

BEATRIZ HELENA SANTOS LEITE

**Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos
capturados na área de influência da UHE Belo Monte –
Altamira/Pará**

São Paulo

2015

BEATRIZ HELENA SANTOS LEITE

Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3158
FMVZ

Leite, Beatriz Helena Santos

Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará / Beatriz Helena Santos Leite. -- 2015.
47 f. : il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. *Trypanosoma*. 2. Morcegos. 3. Hidrelétrica. 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 do gênero Trypanosoma em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará”, protocolado sob o nº 2892/2013, utilizando Morcegos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Arlei Marcili, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research “Diversity of parasites of the genus Trypanosoma em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará”, protocol number 2892/2013, utilizing bats, under the responsibility Prof. Dr. Arlei Marcili, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 8 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LEITE, Beatriz Helena Santos

Título: Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará

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 ao meu esposo Daniel, a minha mãe Sônia, e meu filho Guilherme, como forma de agradecimento e reconhecimento por todo o apoio e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu esposo Daniel Nunes Mendes por toda paciência e carinho durante este período;

Ao meu filho Guilherme Leite Mendes pelos momentos de brincadeira substituídos por estudos;

A minha mãe Sônia Maria dos Santos por todas as horas de desabafo e ajuda nos vários momentos que precisei;

Ao Dr. Arlei Marcili pela oportunidade, dedicação, confiança e por me manter seguindo sempre em frente;

A minha professora de sempre Sandra Elisa Favorito, grande incentivadora deste desafio, por toda a confiança depositada, a criação desta oportunidade e as conversas de incentivo;

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP que me auxiliaram durante este aprendizado, especialmente a Andréa P. da Costa pelo tempo dispendido a me ensinar e na cooperação desse trabalho;

A todos que contribuíram na obtenção das coletas de campo e na identificação das espécies de morcegos, principalmente a Dra. Caroline Aires e Dr. Patrício Rocha;

A empresa que trabalho, ARCADIS Logos, e a Norte Energia, por me proporcionarem a oportunidade de trabalhar neste empreendimento;

Aos meus colegas de trabalho, principalmente Fernanda Neves, Juliana Gaboardi, Beatriz Beça, Laerte Viola, Patrícia Bertola, Tatiana Pavão, Érica Haller, Felipe Rezende, Bianca Martinata, que me incentivaram e tiveram de forma direta ou indireta alguma participação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.
(Chico Xavier)

RESUMO

LEITE, B. H. S. **Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará** [Diversity of parasites of *Trypanosoma* genus in bats captured in the area of influence of hydroelectric of Belo Monte - Altamira/Pará]. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O gênero *Trypanosoma* compreende flagelados capazes de infectar várias espécies de mamíferos e é transmitida por vários grupos de invertebrados. A ordem Chiroptera pode ser infectada pelos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Trypanozoon*. Neste estudo, foi possível descrever a diversidade de tripanossomas de morcegos, inferindo as relações filogenéticas entre os tripanossomas e os morcegos capturados na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte, localizada na Amazônia Brasileira. Tripanossomas de morcegos foram isolados por hemocultura, e a filogenia molecular foi baseada na subunidade menor do gene ribossômico (SSU rDNA) e de glicosomal-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH). A caracterização morfológica incluiu microscopia eletrônica de luz e de varredura. Além das espécies já descritas, *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei*, foi possível identificar uma espécie não classificada, *Trypanosoma* sp., identificado em um morcego da espécie *Pteronotus parnellii*. Árvores filogenéticas usando combinado SSU rDNA e conjuntos de dados em cluster gGAPDH, confirmaram que esta espécie de tripanossoma de morcego, era muito divergente de outras espécies de tripanossomas. Através do posicionamento filogenético, foi possível classificar os tripanossomas deste morcego como uma espécie não classificada. Os tripanossomas isolados de morcegos na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte foram identificados através de análise filogenética como *T. cruzi marinkellei*, *T. cruzi* (TCI e TCbat) e em *Pteronotus parnellii* uma espécie não classificada e posicionada no Clado *T. cruzi*. Os dados obtidos neste estudo atentam para a diversidade subestimada de parasitas que infectam morcegos nos diferentes biomas brasileiros.

Palavras-chave: *Trypanosoma*. Morcegos. Hidrelétrica.

ABSTRACT

LEITE, B. H. S. **Diversity of parasites of *Trypanosoma* genus in bats captured in the area of influence of hydroelectric of Belo Monte - Altamira/Pará** [Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em morcegos capturados na área de influência da UHE Belo Monte – Altamira/Pará]. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The *Trypanosoma* comprises flagellates able to infect several mammalian species and is transmitted by several groups of invertebrates. The order Chiroptera can be infected by the subgenera *Herpetosoma*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* and *Trypanozoon*. In this study, we described the diversity of bats trypanosomes, inferring the phylogenetic relationships among the trypanosomes from bats caught Belo Monte Hydroelectric area (Brazilian Amazonia). Trypanosomes from bats were isolated by haemoculture, and the molecular phylogeny based on small subunit rDNA (SSU rDNA) and glycosomal-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene sequences. Morphological characterization included light and scanning electron microscopy. Besides the species already described, *T. cruzi* and *T. cruzi marinkellei*, were identify an unclassified species, *Trypanosoma* sp., identify into a bat species *Pteronotus parnelliii*. Phylogenetic trees using combined SSU rDNA and gGAPDH data sets clustered the trypanosomes of bats, which were highly divergent from other trypanosome species. The phylogenetic position made it possible to classify the trypanosomes from bats as a separate species. The bat trypanosomes isolates in Belo Monte Hydroelectric area were identified by phylogenetic analysis like as *T. cruzi marinkellei*, *T. cruzi* (TCI and TCbat) and into a bat species *Pteronotus parnellii* was identified a species unclassified. The diversity of bat trypanosomes in Brazil is underestimated and new studies should be conducted in brazilian biomes.

Keywords: *Trypanosoma*. Bat. Hidroelectric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mapa da área da Hidrelétrica de Belo Monte. Origem geográfica dos morcegos capturados na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte, Estado do Pará, Brasil.....23
- Figura 2 - Fotomicrografias de microscopia e microscopia eletrônica de varredura de luz de formas de cultura de uma espécie não classificada, *Trypanosoma* sp. Morfologia das formas de cultura Giemsa-stained (a-e), formas epimastigotas (a,c-e) e formas trypomastigotas (b). Formas epimastigotas em rossetas (f) separadas (g-i). N, núcleo; K, kinetoplasto; F, flagelo29
- Figura 3 - Posicionamento filogenético de tripanossomas de morcegos presentes na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte na Amazônia Brasileira. Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia e métodos de Bayesiana de sequências V7V8 SSU rDNA de 53 isolados de tripanossomas (869 caracteres e 66 sítios informativos) do subgênero *Schizotrypanum*.....31
- Figura 4 - Árvore filogenética de uma espécie não classificada, *Trypanosoma* sp., de tripanossomas de morcegos capturados na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte na Amazônia Brasileira. Árvore filogenética baseada em sequências dos gene SSU rDNA e gGAPDH concatenados de 60 isolados de tripanossomas e tripanossomatídeos como outgroup (2901 caracteres e 253 parsimony-informative sites), em cada foi usado máxima parcimônia e métodos Bayesiana. Números são valores de suporte para os principais ramos (bootstrap/ probabilidade posterior; 500 réplicas)33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de morcegos capturados e positividade através de hemocultura.....	27
Quadro 2 - Isolados, hospedeiros e números de acesso das sequencias de SSU rDNA and gGAPDH determinados neste estudo e utilizados nas análises filogenéticas.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CBT	Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos
BMC	Belo Monte Chiroptera
DNA	ácido desoxirribonucléico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
gGAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
LIT	"liver infusion tryptose"
ma	milhões de anos
PCR	reação em cadeia pela polimerase ("polymerase chain reaction")
SSU rDNA	subunidade menor do gene ribossômico
UHE	Usina Hidrelétrica de Belo Monte
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	DIVERSIDADE DE PARASITAS DO GENÊRO <i>TRYPANOSOMA</i> EM MORCEGOS CAPTURADOS NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DA UHE BELO MONTE – ALTAMIRA/PARÁ	20
2.1	INTRODUÇÃO	20
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.2.1	Área de estudo e captura dos morcegos	21
2.2.2	Isolamento de tripanossomas de morcegos	23
2.2.3	Caracterização morfológica	24
2.2.4	Análise Molecular e Filogenética	24
2.3	RESULTADOS	26
2.4	DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O filo Euglenozoa é formado pelas ordens Diplonemida, Euglenida e Kinetoplastida (CAVALIER-SMITH, 1993). Protozoários flagelados estão inseridos na ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963). Esta ordem é subdividida nas subordens Bodonina, que inclui os parasitas e espécies de vida livre, e Trypanosomatina, onde seus representantes são todos parasitas, pertencentes a família Trypanosomatidae (SLEIGH, 1989).

A família Trypanosomatidae apresenta 12 gêneros identificados através de parâmetros morfológicos, ciclo de vida e hospedeiro, que estão diretamente ligados a protozoários monoxênicos de insetos, sendo eles, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Strigomonas*, *Crithidia*, *Sergeia*, *Blastocrithia*, *Leptomonas*, *Wallaceina*, *Rynchoidomonas*, e *Blechomonas*. *Phytomonas* em plantas e os demais gêneros estão relacionados com espécies heteroxênicas (*Leishmania*, *Trypanosoma*, e *Endotrypanum*) (WALLACE, 1966; VICKERMAN, 1976; PODLIPAEV, 1990; CAMARGO, 1998; SVOBODOVÁ et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2011; VOTÝPKA et al., 2013).

Durante o ciclo de vida, as espécies de tripanossomas podem apresentar as formas amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e promastigotas. Estas diferenças formas variam de acordo com a presença ou ausência de flagelo livre, membrana ondulante, e a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994).

Hoare (1964) separou a o gênero *Trypanosoma* em suas secções, Salivaria e Stercoraria, considerando o desenvolvimento no hospedeiro intermediário e das diferentes maneiras que o vetor utiliza para eliminar suas formas infectantes.

As espécies que desenvolvem-se no tubo digestivo e glândulas salivares do inseto vetor, excluindo a espécie *T. vivax* nas Américas, pertencem a Secção Salivaria. Formas tripomastigotas metacíclicas são transmitidas pela picada do vetor. Os subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Duttonella* (espécie - tipo *T. vivax*), *Nannomonas* (*T. congolense*), *Pycnomonas* (*T. suis*), que incluem os tripanossomas

africanos patogênicos para mamíferos, estão inseridos nesta Secção. Duas espécies, *T. evansi* e *T. vivax*, são as únicas a ocorrerem fora do continente Africano, pois se adaptaram a transmissão mecânica. Já a espécie *T. equiperdum* apresenta transmissão direta e é considerada doença venérea (HOARE, 1972; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007; STEVENS et al., 2008).

Entretanto, as espécies que tem o desenvolvimento exclusivo no tubo digestivo do vetor e transmitindo suas formas tripomastigotas através das fezes do inseto, pertencem a Secção Stercoraria. Esta Secção apresenta os subgêneros *Megatrypanum* (*T. theileri*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*) (HOARE, 1972). Apesar dos tripanossomas desta Secção apresentarem considerável distribuição geográfica, algumas espécies tem ocorrência apenas nas Américas, como *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e *T. rangeli* (*Herpetosoma*) (HOARE, 1972; GUHL; VALLEJO, 2003; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009). Exceto *T. cruzi* e casos pontuais de infecção de humanos por *T. lewisi*-“like” e *T. rangeli*, as espécies desta Secção não infectam o homem e não são patogênicas para seus hospedeiros vertebrados (SARATAPHAN et al., 2007).

As espécies do subgênero *Schizotrypanum* não são possíveis de serem identificadas através de sua morfologia. Outra característica das espécies deste subgênero, é que elas são parasitas exclusivas de morcegos, com exceção da espécie *T. cruzi* que é capaz de parasitar diferentes mamíferos. Morcegos são encontrados infectados nos diferentes continentes (África, Europa, Ásia e Américas), e no Brasil, são descritas infecções de morcegos por diferentes subgêneros de tripanossomas (*Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) (HOARE, 1972; MOLINEUX, 1991).

O estudo de evolução dos tripanossomatídeos foi evoluindo com o passar dos anos, e estudos moleculares foram fundamentais para o encontro de novas descobertas (BAKER, 1963; HOARE; 1972). Inicialmente, acreditava-se no parasitismo de um grupo (LAKE et al., 1988; FERNANDES et al., 1993), porém mais conhecimento e novas espécies foram identificadas através de análises agrupadas, que envolveram a evolução das espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania* (MASLOV et al., 1996; CROAN et al., 1997; LUKES et al., 1997; HAAG et al., 1998; STEVENS et al., 1998, 1999a, 1999b).

Outros estudos também avançaram através do tempo, e a ideia de parafiletismo do gênero *Trypanosoma* foi substituída pelo monofiletismo (STEVENS, 1999). A partir deste fato, novos agrupamentos dentro do gênero *Trypanosoma* foram evidenciados (STEVENS et al., 2001; VIOLA et al., 2009a; DESCHAMPS et al., 2011).

Estudos mais recentes apresentam os tripanossomas divididos em clados (HAMILTON et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a).

O Clado *T. avium* / *T. corvi* apresenta tripanossomas de aves (VOTYPKA et al., 2012). Tripanossomas identificados nas ordens Lagomorpha, Rodentia e Insectivora foram agrupados no clado *T. lewisi*. (HAMILTON et al., 2005b; SARATAPHAN et al., 2007; MAIA DA SILVA et al., 2010). O clado aquático foi subdividido em dois subclados (isolados de ornitorrinco e peixes) (JAKES et al., 2001a; HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008). Um clado composto por tripanossomas de cobras de lagartos foi classificado como squamata (HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a). Um clado que compreende tripanossomas de mamíferos ungulados da ordem Artiodátila, bovídeos domésticos, silvestres e cervídeos, identificado como clado *T. theileri* (RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010a). Tripanossomas de macaco da Malásia, de um marsupial Australiano, anuros e sanguessugas terrestres da família Haemadipsidae, também da Austrália, foram inseridos no clado *T. cyclops* (WEINMAN, 1972; HAMILTON et al., 2005a).

O Clado *T. brucei* apresenta tripanossomas de mamíferos africanos relacionados as moscas tsetse (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2008; VAN DEN BOSSCHE et al., 2010). Tripanossomas de crocodilianos nas Américas e África foram inseridos no clado *T. grayi* (VIOLA et al., 2009b).

Espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) e tripanossomas exclusivos de morcegos do novo e velho mundo (*T. dionisii*, *T.c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. livingstonei*, entre outros) formam o clado *T. cruzi*. Isolados de ratos, canguru da Austrália e macaco sul americano são representantes do clado *T. conorhini* (CHAGAS, 1908), enquanto isolados de koala e marsupiais australianos formam o clado dos Tripanosomas australianos (THOMPSON et al., 2014). Isolados de *Tapirus terrestris* compõem o clado *T. terrestris* (ACOSTA et al., 2013).

Insetos vetores são capazes de transmitir a espécie *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. A espécie de *T. cruzi* pertence ao subgênero *Schizotrypanum*. As espécies presentes neste subgênero estão relacionadas a quirópteros, sendo exceções as espécies *T. dionisii* e *T. cruzi marinkellei*, por serem generalistas (BAKER et al., 1978; MARINKELLE, 1976; PINTO; DA COSTA BENTO, 1986; MOLYNEUX, 1991; FABIAN, 1991; CAVAZZANA et al., 2003; MAIA DA SILVA et al., 2009). *Trypanosoma cruzi* tem distribuição entre as Américas do Sul e Norte, e infecta grande parte das espécies de mamíferos (GAUNT; MILES, 2000). Na fase do ciclo silvestre e doméstico da espécie *T. cruzi* estão presentes os mamíferos e triatomíneos, e no ciclo doméstico cães, gatos, gambás e roedores (YEO et al., 2005; GURTLER et al., 2007; MARCILI et al., 2009).

A espécie *Trypanosoma cruzi* agrupa populações com grande heterogeneidade, apresentando diferenças em suas características biológicas, clínicas, patológicas, moleculares e bioquímicas (MILES et al., 2003; BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003; ZINGALES et al., 2012). Diferentes marcadores moleculares registraram a grande variabilidade genética suportando a divisão em seis grupos de cepas de *T. cruzi* (TcI -TcVI) (ZINGALES et al., 2009; 2012; TIBAYRENC; AYALA, 2013) e o genótipo classificado como Tcbat (MARCILI et al., 2009a). Verificando o relacionamento entre as espécies, é possível afirmar que *T. cruzi* é mais relacionado a *T. cruzi marinkellei* do que a *T. dionisii*. Diferenças de hospedeiros, patogenicidade e vetores diferenciam estas três espécies, enquanto os recursos morfológicos, genômicos, biológicos, e proteômicos são semelhantes (STEVENS et al., 1999; MARCILI et al., 2009a; CAVAZZANA et al., 2010).

A ordem Chiroptera, que é composta por duas subordens (Megachiroptera e Microchiroptera), apresenta dezoito famílias de morcegos, pertencentes a 202 gêneros e 1.120 espécies (SIMMONS, 2005). No Brasil existem apenas espécies da subordem Microchiroptera (FENTON, 1992), subordem esta que apresenta 17 famílias e 930 espécies distribuídas pelo mundo (SIMMONS, 2005). O Brasil apresenta o registro de nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies (REIS et al., 2006).

A doença de Chagas tem grande relevância médica, pois morcegos infectados por *T. cruzi* são registrados em diferentes locais e ambientes, como por

exemplo, edifícios e galinheiros, e esta plasticidade aumenta a possibilidade destes terem contato com triatomíneos que são capazes de disseminar a doença (BARRETO et al., 1974; THOMAS et al., 2007).

Os quirópteros apresentam mais de 30 espécies de tripanossomas distribuídos entre os subgêneros *Trypanozoon*, *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum* (HOARE, 1972; MARINKELLE, 1977; MOLYNEUX, 1991; SILVA-ITURRIZA et al., 2013). Foi registrado em um morcego africano, uma nova espécie de tripanossoma pertencente ao subgênero *Schizotrypanum*, *Trypanosoma erneyi* (LIMA et al., 2012).

O empreendimento UHE Belo Monte está inserido em uma região de floresta Amazônica, bioma este que apresenta maior extensão e biodiversidade do Brasil (PIRES; PRANCE, 1985). Apesar de apresentar alto grau de degradação ambiental, esta região apresenta grande riqueza em relação a sua quiropterofauna. Entre as espécies de morcegos registrados na Amazônia Brasileira, pelo menos 46 apresentam ocorrência restrita neste bioma. O estado do Pará apresenta o maior número de espécies registradas (120) (BERNARD et al., 2011).

2 DIVERSIDADE DE TRIPANOSSOMAS DE MORCEGOS NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DA HIDRELÉTRICA DE BELO MONTE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

2.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Trypanosoma* compreende flagelados capazes de infectar várias espécies de mamíferos e é transmitida por vários grupos de invertebrados. Na ordem Chiroptera, foram descritas mais de 30 espécies de tripanossomas, pertencentes aos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Trypanozoon* (HOARE, 1972; MARINKELLE, 1976; MOLYNEUX, 1991; SILVA et al., 2013).

A maioria das descrições das espécies de tripanossomas de morcegos são baseados em caracteres morfológicos e origem do hospedeiro e não foram incluídos em estudos evolutivos. Estudos filogenéticos em tripanossomas de morcegos são escassos e apenas *T. dionisi*, *T. vespertilionis*, *Trypanosoma* sp. bat (isolado na África) e *T. cruzi marinkellei* foram incluídos em árvores genéticas (STEVENS, RAMBAUT, 2001; STEVENS, GIBSON, 1999; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007). Recentemente, *T. erneyii* e *T. livingstonei*, espécies identificadas em morcegos africanos, foram descritas e posicionadas em árvores filogenéticas (LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013).

No Brasil, estudos realizados identificaram *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* (MARCILI et al., 2009a; CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013). Populações de *Trypanosoma cruzi* estão divididas em seis grupos (TCI para TCVI) e Tcbat (MARCILI et al., 2009; ZINNGALES et al., 2009), e apenas TCI e Tcbat são encontrados em morcegos. O grupo TCI está restrito aos morcegos amazônicos e Tcbat em hospedeiros do Pantanal e Mata Atlântica (CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2009). *Trypanosoma dionisii* foi detectado em morcegos das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Molossidae em todos os biomas analisados entre o norte e o sul do Brasil, enquanto *T. cruzi marinkellei* foi

encontrado em espécies das famílias Phyllostomidae e Vespertilionidae no nordeste, sudeste, e Brasil central, e *T. cruzi* em quatro famílias (Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Thyropteridae) de morcegos na Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica (MARCILI et al., 2009a; MARCILI et al., 2013). No subgênero *Herpetosoma*, uma nova linhagem *T. rangeli* (Lineage E) tem sido descrita em morcegos do Pantanal (MAIA et al., 2009).

Mudanças antropogênicas causadas pelo homem geram instabilidade no ambiente e ajustes são necessários por parte das comunidades de animais silvestres para enfrentar esta nova situação (SILVA, 2005). As mudanças ambientais podem reduzir a diversidade, densidade populacional ou o deslocamento de algumas espécies (SILVA, 2005). Tais mudanças ecológicas podem afetar a prevalência de doenças infecciosas entre as espécies, causando mudanças na dinâmica de transmissão do ciclo silvestre de parasitas e facilitando o seu surgimento ou reaparecimento (KESSING; HOLT; OSTEFELD, 2006).

No presente estudo, foi possível inferir relações filogenéticas entre os tripanossomas de morcegos capturados área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte localizada na Amazônia Brasileira, com base em sequências de genes SSU rDNA e gGAPDH. Foram identificadas *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, e uma espécie não classificada em *Pteronotus parnellii*, através do posicionamento filogenético e dados morfológicos, incluindo microscopia óptica, e eletrônica de varredura e transmissão.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo e captura dos morcegos

A região do baixo-médio Rio Xingu está inserida em áreas de floresta Amazônica, um bioma de grande extensão e biodiversidade da América do Sul e também do Brasil (Figura 1). A Amazônia é um mosaico de ambientes florestais de clima super-úmido, com alta quantidade de chuvas distribuídas ao longo do ano, incluindo as florestas de "terra firme" que ficam permanentemente ou sazonalmente

inundadas para ambientes com maiores regimes de seca, incluindo as savanas, campos e campinaranas (PIRES; PRANCE, 1985). As áreas de amostragem estão localizadas na área de influência da UHE Belo Monte, sendo elas: pedrais localizados no leito e margens do Rio Xingu, parcelas dos transectos dos módulos RAPELD e cavernas.

Os pedrais utilizados por morcegos, localizados nas margens e leito do rio Xingu, foram inspecionados duas vezes por ano (pico da seca e do pico de cheia) para a coleta de sangue de morcegos capturados. Foram realizadas buscas ativa com o auxílio de puçás, redes e armadilha harp trap colocados nas saídas dos abrigos por três dias consecutivos em cada um dos quatro pedrais pré-selecionados: Pedra do Navio, Sóssego, Cachoeira da Mucura e Barra do Vento. Amostras de sangue de morcegos capturados nas parcelas dos módulos RAPELD foram coletadas semestralmente, durante os períodos de chuva e seca, através da instalação de 10 redes nas primeiras parcelas de cada transecto, em cada módulo. Foram realizadas campanhas semestrais, durante os períodos de seca e chuva, em cavernas previamente selecionadas, para coleta de sangue de morcegos que utilizam essas cavernas como abrigo. Foram amostradas quatro cavernas, sendo elas: Cama de Vara, Pedra da Cachoeira, Kararaô e Leonardo da Vinci. A amostragem nas cavernas foi realizada com a ajuda de puçás, armadilha harp trap e redes de neblina colocadas na entrada de cada caverna. Os morcegos capturados foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca. Os animais foram identificados com chaves de identificação e descrições originais das espécies (VIZOTTO; TADDEI, 1973). Alguns exemplares de espécies de animais cuja identificação não foi possível em campo foram eutanasiados, fixados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

2.2.3 Caracterização morfológica

Foram realizados esfregaços a partir de culturas em meio LIT nas fases logarítmicas e estacionários, e do isolado CBT 68 foram fixados em metanol e corados com Giemsa para microscopia de luz.

Para a microscopia eletrônica de varredura, tripanossomas do isolado CBT 68 em monocamadas de células SF9 e meio TC100 foram fixados de acordo com Karnovsky (ACOSTA et al., 2013). As amostras foram analisadas e fotografadas em um Philips CM 100 TEM, no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, Rio Claro, SP, Brasil.

2.2.4 Análise Molecular e Filogenética

Amostras de DNA de cultura de tripanossomas foram extraídas utilizando o método fenol-clorofórmio, e uma amostra de hemocultura positiva de *Pteronotus parnellii* (BMC 1069) e contaminados com fungos foram purificados utilizando o Sistema Clean-Up DNA Wizard (Promega). Genes marcadores SSU rDNA e gGAPDH foram amplificados por reação em cadeia com polimerase convencional (PCR), para o comprimento total, tal como descrito anteriormente (FERREIRA, et al., 2008; VIOLA et al., 2008; LIMA et al., 2012). A região de barcode dos tripanossomatídeos foi usada para isolados do subgênero *Schizotrypanum* (MARCILI et al., 2009; LIMA et al., 2012; MARCILI et al., 2013). Os produtos da PCR de tamanho esperado foram purificados e seqüenciados em seqüenciador automático (Applied Biosystems / PerkinElmer, modelo ABI Prism 310 Genética, Foster City, Califórnia), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas estas sequências foram recuperadas a partir do GenBank (número de acesso: SSU rDNA/gGAPDH): *Herpetomonas samuelpeessoai* (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), *Trypanosoma* sp. K&A (AJ009167/AJ620252), *T. granulosum* (AJ620551/AJ620246), *Trypanosoma* sp. CLAR (AJ620555/AJ620251), *Trypanosoma* sp. Gecko (AJ620548/AJ620259), *T. varani* (AJ005279/AJ-620261), *T. cascavelli* (EU095837/FJ236511), *T. grayi* (AJ620546/AJ620258), *T. terena* (EU596252/EU596256), *T. ralphi* (EU596253/EU596257), *T. ralphi* (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* (AJ009140/AJ620263), *Trypanosoma* sp. D30 (AJ009165/AJ620279), *T. theileri* (AJ009164/AJ620282), *T. cyclops* (AJ131958/AJ620265), *Trypanosoma* sp. TL.AQ.22 (AJ620574/AJ620280), *Trypanosoma* sp. ABF (AJ620564/AJ620278), *Trypanosoma* sp. H25 (AJ009168/AJ620276), *T. livingstonei* (KF192979/KF1929580), *T. livingstonei* (KF192980/KF192959), *T. livingstonei* (KF192984/KF192969), *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), *Trypanosoma* sp. D15 (JN315381/JN3153950), *Trypanosoma* sp. D17 (JN315382/JN315396), *Trypanosoma* sp. D64 (JN315383/JN315397), *Trypanosoma* sp. F4 (AJ620547/AJ620260), *T. pestanai* (AJ009159/AJ620275), *Trypanosoma* sp. AAP (AJ620558/AJ620277), *T. lewisi* (AJ009156/AJ620272), *Trypanosoma* sp. R1 (AJ620568/AJ620281), *T. microti* (AJ009158/AJ620273), *Trypanosoma* sp. KG1 (AB281091/FJ649492), *T. gilletti* (GU966588/GU966587), *T. copemani* (GU966588/GU966585) e *T. copemani* (AJ620588/GU966586).

As sequências obtidas foram alinhadas com sequências previamente determinadas para outras espécies de tripanossomatídeos disponíveis no GenBank, utilizando ClustalX (Thompson et al., 1997), e foram ajustadas manualmente usando

GeneDoc (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997). O alinhamento 1 compreende as seqüências SSU rDNA completo e gGAPDH que foram concatenados com os 2901 caracteres obtendo o posicionamento do isolado de *Pteronotus parnellii*; Alinhamento 2 compreende seqüências V7V8 SSU rDNA, tripanossomatídeos barcode, com 869 caracteres obtidos para posicionamento dos outros isolados obtidos a partir do clado de *T. cruzi*. Estes alinhamentos foram utilizados para construir uma árvore filogenética usando máxima parcimônia, conforme implementado no PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) com 500 replicatas, a partir de adição de árvores por etapas aleatórias (com seqüências aleatórias de adição) e TBR. Foi realizada Análise Bayesiana utilizando MrBayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), com quatro Markov cadeia corridas independentes para 1.000.000 MCMC gerações, amostrando uma árvore a cada 100th gerações. O primeiro quarto das árvores representou burn-in, e as árvores restantes foram utilizados para calcular a probabilidade Bayesiana posterior.

2.3 RESULTADOS

Foram capturados 157 morcegos pertencentes a 6 famílias (Emballonuridae, Furipteridae, Mormoopidae, Natalidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae) e 34 espécies (Quadro 1). O maior número de indivíduos capturados pertencia à família Phyllostomidae com 102 indivíduos (Quadro 1).

A prevalência de tripanossomas presentes nos morcegos, avaliada através de hemocultura, foi de 5,7% (9). Foram obtidas nove hemoculturas positivas, mas apenas sete isolados, pertencentes as famílias dos morcegos Phyllostomidae e Mormoopidae foram estabelecidas e criopreservadas em CBT (Quadro 2).

Quadro 1 - Espécies de morcegos capturados e positividade através de hemocultura

Ordem	Hospedeiros			No. de indivíduos		
	Familia	Genéro	Espécie	Examinados/Positivos HE	Total ^a	
Chiroptera	Emballorunidae	Pteropteryx	<i>kappleri</i>	4/0	0	
			<i>macrotis</i>	4/0	0	
		Saccopteryx	<i>bilineata</i>	1/0	0	
			<i>leptura</i>	1/0	0	
		Furipteridae	<i>Furipterus</i>	<i>horrens</i>	1/0	0
		Mormoopidae	<i>Pteronotus</i>	<i>pamellii</i>	25/2	1
		Natalidae	<i>Natalus</i>	<i>espiritasantensis</i>	2/0	0
		Phyllostomidae	Anoura	<i>geoffroyi</i>	16/0	0
				<i>caudifer</i>	1/0	0
			Carollia	<i>sp.</i>	1/1	1
	<i>brevicauda</i>			1/0	0	
	<i>perspicillata</i>			19/1	1	
	<i>Chrotopterus</i>		<i>auritus</i>	2/1	1	
	<i>Desmodus</i>		<i>rotundus</i>	12/1	0	
	<i>Diphylla</i>		<i>ecaudata</i>	2/0	0	
	<i>Glossophaga</i>		<i>sp.</i>	3/0	0	
	<i>Lionycteris</i>		<i>spurelli</i>	19/0	0	
	<i>Lonchophylla</i>		<i>thomasi</i>	1/0	0	
	<i>Lonchorhina</i>		<i>aurita</i>	7/0	0	
	<i>Lophostoma</i>		<i>silvicolum</i>	3/0	0	
	<i>Micronycteris</i>		<i>sp.</i>	1/1	1	
	<i>Phyllostomus</i>		<i>elongatus</i>	1/1	1	
	Platyrrhinus		<i>brachycephalus</i>	3/0	0	
			<i>Incarum</i>	1/0	0	
	Rhinophylla		<i>pumilio</i>	1/0	0	
			<i>fischeriae</i>	1/0	0	
	<i>Trachops</i>		<i>cinchus</i>	2/0	0	
	<i>Trinycteris</i>		<i>nicefori</i>	1/0	0	
	Uroderma		<i>magnirostrum</i>	1/0	0	
			<i>bilobatum</i>	1/0	0	
	<i>Vampyrum</i>		<i>Spectrum</i>	2/0	0	
	<i>Vampyrodes</i>	<i>caraccioli</i>	1/1	1		
	Vespertilionidae	<i>Myotis</i>	<i>sp.</i>	8/0	0	
			<i>nigricans</i>	8/0	0	
Total	6	25	34	157/9	7	

Fonte: (LEITE, B. H. S., 2015).

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

Quadro 2 - Isolados, hospedeiros e números de acesso das sequências de SSU rDNA e gGAPDH determinados neste estudo e utilizados nas análises filogenéticas

Espécie	Código	Hospedeiro	SSU rDNA	Número de acesso gGAPDH
<i>Trypanosoma sp.</i>	CBT 68	<i>Pteronotus parnellii</i>	KR653210	KR653217
	BMC 1069	<i>Pteronotus parnellii</i>	KR653211	KR653218
<i>T. cruzi marinkellei</i>	CBT 48	<i>Micronycteris sp.</i>	KR653212	
	CBT 53	<i>Chrotopterus auritus</i>	KR653213	
	CBT 93	<i>Phyllostomus elongatus</i>	KR653214	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	CBT 86	<i>Carollia perspicillata</i>	KR653215	
	CBT 92	<i>Vampyrodes caraccioli</i>	KR653216	

Fonte: (LEITE, B. H. S., 2015).

Os isolados de morcegos da família Phyllostomidae apresentaram morfologia das formas de cultura e do comportamento biológico em culturas semelhantes ao subgênero *Schizotrypanum*. A morfologia e comportamento do CBT 68 e BMC 1069 identificados na espécie *Pteronotus parnellii* foram distintos dos outros isolados.

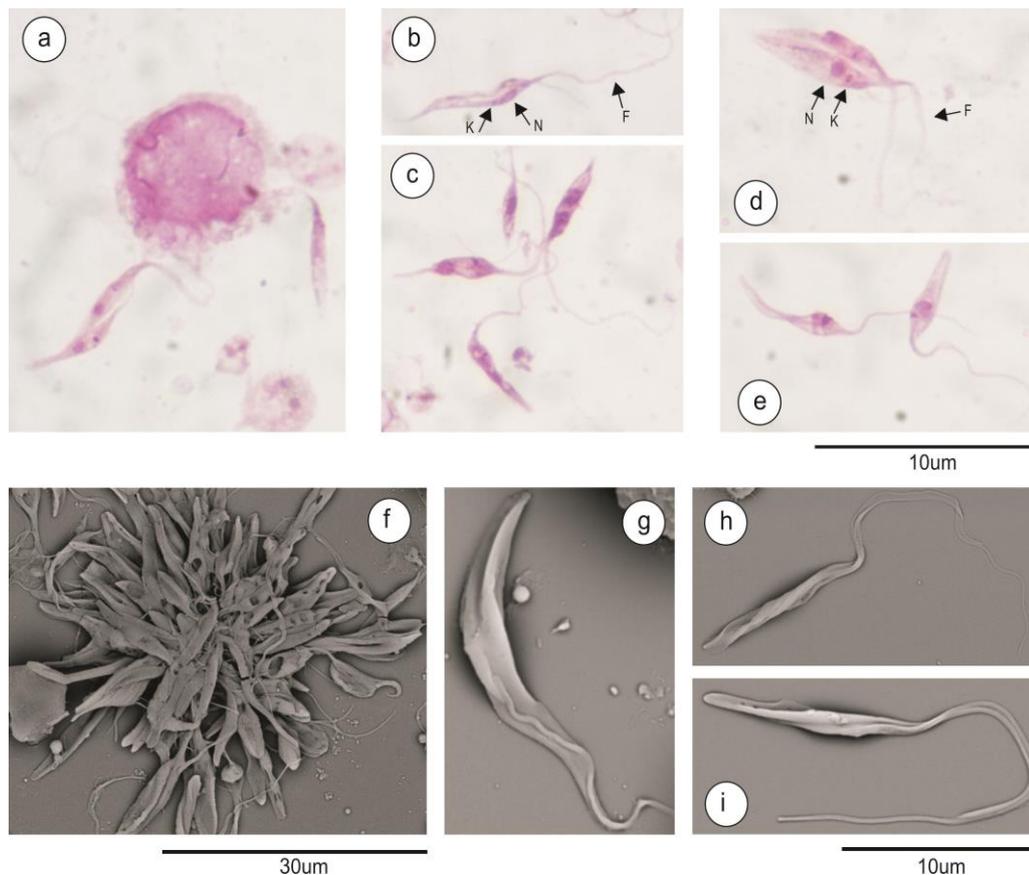
Hemoculturas de *P. parnellii* positivaram em 8 dias e, em seguida, parasitas começaram a morrer. Para evitar a morte dos parasitas, foram transferidos para as monocamadas de células de mamíferos (Vero) e células de inseto (Sf9). As células de insetos levaram ao crescimento em células SF9 e TC-100 media com 10% FBS e isolamento (CBT 68) e a hemocultura positiva (BMC 1069) não conseguiu se recuperar em células SF9 e foram perdidas. Entretanto, massa de parasitas foi preservada para realização de estudo molecular, mas não foi possível verificar a invasão de células de inseto e de mamífero.

Na cultura estacionária do CBT 68, depois de 8 dias após a inoculação em células SF9, flagelados grandes e finos apresentaram um cinetoplasto posterior assemelhando-se a formas de cultura tripomastigota metacíclicos, mas essas formas eram muito raras em células monocamadas.

Formas epimastigotas apresentaram um longo flagelo livre com motilidade. Morfológicamente eram grandes e largos e exibiam um grande cinetoplasto arredondado posicionado próximo ao núcleo (Figura 2a-e). Formas de cultura

tripomastigotas metacíclicos foram representados por tripanossomas grandes e finos (Figura 2b). O flagelo era quase o tamanho do corpo do tripomastigota. O *Trypanosoma* sp. não apresentou formas amastigotas ou epimastigotas em culturas axênicas ou células em monocamada. Não foram feitos esfregaços das amostras coletadas de morcegos, não sendo possível detectar e descrever a morfologia dos tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. A microscopia eletrônica de varredura realizada nas culturas de *Trypanosoma* sp. apresentou formas epimastigotas organizadas em rosetas ligadas pela região flagelar (Figura 2-F). As formas epimastigotas eram longas e largas (Figura 2g-i) e nas formas tripomastigotas não foram detectadas em diferentes preparações analisadas.

Figura 2 - Fotomicrografias de microscopia e microscopia eletrônica de varredura de luz de formas de cultura de uma espécie não classificada, *Trypanosoma* sp. Morfologia das formas de cultura Giemsa-stained (a-e), formas epimastigotas (a,c-e) e formas tripomastigotas (b). Formas epimastigotas em rosetas (f) separadas (g-i). N, núcleo; K, kinetoplasto; F, flagelo

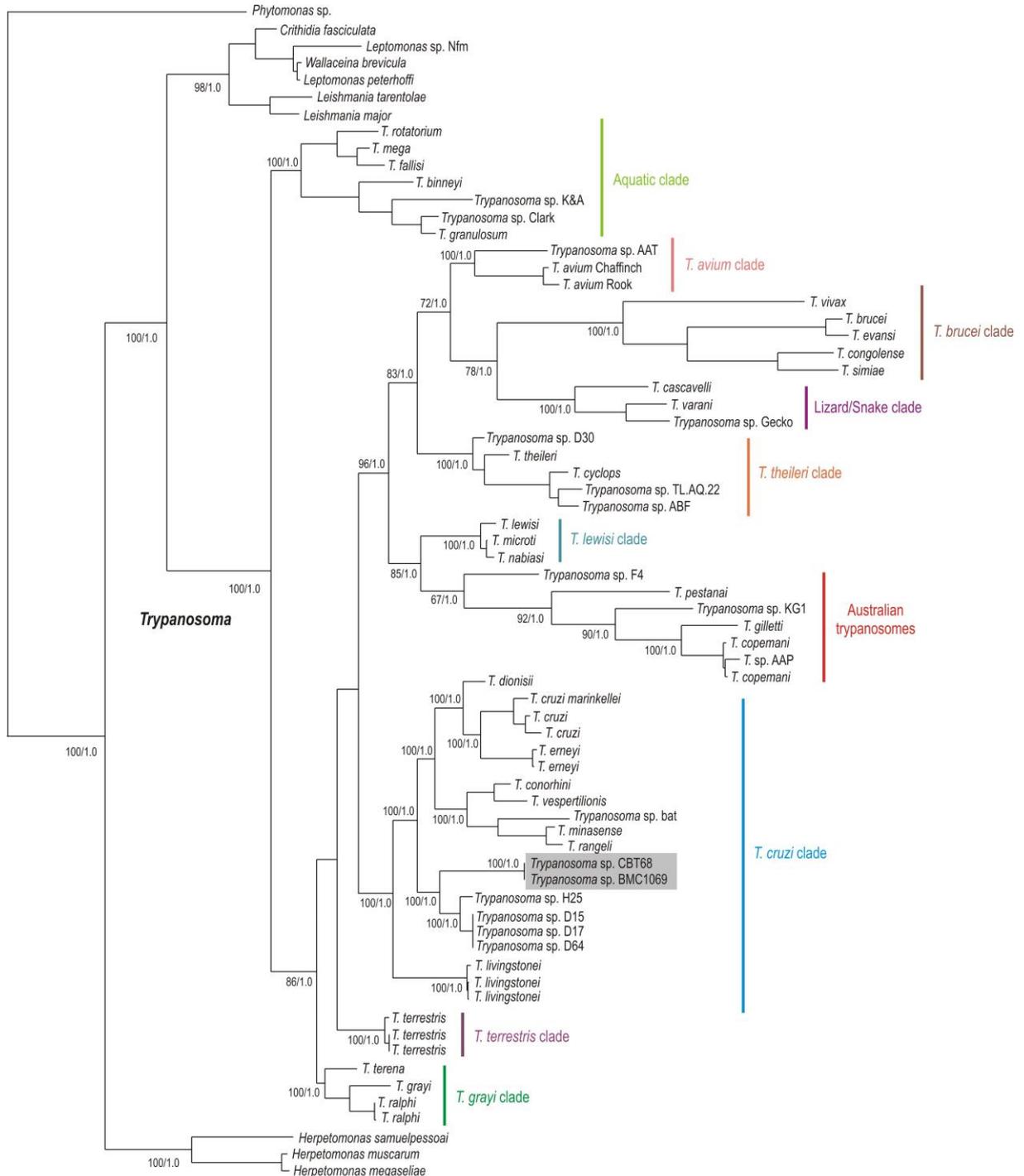


Fonte: (LEITE, B. H. S., 2015).

Relações filogenéticas com base na V7V8 SSUrDNA (região barcode) foram inferidas por meio de máxima parcimônia e análise Bayesiana e topologias congruentes foram geradas para tripanossomas *Schizotrypanum* (Figura 3). O subgênero *Schizotrypanum* é um grupo monofilético (100% de bootstrap e 1% probabilidade a posteriori) e inclui as espécies *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. c. marinkellei* e *T. cruzi*. Os isolados obtidos neste estudo foram incluídos em dois ramos monofiléticos: três isolados (CBT 48, CBT 53 e CBT 93) foram agrupados com a cepa de referência (B7) de *T. c. marinkellei* (100% de bootstrap e 1,0% de probabilidade Bayesiana a posteriori) (Figura 3); Dois isolados foram identificados no ramo de *T. cruzi*, o CBT 92 coletado da espécie *Vampyrodes caraccioli* foi agrupado com isolados de TCI e CBT 86 (*Carollia* sp.) com o grupo TCBat. Este estudo é o primeiro relato do TCBat no bioma Amazônico Brasileiro.

As sequências SSU rDNA e gGAPDH obtidas a partir de isolados da espécie *Pteronotus parnellii* foram submetidos a análise BLAST apresentando que esses isolados estavam mais próximos (98% de similaridade) para *Trypanosoma* sp. H25 de Kangaroo. Filogenia inferida por meio de análises de parcimônia e Bayesiana em concatenados SSU rDNA e genes gGAPDH geraram árvores com topologias idênticas e corroboraram com as relações filogenéticas previamente descritas para outras espécies e clados de tripanossoma, com clados bem-suportados para tripanossomas (Figura 4). Sequências de *Trypanosoma* sp. foram isoladas e amostras primárias foram idênticas para ambos os genes sendo agrupados no clado *T. cruzi* e mais próximo de marsupiais australianos, incluindo *Trypanosoma* sp. H25 (5,7% de divergência) e bem suportado (100% de bootstrap e 1,0 probabilidade posterior Bayesiana) no clado *T. cruzi* (9,58% de divergência).

Figura 4 - Árvore filogenética de uma espécie não classificada, *Trypanosoma* sp., de tripanossomas de morcegos capturados na área de influência da Hidrelétrica de Belo Monte na Amazônia Brasileira. Árvore filogenética baseada em sequências dos genes SSU rDNA e gGAPDH concatenados de 60 isolados de tripanossomas e tripanossomatídeos como outgroup (2901 caracteres e 253 parsimony-informative sites), em cada foi usado máxima parcimônia e métodos Bayesianos. Números são valores de suporte para os principais ramos (bootstrap/ probabilidade posterior; 500 réplicas)



2.4 DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO

Morcegos de diferentes famílias, espécies e hábitos alimentares tem sido infectados na África, Europa, Ásia, Austrália e nas Américas por tripanossomas da Seção Stercoraria (subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) e Salivaria (*Trypanozoon*). Uma espécie de tripanossoma pode infectar mais de uma espécie de morcego, morcegos normalmente tem infecção mista com mais de uma espécie de tripanossoma. Embora a ocorrência de tripanossomas em morcegos seja muito comum, a maioria das espécies descritas não foi cultivada e os relatos são baseados apenas em dados morfológicos e hospedeiro de origem. Assim, a diversidade dos tripanossomas de morcegos pode estar sub ou superestimado.

As infecções mais comuns são causadas por espécies dos subgêneros *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*, e morcegos insetívoros são frequentemente os mais infectados (HOARE, 1972; MARINKELLE, 1976; MOLYNEUX, 1991;). Estudos genéticos de tripanossomas de morcegos são escassos e apenas *T. Dionisi*, *T. vespertilionis*, *T. sp bat* (isoladas na África) e *T. cruzi marinkellei* foram incluídos em árvores genéticas (STEVENS; RAMBAUT, 2001; HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007).

Desde a última revisão de tripanossomas de mamíferos, algumas espécies de tripanossomas de morcegos foram descritas e incluídas em estudos filogenéticos. *T. desterrensis* em Santa Catarina, Brasil (GRISARD; CAMPBELL, 2003), *T. erneyi* (LIMA et al., 2013) e *T. livingstonei* (LIMA et al., 2014) na África.

Vários estudos conduzidos no Brasil posicionaram filogeneticamente tripanossomas de morcegos de diferentes regiões e biomas, e identificaram o *T. cruzi* (TCI e Tcbat), *T. cruzi* e *T. marinkellei dionisii* (MARCILI et al., 2009; CAVAZZANA et al., 2010; ACOSTA et al., 2014). Estudos recentes tem apresentado uma clara associação entre a evolução dos morcegos e tripanossomas infectando estes hospedeiros. TCBat foi inicialmente identificado em morcegos no sudeste do Brasil (Marcili et al., 2009). Posteriormente estudos no Panamá encontraram esta linhagem também em morcegos (PINTO et al., 2012; RAMIREZ et al., 2013) e foi recentemente confirmado este infectando humanos na Colômbia. Neste estudo, foi

isolado pela primeira vez TCbat em morcegos capturados na Amazônia, bioma que anteriormente foram registradas espécies de *T. cruzi*, *T. marinkellei* e *T. dionisii* (CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013; ACOSTA et al., 2014). Neste estudo, foi possível também identificar *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi* (TCI), mas estas espécies já são descritas para este bioma (CAVAZZANA et al., 2010; MARCILI et al., 2013).

Pteronotus parnellii é uma espécie de morcego frugívoro que normalmente que normalmente ocorre em cavernas do México ao Brasil, e pertence à subfamília Moormopidae (ELISENBERG; REDFORD, 1999). Esta espécie tem sido relatada sendo parasitada por *T. cruzi* no México (VILLEGAS; SANTILLÁN, 2001) e indivíduos não identificados de tripanossomas capturados na Amazônia (CAVAZZANA et al., 2010).

Estudo realizado no estado de Rondônia no ano de 2005 isolou um tripanossoma não classificado de *Pteronotus parnellii* que possui morfologia similar, e foi posicionado próximo a *Trypanosoma* sp. Bat em uma filogenia baseada somente na região V7V8 SSUrDNA (Cavazzana Jr., 2005). Entretanto, as sequencias obtidas neste estudo não foram depositadas no GenBank ou qualquer outro banco de dados para sequencias de nucleotídeos, impossibilitando a comparação dos isolados do estado de Rondônia com os obtidos nestes estudo. Além disso, a tese de doutorado do Dr. Cavazzana (Cavazzana Jr., 2005) não apresenta uma descrição formal dos isolados/espécie obtidos de *Pteronotus parnellii* em Rondônia.

Os primeiros registros de morcegos na América do Sul, são morcegos da família Phyllostomidae no período do Eoceno-Oligoceno (~30 ma). No entanto, a origem desses animais é controversa. Estudos paleontológicos indicam que esses grupos vieram da América do Norte ou, de acordo com as últimas teorias, do continente Africano (ELISENBERG; REDFORD, 1999; MIYAMOTO; GOODMAN, 2000; COX, 2000; MURPHY et al., 2001; NILSSON et al., 2004; POUX et al., 2006).

Hipóteses baseadas em análises filogenéticas e biogeográficas sugerem que a África é o centro de origem das famílias de morcegos atuais, com sua origem no Cretáceo (~ 65 ma). Dois cenários podem explicar a dispersão dos morcegos que ocorreu no Eoceno (45 ma): dispersão através do Norte da Eurásia, Beringia e América, ou através de intervalos das ilhas transatlânticas (SIMMONS, 2005; EICK;

JACOBS; MATTHEE, 2005). A recente descrição de espécies do clado *T. cruzi* em morcegos na África corrobora com a história biogeográfica dos morcegos.

A crescente demanda por energia elétrica no Brasil é devido aos resultados de crescimento econômico e da implementação de projetos hidroelétricos. Devido ao sistema fluvial do Brasil, a energia hidroelétrica tem destaque na matriz energética do país, como uma das formas mais exploradas. A construção de hidrelétricas geram impactos ambientais inevitáveis, e o reservatório criado pela barragem transforma o ambiente terrestre, através da remoção da vegetação, e o ambiente aquático (SILVA, 2005; ALHO et al., 2011). A remoção da vegetação e da formação do lago gera a perda de habitats, fazendo com que os animais silvestres se desloquem de suas áreas naturais, permitindo o aparecimento ou favorecimento de espécies exóticas, pragas, emergência ou reemergência de doenças (ALHO et al., 2000).

Os morcegos neotropicais são excelentes indicadores da qualidade dos diferentes ecossistemas (MEDELLÍN; EQUIHUA; AMIN, 2000; WILLIG et al., 2007). No Panamá, a fragmentação do habitat tem aumentado a prevalência de parasitas *Trypanosoma* em *Artibeus jamaicensis*, quando comparado os morcegos capturados em fragmentos e áreas de floresta contínua (COTTONTAIL; WELLINGHAUSEN; KALKO, 2009). No entanto, não existem estudos que demonstram a existência de impactos decorrentes da implantação de hidrelétrica em comunidades de morcegos ou em hemoparasitos associados a esses hospedeiros.

Os estudos de levantamento e monitoramento de fauna que são solicitados para a construção de usinas hidrelétricas são grandes oportunidades para a obtenção de amostras de espécies de difícil captura. Os morcegos amostrados neste estudo foram apenas uma pequena parcela do total de espécimes capturados e monitorados ao longo do projeto de monitoramento, pois a maioria dos animais amostrados foi identificado, marcado e liberado de volta para a natureza.

A ocorrência de *T. cruzi* na área da UHE Belo Monte atenta ao risco de migração da população humana necessária para as obras da barragem e as novas cidades que crescem nas imediações destes empreendimentos, porém esta já é uma zoonose já conhecida para a região Amazônica. Por outro lado, o registro de uma espécie ainda não classificada, *Trypanosoma* sp., alerta não só à grande

biodiversidade parasitária ainda desconhecida para a comunidade científica, a necessidade do entendimento das relações filogenéticas do gênero *Trypanosoma*, mas também o surgimento de novos parasitas que podem infectar os seres humanos em condições clínicas e patológicas também desconhecidas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L.; COSTA, A. P.; NUNES, P. H.; GONDIM, M. F. N.; GATTI, A.; ROSSI, J. L.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 349, 2013.
- ACOSTA, I. C.; DA COSTA, A. P.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic rainforest fragment and surroundings in the state of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 686-693, 2014.
- ALHO, C. J. R.; CONCEIÇÃO, P. N.; CONSTANTINO, R.; SCHLEMMERMAYER, T.; STRÜSSMANN, C.; VASCONCELLOS, L. A. S.; OLIVEIRA, D. M. M.; SCHNEIDER, M. **Fauna silvestre da região do Rio manso, MT**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, IBAMA, Centrais Elétricas do Norte do Brasil, 2000. p. 19-29.
- ALHO, J. S.; HERCZEG, G.; LAUGEN, A. T.; RASANEN, K.; LAURILA, A.; MERILA, J. Allen's rule revisited quantitative genetics of extremity length in the common frog along a latitudinal gradient. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, p. 59-70, 2011.
- BAKER, J. R. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflin, 1901. **Experimental Parasitology**, v. 13, p. 219-233, 1963.
- BAKER, J. R.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; BARRETT, T. V. Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (Microchiroptera). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 483-491, 1978.
- BARRETO, M. P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVII. Contribuição para o estudo dos focos naturais da tripanossomose americana. Com especial referência à região nordeste do estado de São Paulo, Brasil). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 1, n. 2 p. 23-36, 1967.
- BARRETO, M. P.; RIBEIRO, R. D.; FILHO, F. F. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LVII. Infecção natural do *Phyllostomus hastatus hastatus* (Tallas, 1767) pelo *T. cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 34, p.615-622, 1974.
- BERNARD, E.; TAVARES, V. C.; SAMPAIO, E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. **Biota Neotropica**, 2011. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/abstract?article+bn00611012011>>. Acesso em: 21 jun. 2015.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 419-427, 2003.

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

CAVALIER-SMITH. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 57, p. 953-994, 1993.

CAVAZZANA, M.; MARCILI, A.; CAMPANER, M.; VELUDO, H. H.; TAKATA, C. S. A.; PAIVA, F.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Biological and morphological characterization and phylogenetic relationship of bat trypanosomes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 163, 2003.

CAVAZZANA, J. R. M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; DA SILVA, F. M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. **International Journal Parasitology Research**, v. 40, p. 345-355, 2010.

CHAGAS, C. *Trypanosoma minaense*. **Brazil-Médico**, v. 22, p. 471, 1908.

COX CB: Plate tectonics, seaways and climate in the historical biogeography of mammals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 509-516, 2000.

COTTONTAIL, V. M.; WELLINGHAUSEN, N.; KALKO, E. K. V. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panama. **Parasitology**, v. 136, p. 1133-1145, 2009.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, p. 149-159, 1997.

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.

DIAS, E. The genus *Schizotrypanum* Chagas, 1909. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 34, n. 2, p. 213-227, 1939.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics the central neotropics**. Chicago, University of Chicago Press, 1999. v. 3, p. 93-94.

FABIA'N, M. E. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, p. 69-81, 1991.

FABIAN, M. E. Contribuição ao estudo de infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 1, p. 69-81, 1991.

FENTON, M. B. **Bats**. New York: Facts On File, Inc., 1992.

FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. **Parasitology**, v. 107, p.219-224, 1993.

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 Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 427–435, 2008.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 557–565, 2000.

GRISARD, E. C.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. A new species of *Trypanosoma desterresis* sp.n isolated from South American bats. **Parasitology**, v. 127, p. 265-271, 2003.

GURTLER, R. E.; CECERE, M. C.; LAURICELLA, M. A.; CARDINAL, M. V.; KITRON, U.; COHEN, J. E. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 134, p. 69–82, 2007.

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

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.

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 Parasitology**, v. 34, p.1393-1404, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.08.011.

Disponível em:

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

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage of trypanosomes from australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 431-443, 2005a.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; HOLZ, P.; BOAG, B.; COOKE, B.; GIBSON, W.C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3167-3175, 2005b.

HAMILTON PB, GIBSON WC, STEVENS JR. 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.

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

HAMILTON, P. B.; 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.

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.

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

JAKES, K. A.; O'DONOGHUE, P. J.; ADLARD, R. D. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australia tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. **Parasitology**, v. 123, p. 483-487, 2001a.

KESSING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology Letters**, v. 9, p. 485-498, 2006.

LAKE, J. A.; DE LA CRUZ, V. F.; FERREIRA, P.C.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Evolution of parasitismo: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 85, n. 13, p. 4779-4783, 1988.

LIMA, L.; SILVA, F. M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; 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.

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. 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, V. S.; JANSEN, A. M.; MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 263, 2014.

LUKES, J.; JIRKU, M.; DOLEZEL, D.; KRAL'OVÁ, I.; HOLLAR, L.; MASLOV, D. A. Analysis of ribosomal RNA genes suggest that trypanosomes are monophyletic. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, n. 5, p. 521-527, 1997.

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

SILVA, F. M.; MARCILI, A.; ORTIZ, P.A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAODIAS, J. L.; SHAW, J. J.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 522-529, 2010.

MARCILI, A.; VALENTE, V.; VALENTE, A.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SILVA, F. M., NAIFF, R.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *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, 2009.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; SILVA, F. M., 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, 2009.

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* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p.1265-1274, 2009a.

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. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1071-1076, 2013.

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

MARINKELLE, C. J. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *longiflagellum* sp. n. from the tomb bat, *Tapozous nudiventris*, from Iraq. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 13, p. 262-264, 1977.

MASLOV, D. M.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of tripanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 197-202, 1996.

MEDELLÍN, R. A.; EQUIHUA, M.; AMIN, M. A. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in Neotropical Rainforests. **Conservation Biology**, v. 14, n. 6, p. 1666-1675, 2000.

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

MIYAMOTO, M. M.; GOODMAN, M. Biomolecular systematics of eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification. **Systematic Zoology**, v. 35, p. 230-240, 1986.

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.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; O'BRIEN, S. J.; MADSEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C. J.; TEELING, E.; RYDER, O. A.; STANHOPE, M. J.; JONG, W. W.; SPRINGER, M. S. Resolution of the early placental radiation using Bayesian phylogenetics. **Science**, v. 294, p. 2348-2351, 2001.

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

NILSSON, M. A.; ARNASON, U.; SPENCER, P. B. S.; JANKE, A. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. **Gene**, v. 340, p. 189-196, 2004.

PINTO, A. S.; BENTO, D. N. C. *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the state Piauí northeastern. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, p. 31-34, 1986.

PINTO, C. M.; KALKO, E. K. V.; COTTONTAIL, I.; WELLINGHAUSEN, N.; COTTONTAIL, V. M. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1328–1332, 2012.

PIRES, J. M.; PRANCE, G. T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. In: PRANCE, G. T.; LOVEJOY, T. E. (Ed.). **Key Environments: Amazonia**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 109-145.

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.

POUX, C.; CHEVRET, P.; HUCHON, D.; DE JONG, W. W.; DOUZERY, E. J. Arrival and diversification of caviomorph rodents and platyrrhine primates in South America. **Systematic Biology**, v. 55, n. 2, p. 228-244, 2006.

RAMIREZ, J. D.; TAPIA-CALLE, G.; MUÑOS-CRUZ, G.; POVEDA, C.; RENDON, L. M.; HINCAPIE, E.; GUHL, F. Trypanosome species in Neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 250-256, 2013.

REIS, N.R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; DE LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: N. R. REIS, 2006. p. 437.

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

RODRIGUES, A. C.; GARCIA, H. A.; BATISTA, J. S.; MINERVINO, A. H.; GÓES-CAVALCANTE, G.; SILVA, F. M., FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M. M. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 111-122, 2010a.

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.

SILVA JÚNIOR, M. C. 100 Árvores do Cerrado: guia de campo. Brasília: Ed Rede de Sementes do Cerrado, 2005. p. 278.

SILVA-ITURRIZA, A.; NASSAR, J. M.; GARCÍA-RAWLINS, A. M.; ROSALES, R.; MIJARES, A. *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of

multiple origins of that parasite in South America. **Parasitology International**, v. 62, p. 95-99, 2013.

SIMMONS, N. B. An eocene big bang for bats. **Science**, v. 307, p. 527-528, 2005.

SLEIGH, M. A. **Protozoa and other protists**. London: Edward Arnold, 1989.

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

STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; BINGLE, L. E. H; GIBSON, W. C. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 29, p. 749-757, 1999a.

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

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

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

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

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

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 264-269, 2013.

THOMAS, M. E.; RASWEILER, I. J. J.; D'ALESSANDRO, A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 559-565, 2007.

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

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SA´NCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A.; LO´PEZ, E.; GONZA´LEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; DE ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 225–233, 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. 236-43. 2010.

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

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

VILLEGAS-GARCÍA, J. C.; SANTILLÁN-ALARCÓN, S. Sylvatic focus of American Trypanosomiasis in the State of Morelos, Mexico. **Revista de Biología Tropical**, v. 49, p. 685–688, 2001.

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.

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

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

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

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

VOTÝPKA, J.; SUKOVÁ, E.; KRAEVA, N.; ISHEMGULOVA, A.; DUŽÍ, I.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, p. 763-781, 2013.

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

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.

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.

WILLIG, M.; PRESLEY, S.; BLOCH, C.; HICE, C.; YANOVIK, S.; DÍAZ, M.; CHAUCA, L.; PACHECO, V.; WEAVER, S. Phyllostomid bats of Lowland Amazonia: effects of habitat alteration on abundance. **Biotropica**, v. 39, n. 6, p. 737-746, 2007.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; 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. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.