax é considerado um dos principais agentes transmitidos por moscas tsé-tsé com grande impacto na saúde e produtividade de animais de interesse econômico na África (DESQUESNES; DIA, 2004). Foi introduzido nas Américas provavelmente nas importações de bois trazidos da África, neste novo continente, o parasita se adaptou à transmissão mecânica por insetos hematófagos e mamíferos presentes nessas regiões e se disseminou entre animais domésticos e silvestres nunca antes expostos ao patógeno (CORTEZ et al., 2006; OSÓRIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Trypanosoma evansi possui a maior diversidade de hospedeiros vertebrados e a maior distribuição geográfica entre os tripanossomas patogênicos, com presença na Europa, Ásia, Oriente Médio, Américas Central e do Sul, além da África (FRANCISCATO et al., 2007; GONZALES et al., 2007; ADRIAN et al., 2010; HAGOS et al., 2010; MILOCCO et al., 2012). A diversidade de hospedeiros inclui mamíferos de várias ordens, tanto domésticos quanto silvestres. O curso da infecção por *T. evansi* varia desde uma doença aguda com alta mortalidade em animais susceptíveis como cavalos e cães (FRANCISCATO et al., 2007) até doenças crônicas caracterizados por distúrbios motores e fraqueza progressiva (BERLIN et al., 2009)

Na América Latina, *T. evansi* tem sido descrito desde a América Central até a Argentina, mostrando uma alta prevalência e distribuição na Venezuela, Brasil, Bolívia e Colômbia (GONZALES et al., 2007; ZANETTE et al., 2008; GARCÍA et al., 2009). No Brasil, foi descrito pela primeira vez em 1838 em cavalos na ilha de Marajó, no Pará (SHAW, 1977), popularmente chamado de “mal das cadeiras” nos equinos, sendo, tal doença, considerada endêmica da reigão do pantanal brasileiro (FRANKE et al., 1994; SEIDL et al., 2001) . Na Venezuela, o primeiro relato foi feito em 1905, em cavalos de regiões alagadiças do centro do país, embora desde 1898, relatos de surtos em cavalos de diversos estados do país já sugeriam a presença do

parasita (CEFERINO, 1973). No Brasil, tem-se relatado em equinos no sul do país (RODRIGUES et al., 2005, 2009; ZANETTE et al., 2008).

Em contraponto, pouco se sabe sobre a saúde de maneira geral e fatores que afetam a anta brasileira no ambiente natural (MANGINI; MEDICI et al., 2001). A maior parte das informações sobre doenças de antas são provenientes de cativeiro (MANGINI, 2007). O único relato de *Trypanosoma evansi* em antas foi descrito na Indonésia em *Tapirus indicus* (CURASSON, 1943).

1.5 REMANESCENTES FLORESTAIS E TRPANOSSOMATÍDEOS NO ESPÍRITO SANTO

O Estado do Espírito Santo conta com 37 Unidades de Conservação (UCs) (Federal, Estadual, Municipal e particular), sendo o Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA) responsável pela administração de 16 UCs e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) administra nove unidades de conservação: um parque nacional, um monumento natural, duas florestas nacionais e cinco reservas biológicas, três RPPNs, duas reservas biológicas estaduais e três áreas de proteção ambiental estaduais (IEMA, 2013).

Na Mata Atlântica capixaba (36% de cobertura) (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE, 2012) o processo de fragmentação aumentou significativamente durante o início do século XX (AGUIRRE, 1951), tendo como principal causa queimadas para abertura de pasto e agricultura. Tal processo ainda persiste, como indicado por imagens de satélites (CHIARELLO, 1999; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE, 2012) e, como consequência, no norte do estado, as últimas áreas de mata relativamente expressivas são representadas por áreas naturais protegidas (IPEMA, 2005). Podemos exemplificar com as populações de *Tapirus terrestres*, que estão presentes em cinco UCs do estado, sendo que duas populações localizam-se na Reserva Biológica do Córrego do Veado, no município de Pinheiros, e na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Recanto das Antas, em Linhares e estão em perigo de extinção no Estado (PASSAMANI; MENDES, 2007).

A Rebio do Córrego do Veado está isolada em uma das regiões com menor cobertura florestal do estado e uma das que mais é afetada pela escassez de água, isolamento e ações de fogo e caça, aumentando a probabilidade de extinção da população local de anta. Já a RPPN Recanto das Antas está inserida no maior bloco florestal do Espírito Santo, constituído pela Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural da Vale do Rio Doce (IPEMA, 2005).

Os estudos sobre tripanossomatídeos ainda são incipientes no Estado do Espírito Santo e estão, principalmente, relacionados aos vetores destas parasitoses. Em zonas rurais do estado do Espírito Santo, são frequentemente capturados espécimes de *Triatoma vitticeps* infectados com *T. cruzi*, contudo, tal vetor possui baixa eficiência de na transmissão para o homem (FALQUETO et al., 2005, 2006). Em 2008, para avaliar a composição da fauna de flebotomíneos e sazonalidade na Reserva Biológica de Sooretama, foram capturados 6.176 espécimes, dos quais 47,4% ocorreram no ambiente florestal e 52,6%, no ambiente antrópico. *Lutzomyia davisi* (60,8%) predominou no ambiente florestal e *Lutzomyia choti* (72%) seguida de *Lutzomyia intermedia* (24,3%) (VIRGENS et al., 2008) Já em 2010, na Reserva Biológica Duas Bocas, foram capturados 18.868 pertencentes a 13 gêneros e 29 espécies da família Psychodidae (PINTO et al., 2010). Em 2012, um total de 62.469 flebotomíneos pertencentes a 17 espécies e oito gêneros foram coletados em 164 municípios de nove municípios com registros Leishmaniose tegumentar americana, sendo que, *Lutzomyia longipalpis* foi identificado em 79 localidades (PINTO et al., 2012) Estudo com vertebrados foi realizado com animais domésticos, cães e equinos, avaliados sorologicamente como reservatórios de *L. braziliensis* (FALQUETO et al., 1986, 1987, 1991, 2001, 2003) além de humanos e cães com diagnóstico sorológico de *Leishmania infantum chagasi* em áreas rurais no sudeste do estado (FALQUETO et al., 2009). Foi feita também a descrição do primeiro caso autóctone de LV canina em Vitória, capital do estado (TONINI et al., 2012), salientando para a necessidade de mais estudos em pesquisa molecular e isolamento aos parasitas estudados.

2 JUSTIFICATIVA

A Mata Atlântica é o bioma brasileiro com maior grau de degradação, sendo esta a formação florestal original em todo território do estado do Espírito Santo e que atualmente está restrita a remanescentes. As principais doenças causadas por tripanossomatídeos, LV e Tripanossomíase Americana, estão relacionadas a processos de desmatamento e colonização acelerada pelo crescimento econômico desde o início do século XX. O crescente processo de desmatamento das áreas deste bioma possibilita o crescimento dos casos de LV. Complementa-se ao fato, o pouco conhecimento sobre a diversidade de parasitas destes gêneros na região e o papel de pequenos mamíferos terrestres e voadores como hospedeiros de destes parasitas no Brasil.

Estudos sobre o papel dos grandes mamíferos nas doenças causadas por tripanossomatídeos são escassos ou inexistentes no caso de *Tapirus terrestris*. Tal fato é dado pela grande dificuldade de captura destes animais ou pela utilização de metodologias que não contemplem o isolamento ou a detecção de tripanossomatídeos.

Portanto, o isolamento de leishmanias e tripanossomas em reservatórios silvestres e domésticos com o uso de parâmetros morfológicos e marcadores moleculares tradicionais, contribuirão para o estudo amplo da diversidade de tripanossomatídeos no estado do Espírito Santo, melhorando o conhecimento epidemiológico da área estudada, atualizando a lista de espécies, além de um conhecimento dos parasitos citados, sendo que os resultados obtidos poderão favorecer nas decisões de futuras medidas de controle desses agentes nas espécies estudadas, pois, até o presente momento, nenhum trabalho similar relacionado a tais doenças no Estado fora feito.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Conhecer a diversidade de parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* em animais silvestres da Reserva Biológica Córrego do Veado e em animais domésticos do seu entorno, no estado do Espírito Santo.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* de animais silvestres da reserva Biológica Córrego do Veado e animais domésticos do seu entorno;
- Caracterizar através de parâmetros morfológicos e moleculares, os isolados obtidos de amostras colhidas dos animais silvestres e domésticos;
- Posicionar filogeneticamente, com base em sequências dos genes ribossômico (SSU rDNA) e gliceraldeído fosfato desidrogenase (gGAPDH), os isolados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas características do local e das populações abordadas, período de realização das coletas e serão descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste estudo.

4.1 ÁREA AMOSTRADA

Localizada em uma das regiões com menor cobertura florestal do Estado do Espírito Santo e uma das que mais sofre com escassez de água, a Reserva Biológica do Córrego do Veado (RBCV) (Figura 1) possui 2.382 ha e está situada no município de Pinheiros (40° 08' 48", 18° 20' 33"), ao norte do Estado, a aproximadamente 293 km da capital, Vitória do estado. A Reserva foi oficialmente doada pela lei nº 976 de 10/12/1970 ao Governo Federal, somente passando à categoria de Reserva Biológica no ano de 1970. Contudo, apenas em 20 de setembro de 1982 ela foi criada, pelo Decreto nº 87.590, como Reserva Biológica do Córrego do Veado (RBCV) e atualmente é administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO). O incentivo para a criação da área foi devido ao elevado processo de fragmentação ocorrido na década de 1960.

A RBCV está localizada no Corredor Ecológico Córrego do Veado, que propõe conectar a Unidade a fragmentos florestais no entorno e ao município de Boa Esperança. O relevo da RBCV é caracterizado por planície costeira e a vegetação é caracterizada como Floresta do tipo Tropical Pluvial Semi-decídua, com árvores de grande altura e sub-bosque pouco denso. A reserva constitui praticamente o último remanescente de floresta na região, já que a vegetação natural foi substituída por agricultura e pastagens (IPEMA, 2005).

O maior incêndio de sua história ocorreu em 1987, atingindo 80% dos quase 2.400 ha da RBCV, mas atualmente consiste de uma densa floresta secundária. O desmatamento e a criação de propriedades no seu entorno teve um aumento significativo devido ao crescimento da produção agrícola regional, pois se baseia em

extensas áreas de pastagens, além da cafeicultura, fruticultura (mamão, maracujá e coco) e plantações de cana-de-açúcar que atendem às usinas alcooleiras situadas na região (IPEMA, 2005).

A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Recanto das Antas (2.202 ha), criada em 2007 e administrada pela FIBRIA SA, faz parte do maior fragmento de Floresta de Tabuleiro do Espírito Santo, interligando a Reserva Biológica de Sooretama (24.250 ha) e a Reserva Natural da Vale do Rio Doce (21.800 ha), em Linhares, norte do Espírito Santo, no corredor prioritário Sooretama-Goytacazes-Comboios (Figura 1). É a maior RPPN do Espírito Santo e está entre as dez maiores RPPNs do bioma Mata Atlântica. Sua vegetação é caracterizada como Floresta Ombrófila Densa, praticamente primária (IPEMA, 2005). Esta área foi utilizada somente para a captura de *Tapirus Terrestris* pelo projeto Pró- Tapir.

Figura 1 - Região de estudo (na seta) ao norte do Estado do Espírito Santo, indicando as unidades de conservação

Fonte: Moreira (2013)

4.2 CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a captura dos animais silvestres foram utilizados diferentes métodos de acordo com os grupos pretendidos. Para captura de pequenos mamíferos foram utilizadas 80 armadilhas do tipo gaiola (Shermman 10,0 cm x 12,0 cm x 37,5 cm) com diferentes atrativos como isca (mortadela e uma mistura de fubá, sardinha e pasta de amendoim) nas áreas amostradas. As armadilhas foram distribuídas em três trilhas distintas, de ambos os lados da trilha, ou seja, foram 30 armadilhas em duas trilhas sendo quinze de cada lado a uma distância de três metros uma da outra. Na terceira trilha foram colocadas 20 armadilhas, sendo 10 de cada lado com a mesma distância entre as mesmas. Estas foram vistoriadas diariamente pelo período da manhã, entre 7:00 e 8:00 horas, os animais capturados foram transportados dentro da própria gaiola até o laboratório de campo para colheita de material biológico. Para a captura de morcegos foram utilizadas oito redes de neblina (“mist nest”) com 3,0 X 6,0 m de comprimento em cada área, que foram armadas no início do entardecer e mantidas abertas por um período de cinco horas. Para algumas espécies de morcegos foi realizada busca ativa em abrigos e os animais capturados foram transportados em sacos de pano.

Foram realizadas duas campanhas, sendo a primeira realizada nos mês de Junho e a segunda no mês de novembro do ano de 2012, com 15 dias de duração cada. Na primeira campanha foram amostrados apenas os silvestres (pequenos mamíferos terrestres e voadores). Na segunda campanha, além dos animais silvestres, também foi realizada a colheita de material biológico dos animais domésticos, cães e equinos, residentes nas propriedades adjacentes à reserva.

As espécies silvestres foram identificadas com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais. Alguns exemplares destes animais, cuja identificação da espécie não foi possível, foram sacrificados, fixados em formol 10% e depositados na Coleção de Mamíferos da Universidade Federal do Espírito Santo e Coleção de Tecidos Animais do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.3 COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os pequenos mamíferos silvestres capturados foram anestesiados com Xilazina 1,5mL/10Kg IM e Quetamina 100mg/kg em uma única dose por via intramuscular para posterior coleta de sangue por punção cardíaca, pela veia caudal ou pela veia cefálica. Os animais sacrificados tiveram amostras de tecidos coletados para estudos moleculares. A captura e coleta de amostras biológicas de pequenos mamíferos foram autorizadas por meio da licença nº 32254-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o nº 15311-6/2011.

Amostras de sangue de *Tapirus terrestris* foram coletadas e semeadas em tubos com meio bifásico (com meio de cultura) para tentativa de isolamento do parasita e em microtubos com etanol absoluto para pesquisa direta do parasita por meios moleculares. Foram coletados através do projeto Pró-Tapir - Monitoramento e Proteção das Antas da Mata Atlântica Capixaba (Instituto Marcos Daniel) e enviadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Dos cães domésticos, foram coletados de forma asséptica, em média, 5mL de sangue de cada animal, em tubos sem anticoagulantes por venopunção das veias cefálica ou jugular. As amostras foram deixadas por 24 horas em temperatura ambiente para a obtenção de soro e posteriormente armazenadas a -20°C até as análises. Além disso, foi realizada a punção por agulha fina (20 x 5,5mm) do linfonodo poplíteo direito e esquerdo para isolamento de *Leishmania*.

Dos equídeos, foram coletados de forma asséptica, 5ml de sangue de cada animal por venopunção da veia jugular para isolamento, obtenção de soro e pesquisa molecular.

Para obter dados referentes aos aspectos epidemiológicos, foi aplicado um questionário aos responsáveis pelos animais amostrados, com perguntas referentes

ao animal (raça, idade, sexo, alimentação), hábitos que incluam manejo ambiental e medidas de controle.

4.4 ISOLAMENTO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Para o isolamento das espécies de tripanossomas e/ou leishmanias as amostras de sangue coletadas foram semadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood ágar base com 15% sangue de carneiro desfibrinado) e fase líquida de meio LIT (Liver infusion tryptose) acrescidos de soro fetal bovino 10% e antibióticos. Para os cães o material semeado foi o aspirado dos linfonodos. O material semeado foi analisado por microscopia óptica comum com objetiva de 40X durante 90 dias uma vez por semana.

Os isolados obtidos foram cultivados em meio LIT, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado a 65°C, 10µg/mL de Gentamicina e 10µg/mL de Ampicilina, 2% de urina masculina (no caso de *Leishmania*) e cultivados a 27°C. Para a manutenção da cultura semanalmente uma alíquota foi retirada e examinada a fresco em microscopia óptica comum com objetiva de 40X até o congelamento.

4.5 PRESERVAÇÃO DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS NA COLEÇÃO DE CULTURAS

Os isolados obtidos foram mantidos e criopreservados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal FMVZ/USP. Os isolados foram mantidos congelados em Nitrogênio (N₂) líquido e cultivados a 25-28°C.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Nos itens abaixo serão descritos as etapas e procedimentos realizados para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

4.6.1 Extração da Biomassa dos Parasitas

Os tripanossomas obtidos em cultura foram lavados duas vezes com solução salina tamponada (PBS) 1X e os "pellets" foram ressuspensos ($1,0\text{ml}/10^9$ tripanossomas) em SE e mantidos em banho de gelo. Após a adição de 0,5% de Sarkosil, 100 $\mu\text{g/ml}$ de Pronase e 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNase, o material foi incubado em banho-maria, a 55-60°C, por 1 a 2 h. Após esta incubação, a mistura foi extraída uma vez com Fenol:Tris (1:1), duas vezes com Fenol:Clorofórmio (1:1), duas vezes com Clorofórmio:isoamílico (24:1) e uma vez com Clorofórmio. Após a última extração, o DNA foi precipitado com acetato de sódio a 0,3 M (pH 7,0) e 2 volumes de etanol gelado a 100%, por incubação, por 12 a 15 horas, a 20°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%; os "pellets" foram secos a 37°C e ressuspensos em tampão Tris-EDTA (TE). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro.

4.6.2 Extração das Amostras diretas (sangue e tecidos)

Amostras de sangue (quando possível) e tecidos (fígado e baço) dos animais sacrificados foram acondicionados em microtubos de 2,0ml com etanol absoluto e preparados para estudos moleculares quando o isolamento não foi possível.

Das amostras diretas (sangue e tecidos) a extração foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit Wizard SV Clean up ® (Promega, Wisconsin,

USA) com a incubação prévia de 0,5g de tecido e 20 μ L da enzima proteinase K (20mg/ml) e 700 μ L solução de lise.

4.6.3 Soluções e tampões utilizados

Solução de lise: SDS 1%, 100mM EDTA pH 8.0, 20mM Tris-HCL pH 8.0, água ultra pura (milli-Q);

SE: 0,15M de NaCl; 2,5mM de EDTA, pH 8,0; 2,5mM de Tris pH 8,0;

TE: 10mM de Tris-HCl, pH 7,4; 1mM de EDTA pH 8,0;

PBS: 140mM de NaCl; 10mM de Na₂HPO₄; 1,76mM de KH₂PO₄; 2,68mM de KCl, pH 7,2;

TAE: 2M de Tris-base; 0,5M de EDTA, pH 8,0; Ácido acético glacial 1M; Água destilada;

Tampão de amostra: 50% de glicerol; 0,4% de azul de bromofenol; 0,4% de xilenocianol;

4.6.4 Amplificação de DNA por PCR ("Polymerase Chain Reaction")

Os oligonucleotídeos e condições das reações foram utilizados para a amplificação de SSU rDNA, gGAPDH e descritos em trabalhos anteriores (ULIANA et al., 1991; MAIA DA SILVA et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2006; MARCILI et al., 2009a,b,c; HAMILTON et al., 2004, 2007, 2009). Para as reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 100 ng de DNA genômico; 100 ng de cada "primer"; 200mM de cada dNTP; 5 μ l de tampão (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl e 1,5 mM MgCl₂); 2,5 μ l de Taq DNA polimerase e água bidestilada deionizada e autoclavada (qsp 50 μ l). Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com os "primers" empregados (Quadro1).

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 50 V/100 mA, corado com Syber Safe (Invitrogen) e a visualização das bandas fotografados em transiluminador de luz U.V.

Quadro 1 - Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR Reação de amplificação e oligonucleotídeos, condições de amplificação e referência

Reação de Amplificação e Oligonucleotídeos	Condições Amplificação	Referência
V7-V8 SSU rDNA 609F (5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3') 706R (5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3') 1156F (5' CGT ACT GGT GCG TCA GAG G 3') 1156R (5' CCT CTG ACG CAC CAT ACG 3')	1 ciclo: 3 min 94 °C 29 ciclos: 1 min 94 °C; 2 min 60 °C; 1 min 72 °C 1 ciclo: 10 min 72 °C	Maia da Silva et al., 2004a
Gliceraldeído fosfato desidrogenase (gGAPDH) G3 (5' TTT GCC GTA TTG GTC GCA TGG '3) G4b (5' CCA CGA CAC AAC CTT GAA GAA 3')	1 ciclo: 3 min 94 °C 30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C 1 ciclo: 10 min 72 °C	Hamilton et al., 2004

4.8 PURIFICAÇÃO/SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste em Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Depois de purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

4.9 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS

As sequências obtidas, por PCR, dos diferentes genes utilizados como alvo foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) e manualmente ajustados no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997).

As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos de análise bayesiana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca. As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Foram empregadas 1.000.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posterior obtidos com o programa Mr. Bayes. As matrizes de similaridade (baseadas em distância *p* não corrigida) foram construídas utilizando o programa Poit Replacer v.2.0.

4.10 ANÁLISE MORFOLÓGICA

4.10.1 Microscopia óptica

Para o estudo morfológico dos isolados, foram preparados esfregaços a partir de amostras de sangue semeados em meio de cultura dos hospedeiros infectados e de culturas em fase logarítmica e estacionária. Os esfregaços foram fixados com metanol e corados com Giemsa.

4.10.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O pelete do isolado (CBT 46) foi crescido em meio LIT acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino e fixado na mistura de Karnovsky tamponada com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH = 7,4 por 2 horas. Em seguida o material foi centrifugado e o fixador foi substituído pelo mesmo tampão para lavagem (2x por 15 minutos). Depois o material foi ressuspensão no tampão e duas gotas da suspensão foram transferidas para lamínulas de vidro cobertas com poli-lisina 1:10. As lamínulas foram secas em estufa por 24 horas a 37°C, desidratadas em série crescente de acetona a 50%, 75%, 90%, 95%, dois banhos de acetona PA durante 15 minutos e finalmente em ponto crítico. As lamínulas contendo o material foram metalizadas com ouro em "Sputtering", examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM3000.

4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O pelete do isolado (CBT 46) foi crescido em meio LIT acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino foi fixado com Glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH = 7,4 por duas horas. Em seguida, todo o material foi centrifugado e o fixador foi substituído pelo mesmo tampão para lavagem duas vezes 15 minutos cada banho. Em seguida o material foi centrifugado e o pellet foi incluído em bloco de ágar 2%. A partir daí todo processamento foi feito no bloco de ágar. Na sequência o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, em cacodilato de sódio 0.1M por duas horas. Novamente foram realizadas duas lavagens com cacodilato de sódio 0.1M por 15 minutos cada. Após esse procedimento, o material passou por um banho de álcool 10% durante 15 minutos e, em seguida, contrastado em acetado de uranila a 2% em etanol a 10% durante 2 horas. Posteriormente foi feita a desidratação em série crescente de acetona 50%, 75%, 90%, 95% e 100%, duas vezes, com duração de 10 minutos cada banho. Logo após, o material foi submetido à mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 onde permaneceu por 12 horas, e depois foi transferido para resina Epon Araldite pura mais catalisador.

Finalmente, o material foi incluído em resina Epon Araldite pura mais catalisador e colocado em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização e posterior seccionamento em ultramicrotomo.

As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos respectivamente. As grades contendo as secções foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM 100.

4.11 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A determinação dos títulos dos anticorpos (IgG) contra *Leishmania* causadora de lesões viscerais foi realizada pelas técnicas de RIFI utilizando formas promatigotas de *Leishmania infantum chagasi* fixadas em lâmina. Visando aumentar a sensibilidade e principalmente a especificidade do teste diagnóstico, utilizou-se como antígeno o parasito isolado obtido de cão do estado do Maranhão (CBT 96).

Após a obtenção do antígeno a técnica foi realizada conforme descrito por Zanette et al. (2013) (em fase de elaboração)¹:

1. As lâminas previamente sensibilizadas para *L. (L.) chagasi* foram descongeladas à temperatura ambiente;
2. Preparou-se as diluições dos soros a serem testados e dos soros controle positivo e negativo de origem canina, previamente conhecidos e utilizados na rotina do Laboratório, em PBS 7,2, considerando-se a diluição de 1:40 como ponto de corte;
3. Com as lâminas já secas, foram adicionados em cada poço das mesmas, 20µL dos soros a serem testados diluídos, assim como controles positivo e negativo;
4. O material foi incubado por 30 min a 37°C em câmara úmida;

¹ ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R.F. C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2013.

5. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 7,2, durante 5 minutos, por três vezes consecutivas em uma cuba de vidro;
6. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e em cada poço foram acrescentados 20µL do conjugado (anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína – Sigma F7884), utilizado na diluição de 1:200 em solução de PBS 7,2 contendo Azul de Evans 0,04%;
7. O material foi novamente incubado por 30 min, a 37°C;
8. As lâminas foram novamente lavadas com PBS 7,2 como descrito anteriormente;
9. Após a secagem à temperatura ambiente, realizou-se a montagem com lamínula utilizando-se glicerina tamponada (pH 8,0) e as lâminas foram lidas imediatamente em microscópio equipado para fluorescência no aumento de 40X.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência em todo o contorno do parasita com título igual ou superior a 1:40 conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 SURVEY OF *Trypanosoma* AND *Leishmania* IN WILD AND DOMESTIC ANIMALS IN AN ATLANTIC RAINFOREST FRAGMENT AND SURROUNDINGS IN ESPIRITO SANTO STATE, BRAZIL

5.1 INTRODUCTION

Trypanosomatids feature a wide variety of hosts, infecting invertebrate and vertebrate animals of virtually all orders. These organisms after the nematodes are eukaryotes that have the widest range of hosts and geographical distribution (VICKERMAN, 1976, 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006). Trypanosomatids harbor heteroxenous genus with alternate cycles between invertebrate hosts (usually hematophagous arthropods) and vertebrates (*Trypanosoma*, *Leishmania* and *Endotrypanum*) (WALLACE, 1966; HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; CAMARGO, 1998).

The *Leishmania* genus is comprised of about 30 different species that infect mammalian orders transmitted by various blood-sucking invertebrates Family Psychodidae and distributed in tropical and subtropical regions (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004). These parasites can infect humans and cause different clinical symptoms, and visceral leishmaniasis is the most severe.

The species that cause visceral leishmaniasis are *L. (L.) donovani*, India, Bangladesh, Nepal and Pakistan; *L. (L.) infantum* in the Mediterranean (Europe and Africa) and *L. (L.) chagasi* in different countries of America (New World) (LAINSON, 1983). Among the vertebrate hosts include humans and domestic dogs that are considered the main reservoir, and wild mammals. The main reservoirs are wild canids (DEANE; DEANE, 1954, 1955; ALENCAR, 1961; LAINSON et al., 1969; COURTENAY et al., 2002; LAINSON; RANGEL, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008), cats (SAVANI et al., 2004; DAHROUG et al., 2010), rodents (LAINSON; RANGEL, 2005), opossums, genus *Didelphis* (TRAVI et al., 1994; LAINSON; RANGEL, 2005) and bats (DE LIMA et al., 2008).

The species of the genus *Trypanosoma* parasites of mammals were divided into sections *Salivaria* and *Stercoraria*, according to the development in the invertebrate host, and consequently the route of elimination of infective forms by vector. Section *stercoraria* includes subgenres *Schizotrypanum* (type species *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) and *Megatrypanum* (*T. theileri*) (HOARE, 1972). Only *Schizotrypanum* showed a monophyletic group, although still controversial. Subgenera *Herpetosoma* and *Megatrypanum* proved polyphyletic, confirming that the traditional taxonomic criteria are not sufficient to classify the trypanosomes in subgenera (STEVENS et al., 2001; MAIA DA SILVA et al., 2004a,b; RODRIGUES et al., 2006). Besides *T. cruzi*, which infects humans, wild and domestic mammals, only a few species of trypanosomes of bats are classified in the *Schizotrypanum* subgenus are morphologically indistinguishable (HOARE, 1972).

In this study we conducted a survey of the diversity of parasites of the genus *Trypanosoma* and *Leishmania* in small mammals and domestic animals from Corrego do Veado Biological Reserve, Espírito Santo state and surroundings through serological, parasitological (isolation) and molecular techniques with traditional markers used for group.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Study area and small mammals caught

The Corrego do Veado Biological Reserve (2382 ha) is located in Pinheiros county (40° 08' 48"S, 18° 20' 33"W) in northern of Espírito Santo state and was the last remaining of Atlantic Rainforest in the region. Deforestation and the creation of private farmlands properties in the surrounding area had a significant increase due to the growth of regional agricultural production. It is based on extensive grazing areas, in addition to coffee, fruit (papaya, passion fruit and coconut) plantations and cane sugar serving alcohol factories to power plants located in the region (Figure 2).

Figure 2 - Geographical origin of small mammals and domestic animals caught in the Espírito Santo state, Pinheiros County

Fonte: Centoducatte (2013).

To catch small mammals were used Shermman traps and to bat-catching with mist nets (7 x 3 m) in two campaigns, June and November/2012, with 15 days each. The small mammals and bats caught were anesthetized (ketamine and xylazine) and blood samples were collected by means of heart puncture. Animals were identified with identification keys and original descriptions (VIZOTTO; TADDEI, 1973). Some examples of animals whose species identification was not possible in field collection were sacrificed, fixed and deposited in the Coleção de Mamíferos, in department of Biological Sciences, Universidade Federal do Espírito Santo. The animals were

caught and manipulated in accordance with the recommendations of the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA).

All the dogs present in the surroundings of Biological Reserve had blood samples collected and were included in the study. Some risk factor variables (age, hunt activity and sex) were assessed.

5.2.2 Isolation of trypanossomatids

To detect the trypanosomatids parasites, the blood samples from wild and domestic animals and popliteal lymph node aspirates obtained through fine-needle puncture of dogs were inoculated into vacutainer tubes containing a biphasic medium consisting of 15% sheep red blood cells as solid phase (blood agar base), overlain by liquid LIT medium supplemented with 20% FBS (MARCILI et al., 2009a,b). The culture was incubated at 28 °C and grown in LIT medium for DNA preparation, and the isolates were cryopreserved in liquid nitrogen in the Brazilian Trypanosomatid Collection (Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos, CBT), in the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil. Blood samples were fixed in ethanol (primary samples) to molecular detection.

5.2.3 Serologic diagnosis of *Leishmania infantum chagasi*

Blood samples were collected from the jugular or brachial vein of the dogs and sera were separated and stored at -20 °C until tested. An indirect fluorescent antibody test (IFAT) was used for detection of anti-*Leishmania infantum chagasi* antibodies, with a cut-off value of 1:40. Promastigotes forms of the *Leishmania infantum chagasi* CBT 96 strain were used as antigen, as described by Ferrer et al. (1995). *Leishmania infantum chagasi* IFAT positive sera were tested at 2-fold serial dilutions until the last positive dilution and rabbit anti-canine IgG conjugate (Sigma,

USA) was used in both tests. Positive and negative control sera were added to each slide.

5.2.4 Molecular and Phylogenetic analysis

DNA for culture samples was extracted from the trypanosome cultures using the phenol-chloroform method, and primary samples were purified using the Wizard DNA Clean-Up System (Promega). The DNA samples were subjected to the conventional polymerase chain reaction (PCR) for trypanosome barcoding on a fragment of approximately 900 base pairs (bp) of the V7V8 SSU rDNA (VIOLA et al., 2008; MARCILI et al., 2009a,b) and gGAPDH gene (HAMILTON et al., 2004, 2007). PCR products of the expected size were purified and sequenced in an automated sequencer (ABI Prism 310). The nucleotide sequences generated were deposited in GenBank (Table 1).

The sequences obtained were aligned with sequences previously determined for other trypanosomatid species available in Genbank (Table 1) using ClustalX (THOMPSON et al., 1997) and were adjusted manually using GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997). The barcoding sequences were used to construct a phylogenetic tree using maximum parsimony, as implemented in PAUP version 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) with 500 bootstrap replicates and Bayesian analysis was performed using MrBayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) with 1,000,000 replicates. The first 25% trees represented burn-in, and remaining trees were used to calculate Bayesian posterior probability.

5.3 RESULTS

A total of 154 small mammals were captured in the area and distributed in four orders and 25 species. The largest number of individuals captured was Chiroptera order with 138 individuals belonging to four families (Phyllostomidae, Vespertilionidae, Thyropteridae and Emballonuridae) (Table 2).

Table 2 - Trypanosome isolates, host and geographic origin and sequences of SSU rDNA and gGAPDH used for phylogenetic analysis

Trypanosomatids species	Isolate code	Host	Geographic oringin		Acession Number	
					SSU rDNA	gGAPDH
<i>Trypanosoma rangeli</i>	TCC643	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Miranda	MS	EU867803	
<i>Trypanosoma dionisii</i>	CBT58	<i>Sturnira lillium</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557744</u>	<u>KF557735</u>
	CBT59	<i>Lophostoma braziliense</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557745</u>	<u>KF557736</u>
	CBT63	<i>Carollia perspicillata</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557746</u>	<u>KF557737</u>
	CBT64	<i>Carollia perspicillata</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557747</u>	<u>KF557738</u>
	CBT65	<i>Carollia perspicillata</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557748</u>	<u>KF557739</u>
	CBT66	<i>Carollia perspicillata</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557749</u>	<u>KF557740</u>
	CBT69	<i>Desmodus rotundus</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557750</u>	<u>KF557741</u>
	CBT116	<i>Myotis nigricans</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557751</u>	<u>KF557742</u>
	PJ	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Belgium		AJ009152	
	P3	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	England		AJ009151	AJ620271
	TCC211	<i>Eptesicus brasiliensis</i>	São Paulo	SP	FJ001666	GQ140362
	TCC495	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO	FJ001667	GQ140363
	TCC1087	<i>Sturnira lillium</i>	Campo Limpo	GO	FJ001661	
<i>Trypanosoma erneyi</i>	TCC1293	<i>Tadarida sp.</i>	Mozambique		JN040987	
	TCC1294	<i>Tadarida sp.</i>	Mozambique		JN040988	
	TCC1932	<i>Mops condylurus</i>	Mozambique		JN040990	
	TCC1934	<i>Mops condylurus</i>	Mozambique		JN040991	
<i>T. cruzi marinkellei</i>	CBT3	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Confresa	MT	JX845151	
	CBT4	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Confresa	MT	JX845152	
	CBT8	<i>Carollia perspicillata</i>	Confresa	MT	JX845155	
	CBT11	<i>Artibeus planirostris</i>	Poconé	MT	JX845158	
	CBT36	<i>Carollia perspicillata</i>	Poconé	MT	JX845163	
	CBT67	<i>Myotis nigricans</i>	Pinheiros	ES	<u>KF557752</u>	<u>KF557743</u>
	B7	<i>Phyllostomus discolor</i>	São Felipe	BA	AJ009150	AJ620270
	TCC344	<i>Carollia perspicillata</i>	São Paulo	SP	FJ001664	GQ140360
	TCC501	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO	FJ001665	GQ140361
	TCC1702	<i>Artibeus planirostris</i>	Bonito	MS	FJ900244	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Y	<i>Homo sapiens</i>	São Paulo	SP	AF301912	GQ140353
	CLBR	<i>Triatoma infestans</i>	São Paulo	SP	AF245383	GQ140354
	Peru	<i>Homo sapiens</i>	Peru		X53917	
	JJ	<i>Homo sapiens</i>	Barcelos	AM	AY491761	
	TCC463	<i>Cebus albifrons</i>	Barcelos	AM	EU755224	
	NRcl3	<i>Homo sapiens</i>	Chile		AF228685	GQ140357
	TCC186	<i>Homo sapiens</i>	Bolivia		FJ001630	
	TCC862	<i>Euphractus sexcinctus</i>		RN	FJ183397	
	TCC863	<i>Euphractus sexcinctus</i>		RN	FJ549376	
	MT3663	<i>Panstrongylus geniculatus</i>		AM	AF288660	GQ140355
	TCC793	<i>Myotis levis</i>	São Paulo	SP	FJ001634	GQ140358
	TCC1122	<i>Myotis levis</i>	São Paulo	SP		GQ140359
	TCC947	<i>Myotis nigricans</i>	São Paulo	SP	FJ001626	
	TCC949	<i>Myotis nigricans</i>	São Paulo	SP	FJ001627	
	G	<i>Didelphis marsupialis</i>		AM	AF239981	GQ140351
	TCC417	<i>Thyroptera tricolor</i>	Barcelos	AM	FJ001631	
	TCC640	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO	FJ001633	
	TCC642	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO	FJ001624	
	TCC507	<i>Carollia perspicillata</i>	Porto Velho	RO	FJ001632	

^aSequences determined in this study and deposited in GenBank are underlined and bold. Brazilian states:

Espírito Santo (ES); São Paulo (SP); Rondônia (RO); Goiás (GO); Mato Grosso (MT); Bahia (BA); Mato Grosso do Sul (MS); Amazonas (AM); Rio Grande do Norte (RN);

In surroundings of Biological Reserve were sampled 47 dogs and 20 horses in 22 private properties.

Serology were performed only in domestic animals due to the possible amount of blood to be withdraw from small mammals and absence of conjugates and positive controls for all species or groups. All dogs (47) and horses (20) were seronegative to anti-*Leishmania infantum chagasi* antibody. Furthermore, the domestic animals not present skin lesions.

The hemoculture of domestic animals and culture of popliteal lymph node aspirates of dogs were negative to both parasites genus corroborating the serological findings. In wild mammals the prevalence, as evaluated through hemoculture, was 10.38% (16), but only 5.84% (9) to established cultures. All hemocultures positives were from Chiroptera order and the prevalence to this order is 11.54% and 6.52% to positive and established cultures, respectively. The morphology for all positive hemocultures were compatible to the *Trypanosoma* genus and from Phyllostomidae and Vespertilionidae bats families. The established cultures (isolates) were cryopreserved in CBT and some positive hemocultures from *Myotis nigricans* (1), *Desmodus rotundus* (1), *Carollia perspicillata* (4) and *Saccopteryx bilineata* (1), were not established and the few epimastigotes forms in LIT were compatible to *Megatrypanum* subgenus from *Desmodus rotundus* and all others showed similar morphology to *Schizotrypanum* subgenus (Table 3). The screening of primary samples (blood) from all domestic animals and 107 wild mammals were negative to trypanosome DNA barcoding, including the individuals with positive hemoculture, probably by low parasitemia.

The phylogenies based on Trypanosomatid DNA barcoding (V7V8) of SSU rDNA gene sequences obtained in this study were compared with sequences from Genbank and performed by maximum parsimony and Bayesian analysis and identical topologies. The isolates were grouped in *T. dionisii* and *T. cruzi marinkellei* (Figure 2A). From bat isolates were also obtained gGAPDH gene and corroborated the V7V8 topology (Figure 2B). The topologies supported the monophyly of *Schizotrypanum* subgenus (100% bootstrap and 1% Bayesian posteriori probability in both topologies) and aggregated *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. c. marinkellei* and *T. cruzi* species. *T. dionisii* branch included isolates from *Sturnira lillium* (1), *Carollia*

perspicillata (4), *Desmodus rotundus* (1), *Myotis nigricans* (1) and *Lophostoma braziliense* (1) species and well supported (100% bootstrap and 1% Bayesian posteriori) and grouped with Brazilian isolates (Table 2 and Figure 3). Only one isolate from *Myotis nigricans* was grouped in *T. c. marinkellei* branch (100% bootstrap and 100% Bayesian posteriori and 100% bootstrap and 100% Bayesian posteriori to V7V8 and gGAPDH, respectively). This study reports for the first time *T. dionisii* in *Lophostoma braziliense* and *T. c. marinkellei* in vespertilionidae bats (*Myotis nigricans*) and Atlantic Rainforest biome.

Table 3 - Hosts species and hemoculture positivity of small mammals examined in this study

Order	Host		Nº of individuals	
	Genus	Specie	Examined/Positive HE	Total ^a
Chiroptera	<i>Anoura</i>	<i>caudifer</i>	1/0	0
	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	1/0	0
		<i>lituratus</i>	8/0	0
		<i>cinereus</i>	2/0	0
	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	64/8	4
	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	7/2	1
	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	28/0	0
	<i>Micronycteris</i>	sp.	3/0	0
	<i>Mimon</i>	<i>bennettii</i>	2/0	0
	<i>Myotis</i>	<i>nigricans</i>	13/3	2
	<i>Platyrrhinus</i>	<i>recifinus</i>	1/0	0
	<i>Saccopteryx</i>	<i>bilineata</i>	1/1	0
	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	2/1	1
	<i>Lophostoma</i>	<i>braziliense</i>	4/1	1
	<i>Thyroptera</i>	<i>tricolor</i>	1/0	0
	<i>Uroderma</i>	sp.	1/0	0
Didelphiamorphia	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	3/0	0
	<i>Gracilinanus</i>	<i>microtarsus</i>	2/0	0
		sp.	2/0	0
	<i>Marmosa</i>	sp.	2/0	0
	<i>Marmosops</i>	<i>incanus</i>	2/0	0
		sp.	1/0	0
	<i>Micoureus</i>	<i>demererae</i>	1/0	0
	<i>Nasua</i>	<i>nausa</i>	1/0	0
Rodentia	<i>Holochilus</i>	<i>brasiliensis</i>	1/0	0
Total	21	25	154/16	9

^a Total of isolates established and cryopreserved in Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT)

Figure 3 - A, Phylogenetic trees inferred by parsimony based on V7-V8 SSU rDNA gene sequences of 47 trypanosomes and *Trypanosoma rangeli* as outgroup (868 characters, 180 parsimony informative). B, Dendrogram inferred by parsimony analyses based on gGAPDH sequence

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Outubro, 2013

5.4 DISCUSSION

The Atlantic Rainforest is the biome with the highest degree of degradation, which is the original forest type throughout the territory of the Espírito Santo state and which is currently restricted to remnants. The main diseases caused by trypanosomes, Visceral leishmaniasis and American trypanosomiasis, are related to processes of deforestation and colonization accelerated by economic growth since the early twentieth century. The growing process of deforestation of areas of this biome enables the growth of cases of visceral leishmaniasis and American trypanosomiasis.

In Espírito Santo state, Visceral Leishmaniasis was distributed in center-north especially in limits with endemic areas (FALQUETO et al., 2009). However, there is no record of occurrence of the main vector, *Lutzomyia longipalpis*, in these areas (PINTO et al., 2010). Most reports of *L. infantumchagasi* from dogs were serological data, except in Pancas county which was made the parasite isolation (FALQUETO et al., 2009). The serological studies performed using rapid test to *Leishmania* parasites (GRIMALDI JR et al., 2012) and that may occur cross-reactivity with others trypanosomatidae. In addition, *Leishmania braziliensis* were reported by serological and parasitological studies in horses, dogs and vectors (FALQUETO et al., 1986, 1987, 1991, 2003; ROCHA et al., 2010). We not found serological, parasitological and molecular data about the presence of *Leishmania* or *Trypanosoma* parasites in domestic animals.

In Corrego do Veado Biological Reserve were captured 25 species, but 16 species were bats. Others Atlantic Rainforest fragments in Espírito Santo state presenting a larger diversity of small mammals (MOREIRA et al., 2008) when compared to the number found in the Corrego do Veado Biological Reserve, and probably associated with habitat heterogeneity, a major factors that determine the occurrence and distribution of small non-flying mammals (VERA Y CONDE; ROCHA, 2006). The illegal hunting and burning are determinants factors to diversity loss of Corrego do Veado Biological Reserve. Furthermore, there were only two capture campaigns lasting fifteen days and probably a different sample design with monthly collections will add a greater number of species in the area.

The only positive group in parasitological approaches was chiropteran hosts, probably due to low number of others groups caught and the high degree of dispersion bats. The prevalence evaluated by hemoculture were comparable to others Atlantic Rainforest areas and biomes (CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013) (Epub ahead of print)². *T. dionisii* is the only trypanosome species isolated in Atlantic Rainforest biome (CAVAZZANA et al., 2010), exceptionally *T. c. marinkellei* was isolated rein Corrego do Veado Biological Reserve from *Myotis nigricans*.

² MARCILI, A.; COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R.; 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. **The Journal of Parasitology**. 2013. In press.doi: 10.1645/12-156.1. (Epub ahead of print).

T. c. marinkellei is strongly associated with phyllostomid bats (MARINKELLE, 1976; CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013) (in preparation)³ and distributed in Pantanal, Cerrado and Amazonia biomes in Brazil (CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013) (Epub ahead of print)⁴. Results from this study demonstrated that occurrence of *T. c. marinkellei* in Atlantic Rainforest and in Vespertilionidae bats (*Myotis nigricans*) was probably due the location of the Biological Reserve in north of Espírito Santo state and near to São Felipe in Bahia state, local was the first *T. c. marinkellei* Brazilian isolate obtained and the host switch-range by biome fragmentation. Additionally, all wild animals were negative in molecular survey (primary samples) due the low levels of parasitemia displayed by bat hosts that harbor *Schizotrypanum* subgenus.

In sampled animals, the absence of *Leishmania* and *Trypanosoma* species pathogenic for man do not exclude the existence of these parasites in the area. Furthermore, the loss of biodiversity and fragmented habitats may increase the potential risk and dynamics of parasite infection, probable by population density or suitable reservoir. The Atlantic Rainforest, the original forest cover of the territory of the Espírito Santo state, is one of the biomes with the highest degree of degradation in the world, and is currently restricted to small isolated forest remnants, surrounded by agricultural farmlands. The main diseases caused by trypanosomes, Visceral leishmaniasis and American trypanosomiasis, are related to processes of deforestation and colonization accelerated by economic growth since the early twentieth century. The growing process of deforestation of areas of this biome can enable the growth of cases of visceral leishmaniasis and American trypanosomiasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Herbert S. Soares and Felipe Krawczac for their invaluable help during capture, as well as Corrego do Veado Biological Reserve's staff. Luana

^{3,4} MARCILI, A.; COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R.; 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. **The Journal of Parasitology**. 2013. In press.doi: 10.1645/12-156.1. (Epub ahead of print).

D. Centoducatte produced the map. This research was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). ICLA, APC and AM are in receipt of a fellowship from FAPESP and SMG from CNPq.

REFERENCES

ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 175-180, 1961.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-12681, 2000. doi: 10.1016/S0020751900001363. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900001363>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

CAMARGO, E. P. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1998.

CAVAZZANA JR., 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: 22 abr. 2013.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407-414, 2002.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 73-74, 2010. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.08.003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740501>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

DE LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M. A.; AVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memorias do Instituto**

Oswaldo Cruz, v. 103, 412-414, 2008. doi: 10.1590/S0074-02762008000400018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v103n4/430.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2013.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. **Hospital**, 48, p. 61-76, 1955.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI JR, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D.; JESUS, A. C.; ALENCAR, J. T. A. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., G. Crosssectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 559-565, 2009.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHOPAES, L.; GRIMALDI JR, G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1003-1010, 2003.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B.; BARROS, G. C.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 499-500, 1991.

FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B.; SESSA, P. A. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 443, 1987.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Records**, v. 136, p. 514-516, 1995.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T. M.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 200-201, 2008. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.10.001. Disponível em: <trstmh.oxfordjournals.org/content/102/2/200.abstract>. Acesso em: 12 jul. 2013.

GRIMALDI JR., G.; TEVA, A.; SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 966-971, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0040. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366541/>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

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 jun. 2013.

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: 17 jul. 2013.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals**: a zoological monograph. Oxford, UK.: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001. doi: 10.1126/science.1065889.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, C. Z. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania (L.) donovani* in Pará State, Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 741-745, 1969.

MAIA DA SILVA, F. M.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; 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, pt. 5, p. 549–561, 2004b. doi: 10.1017/S0031182004005931. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=252434>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.;

BRIGIDO, M. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R.; TAKEFA, G. F.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker.

Parasitology, v. 128, p. 283–294, 2004a.

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. A new genotype of *Trypanosomacruzi* 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, 2009b. doi:

10.1017/S0031182009005861. Disponível em:

<<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5531824>>. Acesso em: 13 maio 2013.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; DA SILVA, F. M.; PINTO, A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009a. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.09.015. Disponível em:

<<http://www.yumpu.com/en/document/view/2354834/trypanosoma-cruzi-in-brazilian-amazonia-lineages-tci-and-tciia->>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

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

MOREIRA, D. O.; COUTINHO, B. R.; MENDES, S. L. O status do conhecimento sobre a fauna de mamíferos do Espírito Santo baseado em registros de museus e literatura científica. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 163-173, 2008.

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

ROCHA, L. S.; DOS SANTOS, C. B.; FALQUETO, A.; GRIMALDI JR., G.; CUPOLILLO, E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitology Research**, v. 107, p. 465-468, 2010. doi: 10.1007/s00436-010-1903-1. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00436-010-1903-1.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; PINTO, I. S.; DOS SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 35, p. 325-332, 2010. doi: 10.1111/j.1948-7134.2010.00090.x. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1111/j.1948-7134.2010.00090.x>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

SAVANI, E. S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.;

ZAMPIERI, R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantumchagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 229-233, 2004.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 168–174, 2006. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149220600050X>>. Acesso em: 7 jul. 2013.

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.

TEIXEIRA, M. M. 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. doi: 10.1017/s0031182005008929. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=40559>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; 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.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. Didelphis marsupialis, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 557-565, 1994.

VERA Y CONDE, C. F.; ROCHA, C. F. D. Habitat disturbance and small mammal richness and diversity in an Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 983-990, 2006.

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, 1976. p. 1-34.

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

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, A. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, M. R.; GRECO, 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, p. 595–605, 2008. doi: 10.1017/S003118200800512X. Disponível em:

<http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FPAR%2FPAR135_05%2FS0031182008004253a.pdf&code=c2e13b2a44f94edcb38b329bcd41b762>. Acesso em: 15 abr. 2013.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. **Chave para a determinação de quirópteros brasileiros**. São José do Rio Preto: Francal, 1973. 72 p.

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

6 MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF A NEW SPECIES OF TRYPANOSOME IN *Tapirus terrestris* (BRAZILIAN TAPIR), *Trypanosoma teixeirae* SP. NOV., IN ATLANTIC RAINFOREST OF SOUTHEASTERN BRAZIL

6.1 INTRODUCTION

The species of the genus *Trypanosoma* parasites all vertebrate classes (mammals, fish, amphibians, reptiles and birds) and present life cycles with alternation between vertebrates and invertebrates. Most *Trypanosoma* species develop in arthropod vectors, which may belong to different orders and families, while amphibians and fish parasites are transmitted by insects and leeches. Other species, such as *T. evansi*, are transmitted only mechanically. The species of this genus have several life cycle stages, presented in different combinations in the blood and/or tissues in vertebrate and invertebrate hosts (HOARE 1972; VICKERMAN 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006).

The genus *Trypanosoma* is monophyletic and has a common ancestor with all species of mammals, birds, reptiles, amphibians and fish (HOLLAR; MASLOV, 1997; WRIGHT et al., 1999; HAAG et al., 1998; STEVENS et al., 1998, 1999b, 2001; LUKES et al., 2002; SIMPSON et al., 2002; HAMILTON et al., 2004). In most recent phylogenetic trees (HAMILTON et al., 2004, 2005b, 2007; SIMPSON et al., 2006) three major clades were defined: *T. brucei*, *T. cruzi* and aquatic clade (trypanosomes of fish and amphibians). Smaller clades were also well established for other species: *T. lewisi*, *T. theileri*, *T. avium* / *T. corvi*, *T. grayi* and trypanosomes from lizards and snakes (STEVENS et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003, 2006; HAMILTON et al., 2005a, 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008a). Recently, new species from bats, rodents and marsupial were described in Australia and Africa (LIMA et al., 2012).

The Perissodactyla order comprises ungulate mammals of three different Families: Equidae (horses, donkeys and zebra), Rhinocerotidae (rhinos) and Tapiridae (Tapirs) (WILSON; REEDER, 2005). Only four species have been described in Tapiridae, two in South America (*Tapirus terrestris* and *Tapirus*

pinchaque), one in Central America (*Tapirus bairdii*) and one in Asia (*Tapirus indicus*). In America, *T. terrestris* is widely distributed in South America, including Colombia, Venezuela, Suriname, Guyana, French Guiana, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil, Paraguay and Argentina.

The tapir has important ecological roles in the formation and maintenance of biological diversity (EISENBERG, 1990; JANZEN, 1981). However, the species is currently listed by the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as "Vulnerable to Extinction" due to population decline occurred in the past thirty-three years (three generations) caused by illegal hunting, trampling, habitat loss and fragmentation and competition with livestock (IUCN, 2008).

Diseases also are often mentioned as a serious threat to the conservation of species (FIORELLO et al., 2006). In both captive and wild tapir populations, pathogens were diagnosed, such as bacteria, fungi, worms and ectoparasites (MANGINI et al., 2002; ALDÁN et al., 2006; MINERVINO et al., 2010; MURAKAMI et al., 2012). However, there is only a single report of *T. evansi* infecting tapirs (*Tapirus indicus*) in Indonésia (CURASSON, 1943) and since then there have been no data available of *Trypanosoma* parasites of this mammalian specie.

In the present study we inferred phylogenetic relationships of *Tapirus terrestris* trypanosome and others species based on SSU rDNA and gGAPDH gene sequences. Additionally phylogenies, morphological data, including scanning electron microscopy, were used in description of new species, *Trypanosoma teixeirae* sp. nov., from *Tapirus terrestris* in Atlantic Rainforest captured in areas of Atlantic Rainforest of southeastern Brazil.

6.2 MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Study areas and tapirs caught

Individuals of wild Brazilian Tapirs (*Tapirus terrestris*) were captured in Atlantic Rainforest fragments in Espírito Santo state. The RPPN Recanto das Antas (private

reserve) (2202 ha) and it is located in Linhares county (19°5'S, 39°58'W) comprising almost primary vegetation. The Corrego do Veado Biological Reserve (2382 ha) is located in Pinheiros county (40° 08'S, 18° 20'W) in northern of state and is one of the last remaining of Atlantic Rainforest in the region, since the natural vegetation has been replaced by agriculture and pasture. The individuals kept in captivity were from different Brazilian states (São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais and Paraná).

The wild tapirs were caught between November/2011 and July/2012 using the box-trapping and captivity tapirs were caught between January/2012 and March/2012. The tapirs were anesthetized according to Mangini (2001) and blood samples were collected by means of cephalic vein puncture. The animals were caught and manipulated in accordance with the recommendations of the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA).

6.2.2 Isolation of tapir trypanosomes through culturing

To detect the presence of trypanosomes, the blood samples were inoculated into vacutainer tubes containing a biphasic medium consisting of 15% sheep red blood cells as solid phase (blood agar base), overlain by liquid LIT medium supplemented with 20% FBS (MARCILI et al., 2009; MARCILI et al., 2013⁵). The culture was incubated at 28 °C and grown in LIT medium for DNA preparation, and the isolates were cryopreserved in liquid nitrogen in the Brazilian Trypanosomatid Collection (Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos, CBT), in the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil. Blood samples were fixed in ethanol (primary samples) to molecular detection.

⁵ MARCILI, A.; COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R.; 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. **The Journal of Parasitology**. 2013. In press. doi: 10.1645/12-156.1. (Epub ahead of print).

6.2.3 Growth behavior and Morphological characterization

Epimastigotes and metacyclic trypomastigotes (1×10^6 parasites) were employed to infect monolayers of mammalian cells (Vero and J774) cultivated in RPMI medium with 10% FBS, at 28°C and insect cells (C6/36 and SF9) cultivated with L15 and SF9 II, respectively, with 10% FBS at 28°C.

Smears of culture from LIT medium in logarithmic and stationary phase from isolates CBT 41, CBT 60 and tapir's blood and were fixed in methanol and stained with Giemsa to light microscopy.

For scanning electron microscopy, trypanosomes from CBT 46 axenic culture in LIT medium was fixed in Karnovsky (v/v) in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2h. After fixation, the parasites were adhered to 0,1% poly-L-Lysine in cover lips and dehydrated in ascending ethanol series and acetone (95%) and critical point and sputtered with gold. The material processed was observed in HITACHI TM3000 digital scanning microscopy. For transmission electron microscopy, the culture was fixed in glutaraldehyde (2.5%) in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4). After fixation, the parasite mass was included in agar (2%).

For transmission electron microscopy, trypanosomes from CBT46 in logarithmic phase were fixed in 2.5 % glutaraldehyde fixative solution in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h. Two 15-min washes in cacodylate buffer followed this process. Post fixation was performed in 1 % osmium tetroxide in 0.1 M in the same buffer (pH 7.2) for 2 h in darkness, followed by another two 15-min washes in the same buffer. To increase the contrast, material was immersed in a solution of 2 % uranyl acetate in 10 % ethanol, for 2 h. Dehydration was performed in a graded acetone series (50, 70, 90, 95, and 100 %) for 10 min each. Then, the material was embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 h, following pure Epon resin, and incubated at 60°C for 48 h. Grids containing ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate (REYNOLDS, 1963) for 45 min and 10 min, respectively. Then, they were analyzed and photographed in a Philips CM 100 TEM from the Biology Department at the Biosciences Institute, UNESP, campus of Rio Claro, SP, Brazil.

6.2.4 Molecular and Phylogenetic analysis

The DNA of cultures samples were extracted from the trypanosome cultures using the phenol-chloroform method, and primary samples (blood preserved in ethanol) were purified using the Wizard DNA Clean-Up System (Promega). The DNA samples were subjected to the conventional polymerase chain reaction (PCR) for full-length of SSU rDNA and gGAPDH genes and previously described (FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008; LIMA et al., 2012). The trypanosome barcoding were used detected the presence of trypanosomes in primary samples (MARCILI et al., 2009; LIMA et al., 2012; MARCILI et al., 2013) (Epub ahead of print)⁶. PCR products of the expected size were purified and sequenced in an automated sequencer (Applied Biosystems/PerkinElmer, model ABI Prism 310 Genetic, Foster City, California), in accordance with the manufacturer's recommendations. All these sequences were retrieved from GenBank (Accession numbers 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. granulosum* (AJ620551/AJ620246), *T. sp.* CLAR (AJ620555/AJ620251), *T. sp.* Gecko (AJ620548/AJ620259), *T. varani* (AJ005279/AJ-620261), *T. cascavelli* (EU095837/FJ236511), *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* Rook (U39578/AJ620262), *T. avium* Chaffinch

⁶ MARCILI, A.; COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R.; 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. **The Journal of Parasitology**. 2013. In press.doi: 10.1645/12-156.1. (Epub ahead of print).

(AJ009140/AJ620263), *T. sp.* D30 (AJ009165/AJ620279), *T. theileri* (AJ009164/AJ620282), *T. cyclops* (AJ131958/AJ620265), *T. sp.* TL.AQ.22 (AJ620574/AJ620280), *T. sp.* ABF (AJ620564/AJ620278), *T. sp.* H25 (AJ009168/AJ620276), *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) and *T. copemani* (AJ620588/GU966586).

The sequences obtained were aligned with sequences previously determined for other trypanosomatid species available in Genbank using ClustalX (THOMPSON et al., 1997) and were adjusted manually using GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997).

The full-length SSU rDNA and gGAPDH sequences were concatenated with 2898 characters obtained were used to construct a phylogenetic tree using maximum parsimony, as implemented in PAUP version 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) with 500 bootstrap replicates, random stepwise addition starting trees (with random addition sequences) and TBR branch swapping. Bayesian analysis was performed using MrBayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) with four independent Markov chain runs for 1,000,000 metropolis-coupled MCMC generations, sampling a tree every 100th generations. The first 25% trees represented burn-in, and remaining trees were used to calculate Bayesian posterior probability.

6.3 RESULTS

6.3.1 Culture of Tapir trypanosomes

Blood samples were collected from three wild individuals and captured in three different areas of the Atlantic Rainforest in the state of Espírito Santo: Corrego do

Veado Biological Reserve in the municipality of Pinheiros; Recanto das Antas Private Reserve in the municipality of Linhares; and in the municipality of Marechal Floriano. Were also sampled 21 individuals kept in captivity in several Brazilian states. All wild tapirs were positive to trypanosome parasites in culture medium, contrasting with individuals kept in captivity that were negative in hemoculture, except one individual held captive from Marechal Floriano which was hemoculture positive. The prevalence was 100% and 4.7%, to wild and captive Brazilian, respectively.

Blood samples (primary samples) of all individuals of *Tapirus terrestris* captured were used to molecular screening with trypanosomatid barcoding. All individuals sampled were negatives, include the free-living tapirs with positive hemocultures.

6.3.2 Growth Behaviour and Morphology

The three isolates were able to growth in LIT, RPMI and TC-100 media with 10% of FBS. Monolayers of Vero, C6/36 and SF9 cells propitiated the growth of parasites, but it was not possible to verify the infection in insect and mammalian cells. In J774 cells (macrophages lineage) there were no growth of trypanosomes. Additionally, metacyclic trypomastigotes were inoculated into Balb/c mice and no infection was detected by microhematocrit or hemoculture.

Epimastigotes forms did not present free flagellum and typical movement of this form were large and wide (Figure 4a-d). The epimastigotes only grew in rosettes grouped by the anterior region (Figure 4a-c) and the darkly stained structure was similar to a flagellar sheath (Figure 4c.d). These forms exhibited a rounded and large kinetoplast positioned near to nucleus (Figure 4a-d). Metacyclic trypomastigotes forms were slender, long and the kinetoplast more distant to the posterior end (Figure 4e-g).

The flagellum was almost the size of trypomastigote body. *Trypanosoma teixeirae* did not show amastigotes or spheromastigotes forms in axenic culture or

monolayers cells. No trypomastigotes forms were detected in blood smears of positive tapirs.

The scanning electron microscopy of culture forms of *T. teixeirae* display an interesting set of morphological characteristics uncommon among trypanosomes. Epimastigotes forms of *T. teixeirae* were organized in rosettes linked by flagellar region, but no free-flagellum was evidenced (Figure 5a-f). In stationary phase and during the metacyclogenesis, the epimastigotes forms detached from rosettes (Figure 5f-h) and elongate (Figure 5i,l,m). This process showed a structure similar to a pocket that shelter the flagellum (Figure 5g,h). In metacyclic trypomastigotes the flagellum emerged below the region of the kinetoplast and remained attached to the plasma membrane upon the anterior region with a long free segment and the undulate membrane very narrow (Figure 5j,n,o).

The transmission electron microscopy identified ultrastructural organization common to others *Trypanosoma* species, such as single mitochondria, nucleus and kinetoplast (Figure 6 a-d). The trypanosomes have a large and loose arrangement kinetoplast (Figure 6. c,d). Structural profiles compatible with contractile vacuole could be observed near the flagellar pocket (Figure 6b). Multiple Lisosomes (Figure 6b;d), reservosomes (Figure 6b), a cytostome (Figure 6b), flagellum and paraxonemal structure (Figure 6 c-e) and well developed flagellar pocket (Figure 6 d-e). Basal bodies in a structure that a shelter the flagellum in epimastigotes forms (Figure 6 f).

Figure 4 - Photomicrographs (Giemsa-stained) of culture forms from LIT of *Trypanosoma teixeirae* sp. nov. Epimastigotes forms arranged in rosettes and kinetoplast and nucleus evidenced (a-d) without free flagellum (c-d) and flagellar sheath (*). Metacyclic trypomastigotes forms were slender and long (e-g). N, nucleus; K, kinetoplast; F, flagellum

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Outubro (2013)

Figure 5 - Scanning electron microscopy of *T. teixeirae*. Epimastigotes forms in rosettes (a-f) or separate (f-h), twisted epimastigotes (g) in metacyclogenesis (i,j,m) and flagellar sheath (h). Cytostome indicating by arrows (h,m). Metacyclic trypomastigotes forms with long free flagellum (j,n,o) and undulating membrane undeveloped, indicating by arrows (n,o). Scale bar 10µm

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Outubro (2013)

Figure 6 - Transmission electron microscopy of *T. teixeirae*. Ultrastructural organization common to Trypanosoma, mitochondria, nucleus and kinetoplast (a-d). Kinetoplast large and loose (c,d). Multiples Lisosomes (b,d), reservosomes (b), cytostome (b). Flagellum and paraxonemal structure (c-e), well developed flagellar pocket (d-e) and basal bodies in a structure that a shelter the flagellum in epimastigotes forms (f). Contractile vacuole (*). M, mitochondria; N, nucleus; K, kinetoplast; F, flagellum; R, reservosomes; L, lisosomes; Cy, cytostome; FP, flagelar pocket; PR, paraxial rod; BB, basal bodies

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Outubro, 2013

6.3.3 Phylogenetic analysis

The sequence of SSUrDNA and gGAPDH obtained for three *T. teixeirae* isolates demonstrated low intraspecific divergence (~0,98%) and BLAST analysis

shown that these isolates were closest to crocodiles trypanosomes (*T. grayi* and *T. sp* from Brazilian cayman).

Phylogeny based in concatenated SSUrDNA and gGAPDH genes and inferred by parsimony and Bayesian analyses generated trees with identical topologies and presenting the same general pattern described by *Trypanosoma*, with the clades of trypanosomes well supported. In all inferred trees the *T. teixeirae* isolates were grouped together and were distinct of others trypanosome species and ungrouped with clades known (Figure 7). The isolates of *Tapirus terrestris* (*T. teixeirae*) from Brazil formed a new Clade with high divergence between the major clades known, 9.67% to 28.89% with *T. grayi* and Australian trypanosomes species (*T. copemani*, *T. gilletti*, *T. sp* Tick and others) clades, respectively. *T. teixeirae* isolates still presented 11.94%, 13.15%, 13.41%, 13.88%, 14.55%, 14.38%, 16.09% and 19.88% with Lizard/Snakes, *T. cruzi*, *T. avium*, *T. lewisi*, Aquatic, *T. brucei* and *T. theileri* Clades, respectively. The high divergences between the *T. teixeirae* and the others species or major clades of trypanosome genus and the tree topology demonstrate that this new species forms a new clade in monophyletic group of trypanosomes (Figure 7).

According to these results, we designating a new specie and new clade named *Trypanosoma teixeirae*.

6.4 DISCUSSION

In this study, morphological analysis based on optical microscopy, transmission and scanning electron microscopy and phylogentic positioning enabled the description of new specie, *Trypanosoma teixeirae* n. sp. from *Tapirus terrestris*. This is the first description of trypanosome in *Tapirus terrestris* (Brazilian Tapir), the largest mammal in America. The singular morphology with epimastigotes forms large and wide without free flagellum and typical movement. Concatenated phylogeny (SSU rDNA and gGAPDH genes) showed high divergences when compared with others trypanosome clades and the *T. teixeirae* isolates were positioned in a new clade named *T. teixeirae* clade.

Figure 7 - Phylogenetic tree based on concatenated SSU rDNA and gGAPDH genes sequences of 51 trypanosome isolates using non-trypanosome trypanosomatids as outgroup (2898 characters, 875 parsimony-informative sites) was employed for Parsimony and Bayesian methods. Numbers at nodes are support values for the major branches (bootstrap/posterior probability; 500 replicates). *T. teixeirae* clade are bold and in gray box

Fonte: Laboratório de Doenças Parasitárias, Outubro (2013)

The morphological characteristics evidenced by optical microscopy and transmission electron and scanning are mostly similar to other species of trypanosomes, with the exception of the absence of free flagella in epimastigotes.

This characteristic has been described only in a trypanosome infecting kangaroos in Australia which also has no free flagellum in epimastigotes, but only described in optical microscopy (NOYES et al., 1999). The authors describe this structure as hemidesmosomes with membership function in the gut of the invertebrate hosts or vectors (NOYES et al., 1999).

T. teixeirae was able to grow in culture media and cells demonstrating low nutritional requirements, but was not capable of infecting BALB/c mice suggesting the specificity of the vertebrate host-parasites association. However, experimental infections with other mammals of the order Perissodactyla, like horses, are still needed.

The phylogenies based on whole SSU rDNA and gGAPDH alone or concatenated analysis has been used to positioning new trypanosomatids species and genera (VIOLA et al., 2009a; TEIXEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013). The divergence between *T. teixeirae* isolates and others species ranged from 9.67% to 28.89% making it difficult to assess accurately the positioning of the new species described in *Trypanosoma* clades and a new clade was proposed for *T. teixeirae* classification.

The vectors of the brazilian tapir trypanosomes are not known. These hosts can be infested by *Amblyomma* sp. ticks (LABRUNA; GUGLIELMONE 2009), Hipoboscidae diptera (GRACIOLLI et al., 2011), leechs (CABALLERO, 1957) and probably culicids and tabanids and these are possible vectors of *T. teixeirae*. Ungulates *Trypanosoma* species, like as *T. theileri*, *T. vivax* and *T. evansi* can be transmitted by many hematophagous dipteras (RODRIGUES et al., 2010; GARCIA et al., 2011).

Among tapirs in captivity sampled only one was positive and all wild individuals were positive. This unique captivity animal infected by *T. teixeirae* escaped of captivity area and was free-living in sylvatic environment for six months before collection of blood samples. Animals kept in captivity are regularly treated

against ectoparasites, unlike wild tapirs that are constantly exposed to possible vectors.

The Perissodactyla order is a small group of mammals that appeared during the Paleocene, in North America, Latin America, Europe and Asia, becoming widely distributed, except Australia and Antarctica (RADINSKY, 1966; MCKENNA; BELL, 1997). Divergence of Perissodactyla occurred on the continent Laurasia t about 56 million years ago, a scenario supported by paleontological and molecular data (PROTHERO; SCHOCH 1989; XU et al., 1996; TOUGARD et al., 2001; MURPHY et al., 2007) The Perissodactyla families were well represented in the Eocene fauna, including the largest terrestrial mammal. In Oligocene, the number of Perissodactyla began to disappear, leaving a total of three families (Equidae, Tapiridae and Rhinocerotidae) (CAETANO et al., 1999; PENEDO et al., 2005).

The Tapiridae family is composed by a single Genus *Tapirus*. The oldest fossil record of this family are dated to the Oligocene of Europe (from 33 million to 37 million years ago) and were frequently found in Europe, North America and Asia (HULBERT 1995). The earliest record of *Tapirus* was in Oligocene and the fossil data can be found until the Pleistocene (MCKENNA; BELL, 1997). In North America, *Tapirus* records indicate that they were present in the Middle Miocene (HULBERT, 1995), while in Asia the records indicate that *Tapirus* has existed since the lower Miocene About twenty different species *Tapirus* are recognized to Europe, America North America and Asia (DENG, 2006).

The Tapiridae comprises four species, two are present in South America (*Tapirus terrestris* and *T. pinchaque*), one in Central America (*Tapirus bairdii*) and Asia (*Tapirus indicus*). *T. terrestris* is widely distributed in much of South America, including Colombia, Venezuela, Suriname, Guyana, French Guiana, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil, Paraguay and Argentina. *T. pinchaque* is geographically found in Northern and Central Andes and is adapted to live in high altitude mountains in Venezuela, Colombia, Ecuador and northern Peru. *T. bairdii* is distributed from southeastern Mexico and throughout Central America the western Andes, Chocó in Colombia and Ecuador. *T. indicus* live in a very fragmented Vietnam, Cambodia, Burma, Sumatra, Thailand, Malaysia and Toba islands (BROOKS et al., 1997).

The high divergence values between *T. teixeirae* and others *Trypanosoma* species suggested that oldest divergence happened along with their hosts. New studies should be conducted with others *Tapirus* and *Perissodactyla* species to confirm coevolutionary patterns.

Tapirus terrestris is considered the largest land mammal in South America and their geographical distribution extends throughout South America east of the Andes from Venezuela to northeastern Argentina and Paraguay. The species occurs in 11 countries including Argentina, Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, French Guiana, Guyana, Paraguay, Peru, Suriname and Venezuela (NOWAK; PARADISO, 1983; TABER et al., 2006; MEDICI et al., 2007). The tapir has important ecological roles (JANZEN, 1981) in the formation and maintenance of biological diversity (EISENBERG, 1990). However, this species is critically endangered.

The population decline or local extinction of these animals may trigger a series of negative effects on ecosystems (TABER et al., 2006), destabilizing some ecological processes such as dispersal and seed predation (TÓFOLI, 2006), the colonization of plant species and cycling nutrients among others, thus compromising the integrity and biodiversity of the ecosystem in the long-term (BROOKS et al., 2002).

The Atlantic Rainforest is one of the most threatened biomes on the planet. At the time of the discovery of Brazil, the Atlantic Rainforest covered 1.4 million km² and extended from the Rio Grande do Sul to Rio Grande do Norte (TABARELLI et al., 2005a). Currently, the Atlantic is reduced to about 7% of its original length and over 80% of the fragments are less than 50 hectares (RIBEIRO et al., 2009). Despite the removal of this biome, the survival and persistence of tapir populations may be favored by the ability of these animals to move into habitats available and appropriate (NOSS et al, 2003; MEDICI, 2010; CENTODUCATTE et al., 2011).

Moreover, the diseases are often referred to as a serious threat to the conservation of species (FIORELLO et al., 2006). Little known about the sanity and general factors affecting the Brazilian tapir in the natural environment (MANGINI; MEDICI et al., 2001) and most of the information about diseases of captive tapirs are coming from (MANGINI, 2007) . Infections *Streptococcus*, *Klebsiella*, *corynebacteria*, *Actinomyces* (ALEXANDER, 1978), *Fusobacterium*, *Salmonella* and *Campylobacter*,

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Leptospira* spp, (MANGINI, 2007), *Ballantidium* spp, *Clostridium* spp, *Mycrosporium gypseum*, *Mycrosporium kennels*, *Trichophyton tonsurans* (ALEXANDER, 1978); herpesviroses and Giardia, and mouth disease, babesiosis (VROEGE; ZWART, 1972), *Tapironema coronatum* (DURETTE-DUSSET et al., 1997), *Sarcoptes* hut, *Calpe eustrigata*, *Fasciola hepatica*, schistosomiasis (JANSSEN, 1999; MEDICI et al., 2001; MANGINI, 2007) have been described in Brazilian tapirs. This is the first study to research, isolation and phylogenetic position of trypanosomes in Brazilian tapirs and there is a single report of *T. evansi* infection in *T. indicus* (CURASSON, 1943).

The Brazilian tapir habitat is increasingly threatened and fragmented due to the increase in human population densities and demand for livestock products increasing the exchange of pathogens between wild and domestic animals. Further studies should be conducted to evaluate the pathogenicity *T. teixeirae* for the Brazilian tapir can help in population decline of a species as endangered and further assess the presence and pathogenicity for domestic animals.

Taxonomyc position

Phylum Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981

Class Kinetoplastea Konigberg, 1963

Order Trypanosomatidae (Kent 1880) Holande, 1952

Family Trypanosomatidae Doflein, 1901

Trypanosoma teixeirae n. sp.

Acosta and Marcili

Morphology. Epimastigotes forms do not have free flagellum and typical movement. The epimastigotes only grow in rosettes grouped by the anterior and exhibited a rounded and large kinetoplast positioned near to nucleus. Metacyclic trypomastigotes forms were slender, long and the kinetoplast more distant to the posterior end. The flagellum was almost the size of trypomastigote body. Data on blood trypomastigotes are not available.

Type host. Mammalia, Perissodactyla, Tapiridae, *Tapirus terrestris*.

Vector. Unknown.

Type locality. The specimen were captured in South-eastern Brazil, Atlantic Rainforest biome, Espírito Santo State, Pinheiros county, Córrego do Veado Biological Reserve (40° 08' 48"S, 18° 20' 33"W)

Type material. Hapantotype, culture of the isolate CBT 60; paratypes, cultures CBT 46 and CBT 61. The cultures were deposited at the Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos of Faculty of Medicine Veterinary of University of São Paulo, Brazil.

Gene sequences. The SSU rDNA (KF586847/KF586846/KF586848) and gGAPDH (KF586844/KF586843/KF586845) sequences from *Trypanosoma teixeirae* hapantotype (CBT 60), and paratyped (CBT 46 and CBT 61), respectively are deposited.

Etymology. The name is given in honour of Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira, a great researcher of the diversity and phylogenetic relationships of trypanosomatidae Family.

Comments. The hosts of paratypes CBT 46 and 61 were caught in South-eastern Brazil, Atlantic Rainforest biome, Espírito Santo State, Linhares (19°5'S, 39°58') and Marechal Floriano (20°, 24' 46"S, 40° 40' 59"W) county, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful Corrego do Veado Biological Reserve's staff. Pró-Tapir, Instituto Marcos Daniel and FIBRIA. This research was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). ICLA, APC and AM are in receipt of a fellowship from FAPESP and SMG from CNPq.

REFERENCES

- ALDÁN, E. C.; TORRES, I. L.; ANDRADE, D. M. G. Parásitos Del tapir centroamericano *Tapirus bairdii* (Perissodactyla: Tapiridae) em Chiapas, México. **Biological Tropical**, v. 54, p. 445-450, 2006.
- ALEXANDER, I. D. Actinomyces infection in a tapir (*Tapirus terrestris*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 9, p. 124-125, 1978.
- BERT, R. C. The giant tapir, *Tapirus haysii*, from Leisey Shell Pit 1A and other Florida Irvingtonian localities. **Bull Fla Mus Nat Hist**, v. 37, p. 515-551, 1995.
- BROOKS, D. M.; BODMER, R. E.; MATOLA, S. Tapirs - Status Survey and Conservation Action Plan. **IUCN/SSC Tapir Specialist Group**. Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, Gland, 1997. p. 164.
- BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; KONSTANT, W. R.; FLICK, P.; PILGRIM, J.; OLDFIELD, S.; MAGIN, G.; HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation Biology**, v. 16, p. 909-923, 2002.
- CABALLERO, C. E. Description of a new species of leech, coming from the forests of the state of Chiapas. **Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México**, v. 28, p. 241-245, 1957.
- CAETANO, A. R.; SHIUE, Y.; LYONS, L. A.; O'BRIEN, S. J.; LAUGHLIN, T. F.; BOWLING, A. T.; MURRAY, J. D. A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). **Genome Research**, v. 9, p. 1239-1249, 1999.
- CENTODUCATTE, L. D.; MOREIRA, D. O.; SEIBERT, J. B.; GONDIM, M. F. N.; ACOSTA, I. C. L.; GATTI, A. *Tapirus terrestris* occurrence in a landscape mosaic of Atlantic Forest and Eucalyptus monoculture in southeast Brazil. **Tapir Conservation**, v. 20, p. 16-19, 2011.
- DENG, T. Paleoecological comparison between late Miocene localities of China and Greece based on Hipparion faunas. **Geodiversitas**, v. 28, p. 499-516, 2006.
- DURETTE-DUSSET, M. C.; CHABAUD, A. G.; SUTTON, C. A. *Tapironema coronatum* n. gen., n. sp. (Trichostrongyloidea – Cooperidae – Obeliscoidinae), parasite of *Holochilus brasiliensis* and *Tapirus terrestris*. **Parasite**, v. 4, p. 227-232, 1997.
- EISENBERG, J. F. Neotropical mammal communities. In: GENTRY, A. H. (Ed.). **Four neotropical forests**. New Haven: Yale University Press, 1990. p. 358-368.
- FERREIRA, R. C.; DE SOUZA, A. A.; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BARRETT, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. 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**

Eukariotic Microbiology, v. 55, p. 427-435, 2008.

FIORELLO, C. V.; NOSS, A. J.; DEEM, S. L. Demography, hunting ecology, and pathogen exposure of domestic dogs in the Isoso of Bolivia. **Conservation Biology**, v. 20, p. 762–771, 2006.

GARCIA, H. A.; RODRIGUES, A. C.; MARTINKOVIC, F.; MINERVINO, A. H.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; PAIVA, F.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **International Journal of Parasitology**, v. 13-14, p. 1385-1396, 2011.

GRACIOLLI, G.; AZEVEDO, A. A. Ectoparasites of bats (Chiroptera: Furipteridae), with a description of a new species of *Synthesiostrebla* Townsend (Diptera: Streblidae) on the east side of the Andes, South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, p. 501-504, 2011.

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, p. 37-49, 1998.

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 Phylogenetic Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

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 of Parasitology**, v. 34, p. 1393-1404, 2004.

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 of Parasitology**, v. 35, p. 431-443, 2005a.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammals**: a Zoological Monograph. Oxford, UK.: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HOLLAR, L.; MASLOV, D. A. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 89, p. 295-299, 1997.

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

IUCN. The world conservation union. **Red List of Threatened Species**. 2008. Disponível em: <[http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 25 Jan. 2013.

JANSSEN, D. L.; RIDEOUT, B. A.; EDWARDS, M. S. Tapir medicine. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**: current therapy 4. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999. p. 562–568.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, 1981. 281 p.

LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of New World tapirs. **Tapir Conservation**, v. 18, n. 25, p. 21–28, 2009.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. *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.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA network: evolution of na improbable structure. **Eukaryot Cell**, v. 1, p. 495–502, 2002.

MANGINI, P. R. Perissodactyla – Tapiridae (Anta). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 589-614.

MANGINI, P. R.; MEDICI, E. P. Sanitary evaluation of wild populations of *Tapirus terrestris* at the Pontal do Paranapanema Region, São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL TAPIR SYMPOSIUM, 1., 2001, San Jose. **Anais...** 2001.

MANGINI, P. R.; MORAIS, W.; SANTOS, L. C. Enfermidades observadas em *Tapirus terrestris* (anta brasileira) mantidas em cativeiro em Foz do Iguaçu, Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 5, p. 93-102, 2002.

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. 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.

MCKENNA, M.; BELL, S. **Classification of mammals above the species level**. New York: Columbia University Press, 1997. p. 165.

MEDICI, E. P. **Assessing the viability of lowland tapir populations in a fragmented landscape**. 2010. 276 f. Tese (Doutorado em Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology, University of Kent, Canterbury, United Kingdom, 2010.

MEDICI, E. P.; DESBIEZ, A. L. J.; SILVA, A. G.; JERUSALINSKY, L.; CHASSOT, O.; MONTENEGRO, O. L.; RODRIGUEZ, J. O.; MENDOZ, A.; QUSE, V. B.; PEDRAZA, C.; GATTI, A.; OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R.; TORTATO, M. A.; RAMOS JR., V.;

- REIS, M. L.; LANDAU-REMY, G.; TAPIA, A.; MORAIS, A. A. Lowland *Tapir* (*Tapirus terrestris*) Population and Habitat Viability Assessment (PHVA): final report. In: LOWLAND TAPIR CONSERVATION WORKSHOP, SOROCABA, 2007, Sorocaba. **Anais...** TSGL. 2007.
- MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; PENA, H. F. J.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. **Journal Of Zoo And Wildlife Medicine**, v. 41, p. 572-574, 2010.
- MURAKAMI, M. C.; SHIMADA, Y.; HIRANO, H. Two new extinct basal phocoenids (Cetacea, Odontoceti, Delphinoidea), from the Upper Miocene Koetoi Formation of Japan and their phylogenetic significance. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 32, p. 11472-1185, 2012.
- MURPHY, W. J.; PRINGLE, T. H.; TESS, A.; CRIDER, T. A.; SPRINGER, M. S.; MILLER, W. Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. **Genome Research**, v. 17, p. 413-421, 2007a.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR, H. B.; DEERFIELD, D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Embnew News**, v. 4, p. 14, 1997.
- NOSS, A. J.; CUÉLLAR, R. L.; BARRIENTOS, J.; MAFFEI, L.; CUÉLLAR, E. A Camera trapping and radio telemetry study of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in Bolivian Dry Forest. **Tapir Conservation**, v. 12, p. 24–32, 2003.
- NOWAK, R. M.; PARADISO, J. L. **Walker's mammals of the world**. 4. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- NOYES, H. A.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. 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 of Parasitology**, v. 29, p. 331–339, 1999.
- PENEDO, M. C. T.; MILLON, L. V.; BERNOCO, D. International equine gene mapping workshop report: a comprehensive linkage map constructed with data from new markers and by merging four mapping resources. **Cytogenetic Genome Research**, v. 111, p. 5-15, 2005.
- PROTHERO, D.; SCHOCH, R. **The evolution of perissodactyls**. New York: Oxford University Press, 1989. 287 p.
- RADINSKY, L. The adaptive radiation of the phenacodontid condylarths and the origin of the Perissodactyla. **Evolution**, v. 20, p. 408–417, 1966.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The brazilian atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; DELL' PORTO, A.; MILDER, R. V.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 185-207, 2003.

RODRIGUES, A. C.; GARCIA, H. A.; ORTIZ, P. A.; CORTEZ, A. P.; MARTINKOVIC, F.; PAIVA, F.; BATISTA, J. S.; MINERVINO, A. H.; CAMPANER, M.; PRAL, E. M.; ALFIERI, S. C.; TEIXEIRA, M. M. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International**, v. 59, p. 318-325, 2010.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. 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.

SIMPSON, A. G. B.; LUKES, J.; ROGER, A. J. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. **Molecular Biological Evolution**, v. 19, p. 2071-2083, 2002.

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

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. C. The molecular evolution of trypanosomes **Parasitology Today**, v. 15, p. 432-437, 1999a.

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.

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

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

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

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005a.

TABER, A.; CHALUKIAN, S.; MINKOWSKI, K.; SANDERSON, E.; ALTRICHTER, M.; ANTÚNEZ, M.; AYALA, G.; BECK, H.; BODMER, R.; CARTES, J. L.; GOMEZ, C.; GÓMEZ, H.; DE THOISY, B.; EMMONS, L.; ESTRADA, N.; OLIVIERA, F. L.; FRAGOSO, J.; GARCIA, R.; GOLDSTEIN, I.; GÓMEZ, H.; KEUROGHILIAN, A.; LEDESMA, K.; LIZÁRRAGA, L.; LIZCANO, D.; LOZANO, C.; MEDICI, P.; MONTENEGRO, O.; MORAES, E. A.; NERIS, N.; NOSS, A.; PALACIO VIEIRA, J. A.; PAVIOLO, A.; PEROVIC, P.; REYNA-HURTADO, R.; RADACHOWSKY, J.; RODRIGUEZ, O. J.; RUMIZ, D.; SALAS, L.; DUEÑAS, A. S.; PEREA, J. S.;

SCHIAFFINO, K.; TOBLER, M.; UTRERAS, V.; VARELA, D.; VENTINCINQUE, E.; WALLACE, R.; RIOS, G. A. Z. Range-wide status analysis of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) and white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*): preliminary results for lowland tapirs and conservation implications. In: INTERNATIONAL TAPIR SYMPOSIUM TSG / SSC – IUCN, 3. Argentina. 2006.

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, 2001.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; 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.

TÓFOLI, C. F. **Frugivoria e dispersão de sementes por *Tapirus terrestris* (Linnaeus, 1758) na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema, São Paulo**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TOUGARD, C.; DELEFOSSE, T.; HANNI, C.; MONTGELARD, C. Phylogenetic relationships of the five extant rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) based on mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 19, p. 34-44, 2001.

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

VIOLA, L. B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. 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.

VROEGE, C.; ZWART, P. Babesiasis in a Malayan Tapir (*Tapirus indicus* Desmarest, 1819). **Z. Parasitenkur**, v. 40, p. 177-179, 1972.

WILSON, D.; REEDER, D. **Mammal species of the world**. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 2005. 435 p.

WRIGHT, A. D.; LI, S.; FENG, S.; MARTIN, D. S.; LYNN, D. H. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 99, p. 69-76, 1999.

XU, X.; JANKE, A.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA sequence of the greater Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the phylogenetic relationship

among Carnivora, Perissodactyla, and Artiodactyla (plus Cetacea). **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, p. 1167-1173, 1996.

REFERÊNCIAS

- ADRIAN, M. S.; SANI, R. A.; HASSAN, L.; WONG, M. T. Outbreaks of trypanosomiasis and the seroprevalence of *T. evansi* in a deer breeding centre in Perak, Malaysia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 145-150, 2010.
- AGUIRRE, A. "**Sooretama**", **Estudo sobre o parque de reserva, refúgio e criação de animais silvestres "Sooretama, no município de Linhares, Estado do Espírito Santo**. Rio de Janeiro: Serviço Informação Agrícola, Ministérios Agricultura, 1951.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.
- BAKER, J. R. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 4, p. 111-113, 1985.
- BAKER, J. R.; GREEN, S. M.; CHALONER, L. A.; GABORAK, M. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) dionisii of pipistrellus pipistrellus (chiroptera): intra- and extracellular development in vitro. **Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 251-263, 1972.
- BAKER, J. R.; LISTON, A. J. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) dionisii: effect of various agents on attachment and entry to macrophages in vitro and on morphogenesis. **Journal General Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 79-89, 1978.
- BERLIN, D.; LOEB, E.; BANETH, G. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 316-319, 2009.
- BOITE, M. C.; MAURICIO, I. L.; MILES, M. A.; CUPOLILLO, E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: MS, 2006.122 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: MS, 2007.
- BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E. J.; BERKVEN, D.; SERRANO, M. D.; CARVALHO, M. R.; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection Genetics Evolution**, v. 2, p. 173–183, 2003.

BROOKS, D. M.; BODMER, R. E.; MATOLA, S. **Tapirs** - Status Survey and Conservation Action Plan. Cambridge, UK: IUCN/SSC Tapir Specialist Group. IUCN, Gland, 1997. 164 p.

BUSSE, I.; PREISFELD, A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of Distigma and Astasia (Euglenozoa). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 617-624, 2003.

CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances Parasitology**, v. 42, p. 29-112, 1998.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 203-266, 1998.

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

CAVALIER-SMITH, T. Genome reduction and evolution of novel genetic membranes and protein targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). Philos. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, v. 358, n. 1429, p. 109-133. 2003.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan 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. 1251-1262, 2004.

CAVAZZANA JR., 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 jun. 2013.

CEFERINO, A. **La Parasitología en Venezuela**. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, 1973. cap. 27, p. 5-61. (Historia de la Medicina Venezolana, 33).

CHIARELLO, A. G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammals communities in the south-eastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 89, p. 1-82, 1999.

CORTEZ, A. P.; VENTURA, R. M.; RODRIGUES, A. C.; BATISTA, J. S.; PAIVA, F.; ANEZ, N.; MACHADO, R. Z.; GIBSON, W. C.; TEIXEIRA, M. M. G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 159-169, 2006.

CURASSON, G. **Traité de protozoologie vétérinaire et comparée**. Paris:Vigor Frères, 1943.Tomo I, 272 p.

DA SILVA, A. S.; GARCIA, H. A.; COSTA, M. M.; FRANÇA, R. T.; DE GASPERI, D.; ZANETTE, R. A.; AMADO, J. A.; LOPES, S. T.; TEIXEIRA, M. M. G.; MONTEIRO, S. G. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, p. 23-30, 2011.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 73-74, 2010. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.08.003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740501>>. Acesso em: 8 mar. 2013.

D'ALESSANDRO, A.; SARAIVA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES, H. M. (Ed.). **Parasitic protozoal diseases**. London: Arnold, 1999. p. 398-412.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DE LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M. A.; AVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmaniachagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, 412-414, 2008. doi: 10.1590/S0074-02762008000400018. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v103n4/430.pdf>>. Acesso em: 11 maio 2013.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954.

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.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 9-19, 2004.

DUFFY, C. W.; MORRISON, L. J.; BLACK, A.; PINCHBECK, G. L.; CHRISTLEY, R. M.; SCHOENEFELD, A.; TAIT, A.; TURNER, C. M.; MACLEOD, A. *Trypanosoma vivax* displays a clonal population structure. **International Journal Parasitology**, v. 39, n. 13, p. 1475-1483, 2009.

EBERT, F. Comparison of isoenzymes of some species of the subgenus Schizotrypanum from bats by isoelectrofocusing. **Tropical Parasitologie**, v. 34, n. 2, p. 93-97, 1983.

EISENBERG, J. F. Neotropical mammal communities. In: GENTRY, A. H. (Ed.). **Four neotropical forests**. New Haven: Yale University Press, 1990. p. 358-368.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics**: the central neotropics Ecuador, Peru Bolivia Brazil. Chicago: Chicago Press, 1999. v. 3. 2004.

EMMONS, L. H. **Neotropical rainforest mammals**: a field guide. 2. ed. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. 307 p.

FALQUETO, A.; LEITE, G. R.; FERREIRA, G. E. M.; RODRIGUES, A. A. F. Peridomiliary colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 471-473, 2005.

FALQUETO, A.; LEITE, G. R.; SESSA, P. A. Dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 543-546, 2006.

FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S.; 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. 19, p. 1-16, 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.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P.; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T. M.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 200-201, 2008. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.10.001. Disponível em: <trstmh.oxfordjournals.org/content/102/2/200.abstract>. Acesso em: 12 jul. 2013.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection Genetics Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FRANCISCATO, C.; DOS ANJOS, L. S. T.; TEIXEIRA, M. M. G.; MONTEIRO, S. G.; WOLKMER, P.; GARMATZ, B. C.; PAIM, C. B. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 288-291, 2007.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v. 58, p. 159-169, 1994.

GARCÍA, H. A.; RANGEL-RIVAS, A.; CONTRERAS, I.; GARCÍA, M. E.; GARCÍA, F.; PERRONE, T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. **Revista Científica**, v. 19, p. 230-237, 2009.

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. doi:10.1371/journal.pone.0036578. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036578>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

GARDNER, R. A.; MOLYNEUX, D. H. *Schizotrypanum* in British bats. **Parasitology**, v. 97, p. 43–50, 1998.

GLAUERT, A. M.; BAKER, J.R.; SELDEN, L. F. Mechanism of entry and development of *Trypanosoma dionisii* in nonphagocytic cells. **Journal Cell Science**, v. 56, p. 371-387, 1982.

GONZALES, J. L.; CHACON, E.; MIRANDA, M.; LOZA, A.; SILES, L. M. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 9-16, 2007.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the new world: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

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

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.

HAGOS, A.; DEGEFA, G.; YACOB, H.; FIKRU, R.; ALEMU, T.; FESEHA, G.; CLAES, F.; GODDEERIS, B. M. Seroepidemiological survey of trypanozoon infection in horses in the suspected dourine-infected Bale highlands of the Oromia region, Ethiopia. **Revue Scientifique et Technique**, v. 29, p. 649-654, 2010.

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

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.; CRUICKSHANK, C.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; MATHEWS, F. Parasites reveal movement of bats between New and Old Worlds.

Molecular Phylogenetics Evolution, v. 63, n. 2, p. 521-526, 2012.

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. 2013.

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 abr. 2013.

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. 431-443, 2005a.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; HOLZ, P.; 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, p. 3167-3175, 2005b.

HIDE, M.; BRAS-GONCALVES, R.; BANULS, A. L. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. **Parasitology**, v. 134, p. 379-389, 2007.

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, UK.: Blackwell Scientific Publications, 1972.

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, 1963. p. 68.

IBRAHIM, M. E.; BARKER, D. C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infection Genetics Evolution**, v. 1, p. 61-68, 2001.

IEMA. INSTITUTO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. Cariacica, Espírito Santo. Disponível em: <www.meioambiente.es.gov.br/default.asp?pagina=17184> . Acesso em: 25 set. 2013.

IPEMA. **Conservação da Mata Atlântica no estado do Espírito Santo**: cobertura florestal e unidades de conservação. Vitória: Programa Centros para a conservação da biodiversidade, Conservação Internacional/ IPEMA, 2005.

IUCN. The world conservation union. **Red List of Threatened Species**. 2008. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 12 jul. 2013.

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, p. 483-7. 2001a.

JAKES, K. A.; O'DONOGHUE, P.; MUNRO, M.; ADLARD, R. Hemoprotozoa of freshwater turtles in Queensland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, p. 12-19, 2001b.

JANSSEN, D. L.; RIDEOUT, B. A.; EDWARDS, M. S. Tapir medicine. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine: current therapy 4**. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999. p. 562-568.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, 1981.

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MACLARNON, A.; BININDA-EMONDS, O. R.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biological Reviews Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 2, p. 223-259, 2002.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G.; Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987a. v. 1, p. 120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 517, 1987.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; ATTAS, M.; DE 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.; ATTÍAS, M.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; SOUZA, W. de; 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, n. 6 p. 856-872, 2012. doi:10.1016/j.protis. 003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1434461011001301/1-s2.0-S1434461011001301-main.pdf?_tid=4a2d489c-1199-11e3-8497-00000aacb35d&acdnat=1377883762_8da2a973422b0e3d090af3c85fdf8771>. Acesso em: 16 jan. 2013.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K.W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings National Academy Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 9375-9380, 2007.

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, M. A. 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. 168-173, 2008.

MAIA DA SILVA, F.; JUNQUEIRA, A. C.; CAMPANER, M.; RODRIGUES, A. C.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, L. E.; CABALLERO, Z. C.; MONTEIRO, F. A.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology**, v.16, p. 3361-3373, 2007.

MANGINI, P. R. *Perissodactyla: Tapiridae* (Anta). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 589-614.

MANGINI, P. R.; MEDICI, E. P. Sanitary evaluation of wild populations of *Tapirus terrestris* at the Pontal do Paranapanema Region, São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL TAPIR SYMPOSIUM, 1., 2001, San Jose. **Anais...** 2001. p. 17.

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>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C.; SOUZA, A. I.; DA ROSA, J. A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.;

LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIlc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection Genetics Evolution**, v. 9, n. 6, p.1265-1274, 2009c.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; DA SILVA, F. M.; PINTO, A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009a. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.09.015. Disponível em: <<http://www.yumpu.com/en/document/view/2354834/trypanosoma-cruzi-in-brazilian-amazonia-lineages-tci-and-tciia->>. Acesso em: 18 abr. 2013.

MARINKELLE, C. J. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. **Revista de Biologia Tropical**, v. 30, p. 107-111, 1982a.

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

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.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, pt. 3, p. 237-246, 1999.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, v. 128, p. 263-267, 2004.

MCKENNA, M. C.; BELL, S. K. **Classification of mammals above the species level**. New York: Columbia University Press, 1997. p. 1-631.

MEDICI, E. P.; DESBIEZ, A. L. J.; SILVA, A. G.; JERUSALINSKY, L.; CHASSOT, O.; MONTENEGRO, O. L.; RODRÍGUEZ, J. O.; MENDOZA, A.; QUSE, V. B.; PEDRAZA, C.; GATTI, A.; OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R.; TORTATO, M. A.; RAMOS JR., V.; REIS, M. L.; LANDAU-REMY, G.; TAPIA, A.; MORAIS, A. A. (Ed.). Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*). Population and Habitat Viability Assessment (PHVA): final report. In: LOWLAND TAPIR CONSERVATION WORKSHOP, 2007, Sorocaba. Sorocaba. **Anais...** Sorocaba: TSGI, 2007.

MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MILOCCO, C.; KAMYINGKIRD, K.; DESQUESNES, M.; JITTAPALAPONG, S.; HERBRETEAU, V.; CHAVAL, Y.; DOUANGBOUPHA, B.; MORAND, S. Molecular Demonstration of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma lewisi* DNA in Wild

Rodents from Cambodia, **Lao PDR and Thailand Transboundary and Emerging Diseases**. 2012.

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

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.

MOREIRA, D.; VON DER HEYDEN, S.; BASS, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; CHAO, E.; CAVALIER-SMITH, T. Global eukaryote phylogeny: Combined small-and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 44, p. 255-266, 2007

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C.; DA SILVA, C. V.; FERNANDES, A. B.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcellular Biochemistry**, v. 47, p. 101-109, 2008.

NASCENTES, G. A.; MEIRA, W. S.; LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E. Absence of experimental cross-protection induced by a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from bats. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 152-157, 2008.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J. R.; DEERFIELD, D. W. II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW NEWS**, v. 4, p.14, 1997.

NIEBERDING, C. M.; DURETTE-DESSET, M. C.; VANDERPOORTEN, A.; CASANOVA, J. C.; RIBAS, A.; DEFFONTAINE, V.; FELIU, C.; MORAND, S.; LIBOIS, R.; MICHAUX, J. R. Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 47, p. 538–554, 2008.

NOWAK, M.R. **Walker's mammals of the world**. 5th ed. London: The Johns Hopkins Press Ltd, 1991. 642 p.

NOWAK, R. M.; PARADISO, J. L. **Walker's mammals of the world**. 4. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, v. 2, 1362 p. 1983.

OLIVEIRA, J. B.; HERNÁNDEZ-GAMBOA, J.; JIMÉNEZ-ALFARO, C.; ZELEDÓN, R.; BLANDÓN, M.; URBINA, A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 136-139, 2009.

OLIVEIRA, M. P.; CORTEZ, M.; MAEDA, F. Y.; FERNANDES, M. C.; HAAPALAINEN, E. F.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A. Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: invasion, intracellular growth, and nuclear localization. **Acta Tropica**, v. 110, n. 1, p. 65-74, 2009.

OSÓRIO, A. L.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R.; COSTA, S. C. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology,

pathogenesis, and introduction in the New World-a review. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 1-13, 2008.

PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. **Espécies da fauna ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo**. Vitória: Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 2007. 140 p.

PETRY, K.; VOISIN, P.; BALTZ, T. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). **Acta Tropica**, v. 44, n. 4, p. 381-386, 1987.

PETTIGREW, J. D. Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain. **Science**, v. 231, n. 4743, p. 1304-1396, 1986.

PINTO, I. S.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; VALIM, V.; CARVALHO, F. S.; SILVA, G. M.; FALCÃO, A. L.; DIETZE, R. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, p. 90-96, 2012.

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.

PODLIPAEV, S. A.; FROLOV, A. O. The phylogeny of the Trypanosomatidae: the molecular and morphological approaches. **Parasitologia**, v. 34, n. 3, p. 169-182, 2000.

POSTIGO, J. A. Leishmaniosis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S62-S65, 2010. Supplement, 1.

QUISPE TINTAYA, K. W.; YING, X.; DEDET, J. P.; RIJAL, S.; DE BOLLE, X.; DUJARDIN, J. C. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1035-1043, 2004.

QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S.; HIDE, M.; BAÑULS, A.L.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; CAÑAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 4, p. 685-692, 2005.

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.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; MILANI, J.; BARROS, C. S. L. Outbreaks of Trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,

v.25, n. 4, p.239–249, 2005.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; BARROS, C. S. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 251-258, 2009.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e584, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

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.

SAVANI, E. S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SEIDL, A. F.; MORAES, A. S.; SILVA, R. A. M. S. *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 599-602, 2001.

SHAW, J. J. The epizootiology of American Surra with special reference to the Lower Amazon Region. **Protozoology**, v. 3, p. 119-128, 1977.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471-478, 1994.

SIMMONS, N. B. Evolution. An Eocene big bang for bats. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 527-528, 2005.

SIMMONS, N. B.; GEISLER, J. H. Phylogenetic relationships of *Icronycteris*, *Archaeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocating and foraging strategies in *Microchiroptera*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 235, p. 1-182, 1998.

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.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 363-382, 1987.

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.; ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKES, J.; VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. 2, p. 423 -432, 2007.

TABER, A.; CHALUKIAN, S.; MINKOWSKI, K.; SANDERSON, E.; ALTRICHTER, M.; ANTÚNEZ, M.; AYALA, G.; BECK, H.; BODMER, R.; CARTES, J. L.; GOMEZ, C.; GÓMEZ, H.; DE THOISY, B.; EMMONS, L.; ESTRADA, N.; OLIVIERA, F. L.; FRAGOSO, J.; GARCIA, R.; GOLDSTEIN, I.; GÓMEZ, H.; KEUROGHLIAN, A.; LEDESMA, K.; LIZÁRRAGA, L.; LIZCANO, D.; LOZANO, C.; MEDICI, P.; MONTENEGRO, O.; MORAES, E. A.; NERIS, N.; NOSS, A.; PALACIO VIEIRA, J. A.; PAVIOLO, A.; PEROVIC, P.; REYNA-HURTADO, R.; RADACHOWSKY, J.; RODRIGUEZ, O. J.; RUMIZ, D.; SALAS, L.; DUEÑAS, A. S.; PEREA, J. S.; SCHIAFFINO, K.; TOBLER, M.; UTRERAS, V.; VARELA, D.; VENTINCINQUE, E.; WALLACE, R.; RIOS, G. A. Z. Range-wide status analysis of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) and white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*): preliminary results for lowland tapirs and conservation implications. In: INTERNATIONAL TAPIR SYMPOSIUM TSG / SSC – IUCN, 3., 2006, Argentina. **Anais...** Argentina: TSG/SCC. 2006.

TEELING, E. C. Chiroptera. In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. (Ed.). **The time tree of life**. Oxford: Oxford University Press, 2008. p. 499–503.

TEELING, E. C.; MADSEN, O.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; DE JONG, W. W.; STANHOPE, M. J.; SPRINGER, M. S. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99. n. 3, p. 1431-1436, 2002.

TEELING, E. C.; SPRINGER, M. S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S. J.; MURPHY, W. J. A Molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**, v. 307, p. 580-584, 2005.

TEIXEIRA, M. M. G.; BORGHESEAN, 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.

TELLERIA, J.; BARNABÉ, C.; HIDE, M.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M. Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles

and subspecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 133-141, 2004.

TELLERIA, J.; BIRON, D. G.; BRIZARD, J. P.; DEMETTRE, E.; SÉVENO, M.; BARNABÉ, C.; AYALA, F. J.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 107, n. 47, p. 20411-20446. 2010.

THORNE, K. J.; GLAUERT, A. M.; SVVENNSEN, R. J.; FRANKS, D. Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. **Parasitology**, v. 79, n. 3, p. 367-379, 1979.

THORNE, K. J.; GLAUERT, A. M.; SVVENNSEN, R. J.; THOMAS, H.; MORRIS, J.; FRANKS, D. Evasion of the oxidative microbicidal activity of human monocytes by trypomastigotes of *Trypanosoma dionisii*. **Parasitology**, v. 83, pt. 1, p. 115-123, 1981.

TONINI, M. A. L.; LEMOS, E. L.; REIS, A. B.; VITAL, W. C.; DIAS, E. S.; DIETZE, R. First description of autochthonous canine visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 6, Dec. 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000600019&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600019>. Acessado em: 17 set. 2013.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. Didelphis marsupialis, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

ULIANA, S. R.; AFFONSO, M. H.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 2, p.157-163,1991.

VALE, E. C. S. D. O.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

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. 236-243, 2010.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37-48, 2001.

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

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

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. G. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v. 136, p. 55-65, 2009b.

VIOLA, L. B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. 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.

VON DER HEYDEN, S.; CHAO, E. E.; VICKERMAN, K.; CAVALIER-SMITH, T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of euglenozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 402-416, 2004.

VOTYPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 253-263, 2002.

VOTYPKA, 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, p. 745-754, 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, 1979. p. 213-240.

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.

WILSON, D.; REEDER, D. **Mammal species of the world**. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 2005.

YURCHENKO, V. Y.; LUKES, J.; TESAROVÁ, M.; JIRKU, M.; MASLOV, D. A. Morphological discordance of the new trupanomatid species phylogenetically associated with the genus crithidia. **Protist**, v. 159, n.1, p.99-114, 2008.

ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M.; LOPES, S. T. A. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 38, p.1468-1471, 2008.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.