

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



JULIA PEREIRA MOLINA

“CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR TRIPANOSSOMATÍDEOS (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) PRESENTES EM TRÊS ESPÉCIES DE CASCUDO (PISCES: LORICARIIDAE) DO RIO MOGI-GUAÇU, SP.”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JULIA PEREIRA MOLINA
Marlene Tiduko Ueta
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARLENE TIDUKO UETA

Campinas 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M733c

Molina, Julia Pereira

Caracterização da infecção por tripanossomatídeos (Protozoa; Kinetoplastida) presentes em três espécies de cascudo (Pisces: Loricariidae) do Rio Mogi-Guaçu, SP / Julia Pereira Molina. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Marlene Tiduko Ueta.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tripanossomatídeos. 2. Loricariidae. 3. *Hypostomus albopunctatus*. 4. *Hypostomus regani*. 5. *Hypostomus strigaticeps*. 6. Hirudíneos. 7. Mogi-Guaçu, Rio (SP). I. Ueta, Marlene Tiduko, 1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of infection by Trypanosomatids (Protozoa: Kinetoplastida) present in three species of armored catfish (Pisces: Loricariidae) from Mogi-Guaçu river, SP.

Palavras-chave em inglês: Trypanosomatids; Loricariidae; *Hypostomus albopunctatus*; *Hypostomus regani*; *Hypostomus strigaticeps*; Leeches; Mogi-Guaçu, River (Brazil).

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Marlene Tiduko Ueta, Maria José Tavares Ranzani Paiva, Edson Aparecido Adriano.

Data da defesa: 25/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 25 de agosto de 2010

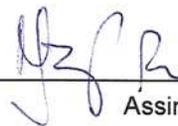
BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (Orientadora)



Assinatura

Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva



Assinatura

Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano



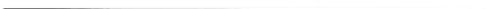
Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti



Assinatura

Prof. Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares



Assinatura

A minha família por sempre
acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta**, pela oportunidade, orientação e dedicação durante todo esse tempo, por compartilhar seus conhecimentos de maneira clara, levando sempre em conta nossos limites, incentivando a cada nova fase, pela amizade e respeito.

Agradeço ao **Dr. Rubens Riscala Madi** de forma especial pela grande amizade, pela imensa ajuda em todas as fases deste trabalho, pela infinita paciência em me ouvir, risadas, conversas e conselhos, e pelo Tim, que foi de extrema importância na parte final deste trabalho.

A **Prof. Dra. Vera Nisaka Solferini** pela ajuda e sugestões na parte molecular e por ter cedido o laboratório e todo o material necessário para realização dos experimentos.

A bióloga **Célia Bresil** pela imensa ajuda e incansáveis tentativas nos experimentos moleculares e ótimas conversas.

Ao **Centro de Pesquisa e Gestão dos recursos pesqueiros continentais do Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade – CEPTA/ICMBio**.

Ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Ceccarelli** pela oportunidade de realizar o trabalho no CEPTA, pela disponibilidade dos laboratórios, material e peixes que nunca faltaram.

Ao técnico **Ricardo Afonso Torres de Oliveira** pela ajuda e apoio técnico e pelas inúmeras risadas.

Ao **Dr. Oswaldo Takeshi Oyakawa** do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, pela identificação dos peixes.

Ao **Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia e Universidade Estadual de Campinas**.

Aos **Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães** e **Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano** pela leitura atenciosa no exame prévio.

A **Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti** pela amizade e sugestões relevantes no exame prévio.

Ao técnico do laboratório **João Batista Alves de Oliveira** pelo apoio, ajuda e conversas agradáveis.

Aos meus amigos de laboratório **Maria Isabel, Tarsila, Michelle, Claudineide, Luciana e Lincoln** pela companhia, apoio, carinho e muitas risadas.

As amigas **Juliana e Daniela** por estarem presentes em todos os momentos.

Aos meus pais **José Mauro e Lenice** por sempre apoiarem e acreditarem, e pelo amor incondicional, e aos meus irmãos **Marilia e Gabriel** pelo apoio e paciência.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Local de coleta.....	10
3.2. Coletas de peixes.....	10
3.3. Confeção do esfregaço.....	12
3.4. Análise Molecular.....	12
3.4.1. Extração do DNA.....	12
3.4.2. Amplificação dos genes.....	13
3.4.3. Gel de Agarose.....	14
3.4.4. Purificação para seqüenciamento.....	14
3.5. Análise Morfométrica.....	15
3.6. Análise Estatística.....	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8. ANEXO	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Hypostomus albopunctatus</i> do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	5
Figura 2. Exemplar de <i>Hypostomus regani</i> do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	6
Figura 3. Exemplar de <i>Hypostomus strigaticeps</i> , do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	6
Figura 4. Rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	10
Figura 5. Marcação com etiqueta tubular plástica.....	11
Figura 6. Tanque de criação onde os cascudos foram mantidos até a recaptura.....	11
Figura 7. Esquema de <i>Trypanosoma</i> sp. E os parâmetros de medidas.....	16
Figura 8. Média das prevalências mensais ao longo do ano de 2008 das três espécies de peixes.....	17
Figura 9. Variação mensal da densidade média de <i>Trypanosoma</i> sp. por espécie de peixe.....	18
Figura 10. Exemplares de hirudíneos aderidos na boca de <i>Hypostomus strigaticeps</i>	20
Figura 11. Exemplar de hirudíneo <i>Placobdella</i> sp. coletado em <i>Hypostomus regani</i> do Rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	20
Figura 12 Gel de Agarose 1% mostrando o produto de PCR de DNA genômico de <i>Trypanosoma</i> spp. extraído de hirudíneo.....	21
Figura 13. Distribuição de frequência por comprimento do corpo dos tripanossomas encontrados nas tres espécies de cascudos entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009, Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.....	29

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1. Formas tripomastigotas presentes no sangue de <i>Hypostomus albopunctatus</i>	25
Prancha 2. Formas tripomastigotas presentes no sangue de <i>Hypostomus regani</i>	27
Prancha 3. Formas tripomastigotas presentes no sangue de <i>Hypostomus strigaticeps</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre a densidade, o peso e o comprimento das três espécies de cascudos coletados no Rio Mogi Guaçu, SP, entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009.....	19
Tabela 2. Prevalência de <i>Trypanosoma</i> sp. em 3 espécies de cascudos coletados no Rio Mogi-Guaçu e em subseqüentes recapturas após mantidos em tanques de criação do CEPTA no ano de 2008.....	19
Tabela 3. Valores (em μm) da média das medidas dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos, entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009.....	22
Tabela 4. Morfometria das espécies de <i>Trypanosoma</i> sp. descritos em diferentes espécies de peixes. As espécies em destaque referem-se aos do presente estudo.....	23

RESUMO

Os tripanossomas já foram reportados em diversas espécies de peixes de água salgada e doce, sendo a maioria das espécies descritas com base nas características morfológicas. Tripanossomas parasitos de peixes são heteroxenos e são transmitidos por hirudíneos. Este trabalho tem como objetivos caracterizar a prevalência e densidade da infecção por *Trypanosoma* sp. presentes no sangue de três espécies de cascudos do rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP e caracterizar morfológicamente e por técnicas moleculares os exemplares de *Trypanosoma* encontrados no sangue dos cascudos. Entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009 foram coletados 256 exemplares de cascudos sendo 60 *Hypostomus albopunctatus*, 100 *Hypostomus regani* e 96 *Hypostomus strigaticeps*. O sangue foi coletado por punção cardíaca e alíquotas de 8µl foram retiradas para confecção de esfregaço em camada delgada, que foram fixados em metanol e corados por Giemsa, para a determinação da positividade e densidade dos tripanossomas. Após a biometria e coleta do sangue os peixes foram marcados e metade foi acondicionada em um tanque de criação do CEPTA/ ICMBIO para verificação da manutenção da infecção e o restante foi devolvido ao rio. A prevalência geral de tripanossomas foi de 47,6 % e densidade média geral de 0,75 parasitas/ µl de sangue. A prevalência ao longo do ano apresentou diferenças significativas apenas para *Hypostomus regani* ($p=0,0054$) e *Hypostomus strigaticeps* ($p=0,0007$). A densidade média de parasitas não apresentou diferenças significativas entre as três espécies de peixes analisados, assim como a variação mensal da densidade por espécie de peixes. Hirudíneos do gênero *Placobdella* sp. foram coletados da superfície do corpo e da boca de *H. regani* e *H. strigaticeps* para extração do DNA, os oligonucleotídeos utilizados (S-1842 e S-1843) amplificaram um fragmento de 1000pb do gene 18S rRNA dos tripanossomas isolados de hirudíneos coletados em *H. regani* e *H. strigaticeps*. Dos 19 peixes recapturados após dois meses apenas três se mantiveram positivos. Foram medidos 255 tripanossomas sendo 66 de *H. albopunctatus*, 64 de *H. regani* e 95 de *H. strigaticeps* e os valores foram comparados com os de outras espécies de tripanossomas encontradas em peixes do gênero *Hypostomus*. Os parasitas encontrados nas três

espécies de peixes apresentaram características morfológicas semelhantes. Foi estabelecida a frequência de ocorrência de acordo com a variação do comprimento do corpo para evidência de pleomorfismo. Os dados morfológicos mostram que *Trypanosoma* sp.1 e *Trypanosoma* sp.2 podem ser considerados de espécies diferentes; as análises evidenciaram a presença de pleomorfismo nos tripanossomas encontrados nas três espécies de peixes.

ABSTRACT

Trypanosomes have been reported in several species of fish that inhabit salt and fresh waters. The majority of these protozoan species are described based on morphologic features. The parasites are heteroxenic and are transmitted by leeches. This work aims to characterize the prevalence and density of infection by *Trypanosoma* sp. present in the blood of three species of armored catfish collected from Mogi Guaçu river (Cachoeira das Emas, Pirassununga city, SP) and characterize morphologically and by molecular techniques the trypanosomes found in the blood of catfish. Between february 2008 and february 2009, 256 specimens of armored catfish were collected, being 60 *Hypostomus albopunctatus*, 100 *Hypostomus regani*, and 96 *Hypostomus strigaticeps*. The blood was collected by cardiac puncture and a sample of 8µl was removed to realize blood smears on microscope slides. The slides were fixed in methanol and stained with giemsa for posterior analysis on light microscopy for determination of positive presence and density of trypanosomas. After biometric analysis and blood collection fish were marked half of the fish marked were maintained in a tank of CEPTA/ ICMBIO for future verification of the infection maintenance and the other half were returned to the river. It was found a prevalence of 47,6% and the average density of 0,75 parasitas/µl of blood. The prevalence during the year presented significative differences only for *Hypostomus regani* ($p=0,0054$) e *Hypostomus strigaticeps* ($p=0,0007$). The average density of parasites showed no significant differences among the three fish species analyzed and the monthly variation of density per species of fish. Also, leeches of the genus *Placobdella* sp. were collected from the surface of the body and mouth of armored catfish for DNA extraction. The primers used (S-1842 and S-1843) amplified a 1000bp fragment of the 18S rRNA gene of trypanosomes isolated from leeches collected in *H. regani* and *H. strigaticeps*. Of the 19 fish recaptured after two months only three remained positive. Therein, 255 trypanosomes were measured being 66 *H. albopunctatus*, 64 *H. regani* and 95 *H. strigaticeps* and values were compared with those of other parasite species found in different species of fish. The parasites found in the three species of fish presented similar morphological characteristics. The frequency of occurrence was established according to the variation in body length as evidence of pleomorphism. Nevertheless morphological data show

that *Trypanosoma* sp.1 and *Trypanosoma* sp.2 can be considered distinct species, the analysis revealed the presence of pleomorphism in trypanosomes found in the three species of fish.

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomas de peixes foram observados em diversos continentes e numerosas espécies foram descritas em peixes de água salgada e doce (LOPES *et al.*, 1990; EIRAS, 1994)

As formas observadas nos peixes apresentam o corpo alongado com as extremidades afiladas, membrana ondulante ao longo do corpo e um flagelo livre na extremidade anterior (EIRAS, 1994; WOO, 1995).

Os tripanossomas de peixes apresentam um ciclo heteroxeno envolvendo um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Até o momento apenas a sanguessuga aquática hirudínea é conhecida como o hospedeiro transmissor (vetor) através da sua fixação nas nadadeiras, pele, mucosas e brânquias das várias espécies de peixes hospedeiros. A infecção do peixe pelo tripanossoma ocorre durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado, não existem evidências de infecções pela ingestão pelo peixe de uma sanguessuga infectada (BECKER, 1977; LOM, 1979).

Após a ingestão, pela sanguessuga, de tripanossomas presentes no sangue dos peixes estes passam por uma série de transformações morfológicas: formas amastigota, esferomastigota, epimastigota e tripomastigota. Assim que os flagelados são ingeridos com o sangue eles começam a se dividir no estômago dos hirudíneos. Primeiro os parasitas apresentam um tamanho reduzido e um flagelo pequeno comparado com o comprimento do corpo, depois ocorrem moderados “alongamentos” até formas bem longas. Finalmente os tripanossomas começam a se mover, com o auxílio do flagelo, para a probóscide dos hirudíneos. (KHAN, 1976; BECKER 1977) Aderências no estômago e no sistema digestório também foram observadas, e por último são transmitidos ao peixe hospedeiro por inoculação no momento em que as sanguessugas se alimentam do sangue do peixe (BECKER, 1977).

A forma amastigota é a primeira a aparecer e permanece no hirudíneo enquanto este estiver infectado. A forma esferomastigota aparece simultaneamente à forma epimastigota mas rapidamente desaparece no momento que é transformada em epimastigota. A seqüência de formas é diretamente relacionada com o nível de digestão do sangue ingerido e na maioria dos casos a forma tripomastigota aparece somente quando o sangue foi totalmente digerido, dependendo também da temperatura e da

quantidade de sangue ingerido. O hirudíneo se torna infectante no momento em que o tripanossoma atinge a forma de tripomastigota metacíclico e migra para o aparelho bucal do animal, processo que pode durar de três a dezenove dias (LOM, 1979).

O desenvolvimento do parasita nos peixes compreende várias fases com características diferentes. Após o repasto do hirudíneo, os flagelados estão ausentes no sangue periférico, não se conhece, nesta fase pré-patente, o local onde os parasitas se encontram. Há indícios de que os tripanossomas possam passar por estágios de desenvolvimento (BECKER, 1977). O aparecimento dos parasitas no sangue periférico caracteriza a fase patente, com aumento no número de parasitas, até atingir seu valor máximo, podendo alcançar níveis bastante elevados. Infecções pesadas podem levar a morte do hospedeiro, mas geralmente a infecção atinge a fase crônica, onde ocorre diminuição do número de flagelados. Esta fase pode durar semanas ou persistir por tempo indeterminado, motivo pela qual é a fase mais estudada. Em espécies polimórficas a forma tripomastigota é típica dessa fase, e como regra não ocorre divisões ou mudanças de fase do parasita, afirmando o fato que os tripanossomas de peixes se multiplicam exclusivamente no vetor (LOM, 1979). Finalmente, atinge-se o que se pode chamar de fase de ausência aparente de parasita, manifestado pela ausência de parasitas no sangue periférico (LOM, 1979; LOM & DYKOVÁ, 1992; EIRAS, 1994; EIRAS *et al.*, 2008). O completo desaparecimento de flagelados no sangue dos peixes que sobreviveram a alta infecção ocorre devido à imunidade adquirida, pois Islam & Woo, (1991) e Woo & Poyton, (1999) demonstraram que *Carassius auratus* que se recuperaram de infecções por *T. carassii* ficaram protegidos de reinfecções. Lom & Suchankova (1974) mostraram ainda que *Carassius auratus* e carpas que sobreviveram a altas infecções de várias amostras de *T. danilewskyi* e *T. borelli* não puderam ser reinfectados com a mesma espécie de flagelados. A imunidade à reinfecção pode ser observada até 350 dias depois (LOM, 1979).

Os hirudíneos compreendem uma classe especializada do filo dos Anelídeos, a maioria ocorre em água doce, mas também são encontrados em água salgada e algumas espécies são terrestres. Possuem corpo segmentado, e podem ser diferenciadas dos outros pertencentes do filo pelas ventosas anterior e posterior que possuem. Os hirudíneos que parasitam peixes fazem isso apenas temporariamente

para sugar o sangue do animal. Muitos hirudíneos se alimentam em pequenos invertebrados, mas algumas espécies parasitam peixes e outros vertebrados.

A patogenia causada por esses animais pode ser maior do que uma simples hemorragia no local onde o hirudíneo se alimentou. Em infecções severas, sanguessugas podem causar anemia e até morte do hospedeiro, isso está diretamente relacionado com o número de flagelados no sangue do animal. Além disso, após se alimentarem, os hirudíneos abrem o local para a entrada de possíveis bactérias e vírus, sendo também hospedeiros intermediários de outros protozoários flagelados, como *Cryptobia* e *Trypanoplasma* (ISLAM & WOO, 1991; WOO, 1995; THATCHER, 2006).

Peixes que se recuperaram de uma infecção por tripanossomas, podem criar imunidade contra uma possível reinfecção. Portanto o estado do sistema imune do hospedeiro é um fator importante, e esse pode ser comprometido por vários fatores como: infecções concomitantes, má nutrição do animal e por fatores ambientais (poluição e presença de metais pesados) (ISLAM & WOO, 1991; WOO, 1996, OVERATH *et al.*; 1999).

No Brasil foram descritas 59 espécies de tripanossomas infectando peixes de água doce e salgada, e as famílias de peixes afetadas pela parasitose são diversas: Loricariidae, Pimelodidae, Doradidae, Erythrinidae, Synbranchidae, Serrasalminidae, Anostomidae, Prochilodontidae, Mugilidae e Serranidae (RIBEIRO *et al.*, 1993).

A família mais significativa com relação à presença dos parasitas é a Loricariidae onde 33 espécies são confirmadas em peixes pertencentes ao gênero *Hypostomus*, sendo estes considerados os hospedeiros mais comuns (RIBEIRO *et al.*, 1990 (b)). A prevalência de infecção em cascudos pode ser consequência dos hábitos semi-sedentários destes peixes que possibilita maior infecção por ectoparasitas que por sua vez transmitem os protozoários (FROÉS *et al.*, 1978).

Dentre os siluriformes, os loricarídeos possuem o maior número de espécies de água doce da América do Sul. A grande maioria são peixes de fundo que se alimentam de algas e de microorganismos aderidos ao substrato duro ou mesmo na lama, permanecendo muitas vezes em corredeiras. Segundo Schaefer & Lauder (1986), os exemplares dessa família desenvolveram durante sua evolução modificações anatômicas especializadas na região bucal, modificações que inclui a capacidade de

combinar a sucção da boca com o movimento dos dentes necessário para “agarrar” e explorar o substrato bentônico. Os peixes da família Loricariidae possuem uma habilidade peculiar, podem nadar até a superfície e “respirar” bolhas de ar, essas são então empurradas pelo sistema digestivo do animal onde este possui órgãos respiratórios acessórios (GOSLINE, 1971).

Diversas espécies do gênero *Hypostomus* são associadas a ambientes lóticos, porém Casatti *et al.* (2005) relataram predominância em riachos mais lentos. São considerados peixes de fundo, não migratórios, com maior abundância na estação chuvosa (CASATTI, 2005). Esta família apresenta ampla distribuição, muito presente na bacia do Paraná sendo descritos também na bacia do São Francisco (GARAVELLO & GARAVELLO, 2004; BUCKUP *et al.*, 2007).

Hypostomus albopunctatus (REGAN, 1907) (Figura 1), distribuído ao longo da bacia do Paraná (FROESE & PAULY, 2010), é de baixa frequência de captura, ocorrendo somente em trechos lóticos e em tributários. Possui o corpo revestido por cinco séries de placas ósseas, de coloração escura, apresentando diminutas manchas circulares claras. As nadadeiras também acompanham o padrão colorido do corpo, possui o ventre claro e o primeiro raio da nadadeira ossificado. A cabeça é arredondada e os olhos dorsolaterais são pequenos. A boca é ventral de formato oval e sustenta uma série de dentes depressíveis na maxila. Esta espécie também é considerada não migradora, com hábito alimentar iliófago (BRITTO, 2003).



Figura 1 – Exemplar de *Hypostomus albopunctatus* do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.

Hypostomus regani (IHERING, 1905) (Figura 2), possui o corpo revestido por cinco séries de placas ósseas, de coloração parda, apresentando pequenas manchas circulares claras, dispersas. As nadadeiras acompanham o padrão de colorido do corpo, sendo que as manchas formam faixas sobre as nadadeiras, apresentando o primeiro raio ossificado. A cabeça fortemente ossificada, fundida a estrutura óssea que sustenta as nadadeiras peitorais. Possui uma boca ventral e oval, que acomoda uma série de dentes depressíveis implantados na maxila. É caracterizado como uma espécie não migratória e sua ocorrência é maior em ambientes lóticos e tributários. Possui hábito alimentar iliófago, consumindo alimentos que estão sobre substratos ou aderidos a eles. É uma espécie presente nas bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai (BRITTO, 2003; FROESE & PAULY, 2010).



Figura 2 – Exemplar de *Hypostomus regani* do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.

Hypostomus strigaticeps (REGAN, 1907) (Figura 3) é uma espécie abundante e amplamente distribuída na na bacia do Paraná, especificamente na bacia do Tietê (CASATTI *et al.*, 2005). Como outros loricariídeos, possui importantes adaptações como uma boca ventral, lábios modificados formando uma estrutura sugadora muito aderente, os dentes possuem um formato de espátula que permite raspar o alimentos de vários substratos (SHAEFER & LAUDER, 1986; DELARIVA & AGOSTINHO, 2001). Esta espécie se alimenta principalmente de diatomáceas e algas (POWER, 1984; 1990).



Figura 3 – Exemplar de *Hypostomus strigaticeps*, do Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.

A patogenia das tripanosomíases de peixes é pouco conhecida. Os estudos que vêm sendo realizados estão geralmente relacionados com infecções naturais ou com infecções experimentais. No primeiro grupo verificou-se que os parasitas vivem em relativo estado de equilíbrio com seus hospedeiros, sendo a parasitemia baixa. Contudo podem ser observadas modificações nos parâmetros hematológicos. Islam & Woo (1991) mostraram que os tripanossomas se multiplicam rapidamente em *Carassius auratus* e podem causar anemia e anorexia nos hospedeiros. Peixes infectados podem apresentar descoloração da superfície do corpo, dificuldade de locomoção, protusão dos olhos. Os maiores problemas histopatológicos são encontrados no fígado, baço e rins. (BECKER, 1977; EIRAS *et al.*, 1990, EIRAS *et al.*, 2008)

A descrição de novas espécies de tripanossoma de peixes envolve diversos problemas, como a grande variedade de hospedeiros, a distribuição geográfica e morfometria dos parasitas.

A identificação taxonômica das espécies de tripanossomas de peixes é baseada nas diferenças das características morfológicas dos parasitas (LOPES *et al.*, 1989; EIRAS *et al.*, 1990). Os tripanossomas apresentam polimorfismo, fato que dificulta a identificação de novas espécies (FRÓES *et al.*, 1978). Além disso, segundo WOO e BLACK (1984), a espécie de peixe parasitada pode interferir nos aspectos morfológicos do *Typanosoma*. Entretanto, alguns autores consideram cada parasita encontrado como uma nova espécie baseando-se apenas nas características morfométricas (FIGUEROA *et al.*, 1999; GU *et al.*, 2007(a)). Outros autores consideram que tripanossomas encontrados em uma mesma espécie de peixe só podem ser de uma mesma espécie, sendo possível, no entanto, que a mesma espécie de parasita possa infectar mais de uma espécie de peixe. É possível também que uma mesma espécie de peixe possa ser infectada por mais de uma espécie de tripanossoma (FRÓES *et al.*, 1979; RIBEIRO *et al.*, 1990(a)).

A taxonomia tradicional das espécies de *Trypanosoma*, baseadas nas diferenças morfológicas das formas tripomastigotas da corrente sanguínea, dificilmente podem ser usadas como método seguro na determinação de novas espécies. Técnicas moleculares têm sido mais efetivas quando aplicadas nas determinações taxonômicas

envolvendo tripanossomas (FIGUEROA *et al.*, 1999; KARLSBAKK & NYLUND, 2006; GU *et al.*, 2007(a); GU *et al.*, 2007(b)).

Existem diversas espécies de *Trypanosoma* atualmente descritas no Brasil, sendo a maioria baseada na morfologia dos parasitas. Um estudo molecular destas espécies poderia alterar o número de espécies, além de confirmar possíveis novas espécies. Em Botswana (África) por exemplo, uma análise da sequência genética 18S rRNA mostrou que tripanossomas com características morfológicas semelhantes eram divididos, pelo menos, em dois grupos genotípicos diferentes (DAVIES *et al.*, 2005).

O estudo de tripanossomas de peixe pode auxiliar na solução de importantes problemas comuns no estudo de patogenias causadas por esses parasitas em mamíferos, além de contribuir para a filogenia do grupo (LOM, 1979)

A presença de parasitas em peixes em condições naturais pode não provocar alterações patogênicas, porém em condições de cultivo as infecções parasitárias podem interferir na saúde do peixe hospedeiro. Assim, é importante conhecer os parasitas que afetam as espécies de peixes potencialmente cultiváveis e eventuais impactos econômicos, devido ao crescimento da piscicultura no Brasil.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar a prevalência e densidade da infecção por *Trypanosoma* sp. presentes no sangue de *Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus regani* e *Hypostomus strigaticeps* do rio Mogi Guaçu, SP;
- Caracterizar morfológicamente e por técnicas moleculares os exemplares de *Trypanosoma* encontradas no sangue dos cascudos e nos hirudíneos vetores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

O rio Mogi- Guaçu (Figura 4) nasce em Minas Gerais, município de Cambuí, à uma altitude de 1650m e tem como característica ser um rio de correnteza rápida, considerando seu desnível de 1160 m entre nascente e a foz e a sua extensão de 473Km. Pertence à bacia do Paraná e é afluente do rio Pardo, que por sua vez deságua no rio Grande, na divisa entre os estados de Minas Gerais e São Paulo. Recebe um volume de águas pluviais significativo, o que naturalmente gera influência sobre os peixes, tanto na composição de cardumes quanto na reofilia (GODOY, 1975)



Figura 4 - Rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP

3.2 Coletas de peixes

Foram realizadas coletas mensais, entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009 (um ciclo estacional completo) no rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP (21°55'55"S e 47°22'37"W). Os peixes foram coletados com auxílio de tarrafas e mantidos em tanques circulares de 1000 L no Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEPTA/ICMBio. Em seguida os peixes foram

marcados, numerados com etiqueta tubular plástica (Figura 5) e realizada a biometria antes da coleta de sangue. Após a coleta de sangue, metade dos peixes amostrados foi devolvida ao rio e outra metade mantida em tanques de criação do próprio CEPTA para a observação da persistência da infecção (Figura 6).



Figura 5 – Marcação com etiqueta tubular plástica



Figura 6 – Tanque de criação onde os cascudos foram mantidos até a recaptura

3.3 Confeção da extensão

O sangue foi obtido, individualmente, através de punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 1mL. Em seguida foi colocado em um tubo cônico de 1,5mL contendo anticoagulante (Citrato de Sódio 3,8%) e homogeneizado, foram retiradas cinco alíquotas de 8µL com as quais foram confeccionadas cinco lâminas de extensão em camada delgada, que foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa (1:50 por 20 minutos).

3.4 Análise Molecular

3.4.1 Extração do DNA

O sangue coletado foi utilizado para extração em duas formas, sangue total e plasma sanguíneo, para a separação deste o tubo contendo sangue total foi submetido à centrifugação por 1000 rpm por 10 minutos. A extração do sangue e plasma foi feita utilizando o *Kit DNeasy[®] Tissue Handbook*.

Foi adicionado 20µL de Proteinase K a um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 5-10 µL de sangue com anticoagulante. Ao total foi adicionado 200 µL de tampão AL. E o tubo foi submetido ao vortex. Após a incubação à 70 °C por 10 minutos foi adicionado 200µL de etanol (96-100%) e submetido novamente ao vortex. O produto foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto depois o sobrenadante foi descartado e a primeira lavagem foi feita com 500µL de tampão AW2 e centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm, quando a coluna foi então transferida para um microtubo de centrifugação e foi adicionado 200µL de tampão AE e incubado à temperatura ambiente por 1 minuto. O produto foi submetido à centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto

Foram coletados hirudíneos presentes na superfície do corpo e na boca dos cascudos para extração do DNA utilizando o *Kit Nucleospin Tissue (Macherey- Nage[®])*.

Os hirudíneos foram macerados em 180µl de tampão de lise. Depois de adicionado 25µL de Proteinase K, o tubo foi submetido ao vórtex para garantir que todo o material fosse coberto pela solução de lise. Após a incubação de 1-3 horas à 56^o C, a

amostra foi novamente submetida ao vórtex e adicionado 200µL de tampão B3. Em seguida a amostra foi homogenizada e incubada à 70°C por 10 minutos. Adicionou-se ao material 210µL de etanol (96-100%) para a precipitação do DNA. O produto foi agitado vigorosamente e transferido para a coluna NucleoSpin Tissue Column (Macherey- Nagel®) e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado primeiramente com 500µL de tampão BW e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto à 25⁰ C, a segunda lavagem foi feita adicionando 600µL de tampão B5 à coluna. Com o intuito de remover totalmente os resíduos de etanol a coluna foi novamente centrifugada. A coluna foi então transferida para um microtubo de centrifugação e nela foram adicionados 100µL de Elution tampão BE previamente aquecido à 70⁰ C, e foi realizada a incubação à temperatura ambiente por 1 minuto. Para obtenção do DNA puro, a eluição foi seguida de uma última centrifugação à 12.000 rpm por 1 minuto.

3.4.2 Amplificação do DNA

A caracterização molecular foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando o gene 18S rRNA região LSU rRNA em um termociclador, *Labnet Multi Gene II* com um volume final de 25µL com os seguintes componentes:

- 10ng DNA genômico;
- 0,24mM/L para cada dNTP;
- 2,5pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 3,0mM/L de Cloreto de Magnésio (MgCl₂);
- 1 unidade de *Taq* DNA polimerase Fermentas®;
- Tampão 10X (Kcl)
- H₂O Milli-Q.

A amplificação do gene 18S rRNA região LSU rRNA foi realizada com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

Forward: S-1842 5'- GGG TCT AGA GTA GGA AGA CCG ATA GC-3'

Reverse: S-1843 5'- GTG GTA CCG GTG GAT TCG GTT GGT GAG-3'

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (KARLSBAKK & NYLUND, 2006; GU *et al.*, 2007a).

As condições para a amplificação do gene 18S rRNA região LSU rRNA:

- 94^oC por 3 minutos
 - 94^oC por 45 segundos
 - 53^oC por 45 segundos
 - 72^oC por 45 segundos
 - 94^oC por 45 segundos
 - 50^oC por 45 segundos
 - 72^oC por 45 segundos
 - 72^oC por 10 minutos
- } 5 ciclos
- } 35 ciclos

Como controle de especificidade do produto amplificado, foram realizadas reações de PCR na ausência do DNA.

3.4.3 Gel de Agarose

O produto de PCR foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1X. Uma corrente para gerar uma voltagem de 65-100V entre os eletrodos da cuba foi aplicada ao gel. O gel foi corado com brometo de etídio, e observado em trans-iluminador de U.V. e fotografado. Como referência para o tamanho dos fragmentos, foi utilizado o padrão “100bp DNA Ladder” (Invitrogen[®]) em pares de bases (bp), marcador de peso molecular 500bp (Invitrogen[®]) e marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas[®]).

O tamanho dos fragmentos de interesse foi estimado em função da migração dos padrões. Os fragmentos foram quantificados de acordo com a intensidade da banda e relacionando-a com a concentração dos padrões.

3.4.4 Purificação para Sequenciamento

As amostras foram purificadas de acordo com o protocolo de Precipitação e Purificação de produtos de PCR com PEG (2% PEG, 2,5M NaCl).

Foram colocados 50µL de PEG em um tubo de 0,5mL para o qual foi transferido o produto do PCR e homogeneizado com a pipeta. O material foi incubado a 37⁰C por 15 minutos, e após a incubação o conjunto (PCR+ PEG) foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, em seguida foram adicionados 125µL de etanol 80% gelado e a amostra centrifugada novamente a 14.000 rpm por 2 minutos, sendo essa etapa repetida mais uma vez. O tubo foi então colocado em evaporador a vácuo para a retirada do etanol e ressuspendido em 15µL de H₂O Milli-Q.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP (setor de seqüenciamento de DNA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. As corridas foram feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

3.5 Análise Morfométrica

Para avaliação das características morfológicas das formas tripomastigotas sanguíneas dos peixes, imagens dos parasitas foram capturadas pelo fotomicroscópio e mensuradas através do programa Leica Image Manager IM 50[®]. Os parâmetros analisados foram: comprimento do corpo (CC), comprimento do flagelo livre (FL), distância da parte posterior até o núcleo (PN), distância da parte anterior até o núcleo (AN), largura do corpo (LC), largura do núcleo (LN), comprimento do núcleo (CN), área do núcleo (ArN), largura do cinetoplasto (LK), comprimento do cinetoplasto (CK), distância do cinetoplasto à extremidade posterior (DKP) e área do cinetoplasto (ArK) (Figura 7).

Para o estabelecimento do índice flagelar (IF), índice nuclear (IN), do volume nuclear (VN) e volume do cinetoplasto (VK) foram utilizadas as seguintes fórmulas (LOPES *et al.*, 1989; EIRAS *et al.*, 1990)

$$IF = \frac{CC}{FL} \qquad IN = \frac{PN}{NA}$$

$$VN \text{ e/ou } VK = \frac{\pi}{6} D1.D2 \times \sqrt{(D1.D2)}$$

Onde D1 e D2 são as medidas do comprimento e largura do núcleo e/ou cinetoplasto.

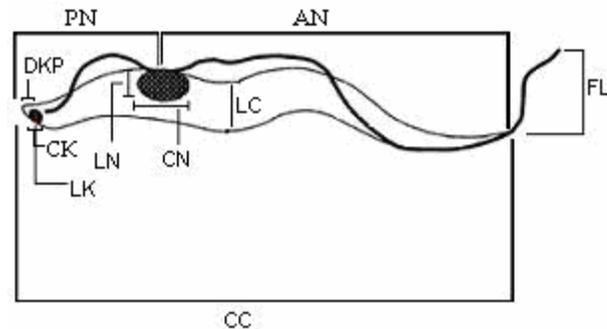


Figura 7. Esquema do *Trypanosoma* sp. e os parâmetros de medidas.

CC: comprimento total do corpo (sem flagelo); FL: comprimento do flagelo livre; PN: distância da extremidade posterior ao núcleo; AN: distância da extremidade anterior ao núcleo; LC: Largura do corpo; LN: largura do núcleo; CN: comprimento do núcleo; LK: largura cinetoplasto, CK comprimento do cinetoplasto, DKP: distância do cinetoplasto à extremidade posterior (EIRAS *et al.*, 1990; LOPES *et al.*, 1989).

3.6 Análise estatística

A prevalência e a densidade foram calculadas segundo os critérios definidos por Bush *et al.* (1997). Foi realizado o teste de comparação múltipla de médias de Duncan com o objetivo de verificar a diferença das densidades entre as espécies de peixes, para comparar as diferenças na variação mensal das densidades e das prevalências por espécie de peixe e além das diferenças entre os parâmetros morfométricos entre as espécies de peixes. Foi ainda calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre as densidades, os pesos e os comprimentos de cada espécie de peixe. Todos os testes foram aplicados com intervalo de confiança igual a 5%. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS (SAS Inc., 1996).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Atual CEUA/Unicamp) sob protocolo N°1475-1.

4. RESULTADOS

Foram coletados 256 exemplares de três espécies de cascudos, sendo 60 *Hypostomus albopunctatus* (peso médio $288,1 \pm 71,4$ g e comprimento médio $28,6 \pm 2,7$ cm) 100 *Hypostomus regani* (peso médio $322,5 \pm 76,3$ g e comprimento médio $29,6 \pm 2,5$ cm) e 96 *Hypostomus strigaticeps* (peso médio $281,0 \pm 87,9$ g e comprimento médio $27,3 \pm 3,1$ cm). Dos peixes examinados 122 estavam positivos para *Trypanosoma* spp., equivalendo à prevalência geral de 47,6% e densidade média geral de 0,75 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,75$).

A infecção de *Trypanosoma* spp. por espécie de peixe apresentou os seguintes resultados: *Hypostomus albopunctatus* 46,6% e 0,63 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,46$) *Hypostomus regani* 44,0% e 0,78 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,63$) e *Hypostomus strigaticeps* 52,0% de prevalência e 0,78 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,98$).

As variações mensais das médias de prevalência foram significativas para *Hypostomus regani* ($p=0,0054$) e *Hypostomus strigaticeps* ($p=0,0007$) e não significativa para *Hypostomus albopunctatus* ($p=0,1352$). Entretanto, a variação da prevalência ao longo do ano apresentou semelhança entre as três espécies, como mostrado na Figura 8, onde pode-se observar que ocorre um declínio acentuado nos meses de setembro e outubro, correspondendo ao fim do inverno e início da primavera, seguido de um aumento nos meses subsequentes.

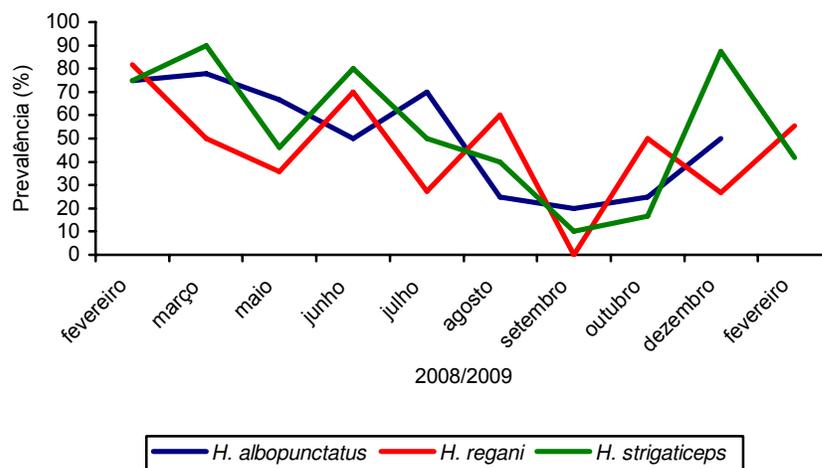


Figura 8 – Variação das prevalências de infecção por *Trypanosoma* spp. ao longo do ano de 2008 nas três espécies de peixes coletados.

A densidade média de parasitas não apresentou diferenças significativas entre as três espécies de peixes analisadas ($p=0,8225$), assim como a variação mensal da densidade por espécie de peixes (*H. albopunctatus* $p= 0,8563$, *H. regani* $p= 0,0517$ e *H. strigaticeps* $p= 0,4830$), entretanto a figura 9 mostra uma diminuição na densidade durante o período seco (entre junho e setembro).

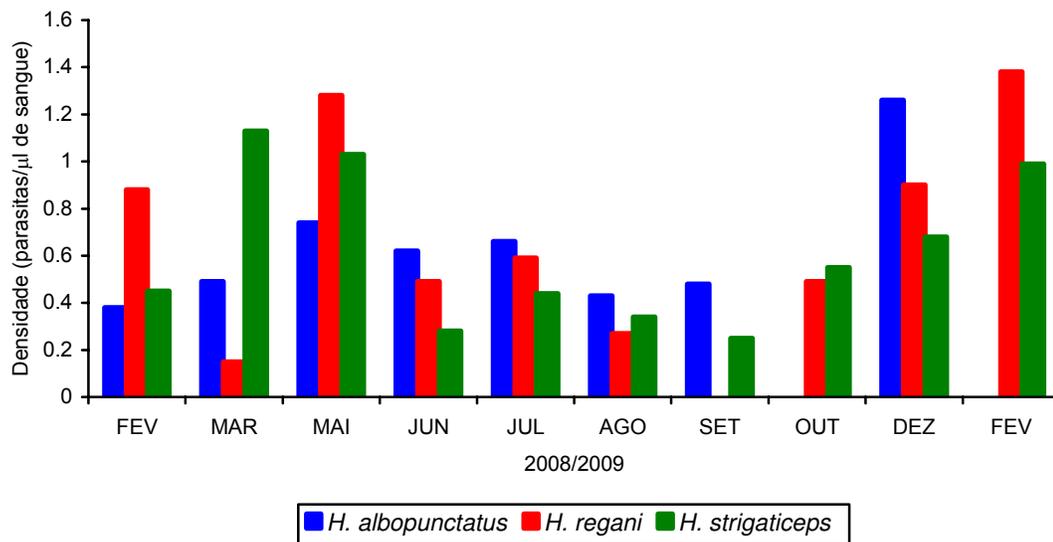


Figura 9 - Variação mensal da densidade média de *Trypanosoma* sp. por espécie de peixe coletados.

Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre as densidades, os pesos e os comprimentos de cada espécie de peixe não sendo encontradas correlações significativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre a densidade, o peso e o comprimento das três espécies de cascudos coletados no rio Mogi Guaçu, SP, entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009.

Espécies	Peso	Comprimento
<i>H. albopunctatus</i>	P=0,9527 r= -0,01459	P=0,9916 r= 0,00258
<i>H. regani</i>	P=0,9650 r= 0,00782	P=0,5363 r= -0,10989
<i>H. strigaticeps</i>	P=0,0759 r= -0,31322	P=0,0738 r= -0,31538

Entre julho e outubro de 2008 foram realizadas recapturas de exemplares acondicionados nos tanques de criação do CEPTA. Do total de 86 peixes mantidos no tanque foram recapturados 19 exemplares e dois foram recapturados novamente. Os resultados das prevalências de tripanossomas nestes peixes (captura e recaptura) estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Prevalência de *Trypanosoma* sp. em três espécies de cascudos coletados no Rio Mogi-Guaçu e em subseqüentes recapturas após mantidos em tanques de criação do CEPTA no ano de 2008.

Espécies	Nº do peixe	Coleta inicial	Positividade	Recaptura	Positividade	2ª. Recaptura	Positividade
<i>H. albopunctatus</i>	352	Junho	(+)	Julho	(-)		
<i>H. albopunctatus</i>	229	Julho	(+)	Agosto	(-)	Outubro	(-)
<i>H. albopunctatus</i>	231	Julho	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. albopunctatus</i>	257	Agosto	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. albopunctatus</i>	256	Agosto	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. albopunctatus</i>	259	Agosto	(+)	Outubro	(-)		
<i>H. regani</i>	399	Maio	(+)	Julho	(+)		
<i>H. regani</i>	396	Maio	(-)	Julho	(-)		
<i>H. regani</i>	198	Maio	(+)	Julho	(+)		
<i>H. regani</i>	224	Julho	(+)	Outubro	(-)		
<i>H. regani</i>	218	Julho	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. regani</i>	220	Julho	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. regani</i>	222	Julho	(-)	Outubro	(-)		
<i>H. regani</i>	245	Agosto	(+)	Outubro	(+)		
<i>H. regani</i>	248	Agosto	(+)	Outubro	(-)		
<i>H. strigaticeps</i>	241	Julho	(+)	Outubro	(-)		
<i>H. strigaticeps</i>	240	Julho	(+)	Agosto	(-)	Outubro	(-)
<i>H. strigaticeps</i>	241	Julho	(+)	Outubro	(-)		
<i>H. strigaticeps</i>	244	Julho	(-)	Outubro	(-)		

Foram encontrados hirudíneos do gênero *Placobdella* sp. aderidos na boca, nadadeiras e nas brânquias com prevalência geral de 22,9% (Figuras 10 e 11).



Figura 10 - Exemplos de hirudíneos aderidos na boca de *Hypostomus strigaticeps* do Rio Mogi- Guaçu.



Figura 11 – Exemplo de hirudíneo *Placobdella* sp. coletado em *Hypostomus regani* do Rio Mogi Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP

A amplificação do DNA extraído de sangue total e plasma sanguíneo não apresentou resultados positivos.

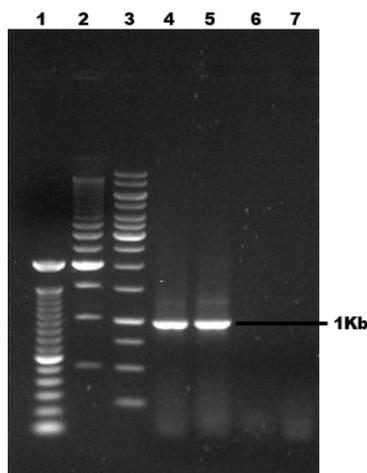


Figura 12 - Produto de amplificação por PCR observado em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. Reações de PCR foram conduzidas na presença de DNA genômico de *Trypanosoma* spp. extraídos de hirudíneos específicos de cada espécie de peixe (Coluna 4 e 5) correspondendo à *H. strigaticeps* e *H. regani*. Como controle negativo as reações foram realizadas na ausência de DNA molde (Coluna 7) ou na presença de DNA genômico de hirudíneo não infectado com *Trypanosoma* spp. (Colunas 6). Coluna 1, marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Invitrogen®) em pares de bases (bp). Coluna 2, marcador de peso molecular 500bp (Invitrogen®). Coluna 3, marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas®).

No produto de PCR aplicado ao gel de agarose na ausência do DNA molde ou na presença de DNA genômico de hirudíneo não infectado com *Trypanosoma* spp. não foi possível observar amplificação como mostrado na Figura 12, mas os oligonucleotídeos utilizados, S-1842 e S-1843, amplificaram um fragmento de 1000pb (incluindo os primers) do gene 18S rRNA dos tripanossomas coletados de hirudíneos presentes nas duas espécies de peixes, *H. regani* e *H. strigaticeps*. Os resultados obtidos nos seqüenciamentos não foram satisfatórios, apresentando regiões onde não foi possível a leitura, provavelmente pelo fato de a seqüência apresentar muitas bases repetidas ou por problema na purificação material.

Duzentos e cinquenta e cinco parasitas encontrados foram fotografados e medidos com auxílio do fotomicroscópio, sendo 66 de *H. albopunctatus*, 64 de *H. regani* e 95 de *H. strigaticeps*, e. Na tabela 3 encontram-se as médias dos parâmetros de mensuração morfológica dos parasitas das três espécies de peixes em estudo. A identificação taxonômica tradicional das espécies de tripanossomas de peixes é baseada nas características morfológicas dos parasitas, assim, na tabela 4 são evidenciados os valores morfológicos comparativos de parasitas encontrados nas três espécies em estudo e em outras espécies de peixes.

Tabela 3 – Valores (em μm) da média das medidas dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos, entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009.

ESPÉCIE	CC	FL	PN	AN	LC	LK	LN	CN	IN	ArN	DKP	CK	ArK	IF	VN	VK
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	29,02^A	11,50	16,52	10,64^A	1,96	0,61	1,43	2,85	1,71	4,07	0,45	1,02	0,55	2,90	5,64	0,28
DP	±10,94	±6,24	±5,85	±5,83	±0,72	±0,17	±0,54	±1,06	±0,45	±3,36	±0,14	±0,26	±0,36	±0,89	±6,61	±0,19
<i>Hypostomus Regain</i>	24,73^B	15,45	14,98	8,71^B	1,94	0,58	1,59	2,96	1,88	4,72	0,33	0,95	0,52	1,95	5,79	0,24
DP	±5,76	±6,06	±3,30	±3,06	±0,45	±0,17	±0,37	±0,65	±0,68	±1,98	±0,19	±0,20	±0,23	±1,15	±3,17	±0,16
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	25,01^B	11,70	15,12	9,43^B	1,93	0,63	1,50	2,81	1,78	4,08	0,41	0,97	0,65	2,87	5,82	0,29
DP	±7,74	±6,20	±4,57	±4,40	±0,52	±0,21	±0,55	±0,77	±0,61	±3,42	±0,23	±0,24	±0,80	±1,77	±9,03	±0,29

Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes

Baseado nos resultados do teste de comparação múltipla de médias de Duncan entre as medidas obtidas dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos, as medidas dos protozoários das espécies *H. regaini* e *H. strigaticeps* serão consideradas, para efeito de análise morfométrica, como sendo uma mesma espécie de *Trypanosoma* (aqui denominada *Trypanosoma* sp. 2) e as de *H. albopunctatus* como espécie diferente (aqui denominada *Trypanosoma* sp. 1). Segundo Davies *et al.* (2005) a posição do núcleo, que é determinada pela distância da extremidade anterior até núcleo, foi um fator importante na discriminação de 3 espécies de tripanossomas de peixes na África (*T. mukasai*, *T. toddi* e *T. tobeyi*).

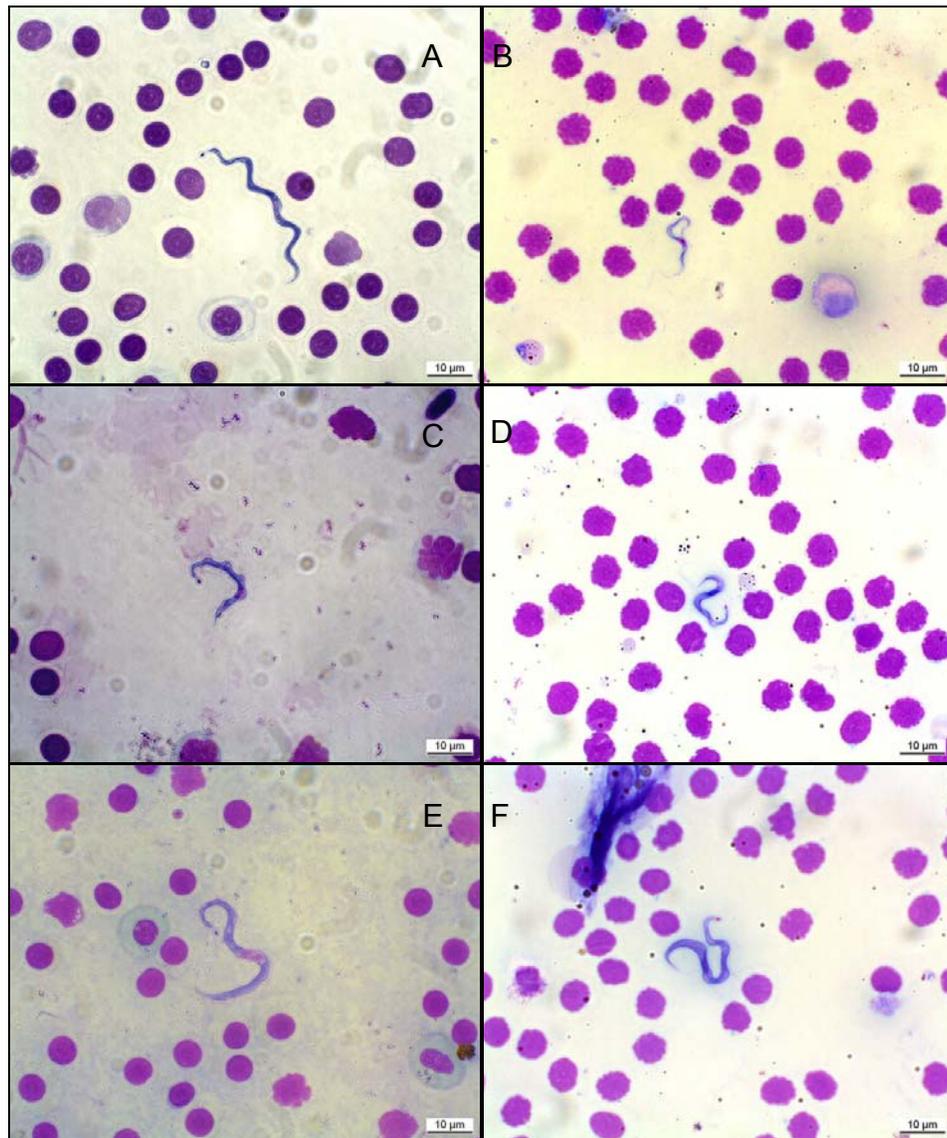
Tabela 4 – Morfometria das espécies de *Trypanosoma* sp. descritos em diferentes espécies de peixes. As espécies em destaque referem-se aos do presente estudo.

ESPÉCIE	CC	LC	FL	PN	AN	LK	VK	LN	CN	IN	VN	HOSPEDEIRO
<i>T. nupelianus</i> (a)	17,6	2,18	12,7	13,77	12,1	0,75	0,28	1,2	3,1	1,14	3,96	<i>Rhinelepis aspera</i>
<i>T. pradoi</i> I (b)	20,2	1,57	8,77	9,63	10,57	0,67	0,67	1,23	2,1	0,91	2,34	<i>Hypostomus ancistroides</i>
<i>T. plecostomi</i> I (c)	21,5	2,3	14,0	12,0	-	0,5	-	2,1	2,9	-	-	<i>Hypostomus</i> sp
<i>T. strigaticeps</i> I(c)	21,9	3,2	12,0	12,5	-	0,6	-	2,1	2,5	-	-	<i>Hypostomus</i> sp
<i>T. regani</i> II (c)	23,1	1,9	12,3	13,1	-	0,5	-	1,9	3,0	-	-	<i>Hypostomus</i> sp
<i>T. strigaticeps</i> II (c)	23,5	2,0	12,0	15,0	-	0,5	-	2,0	2,6	-	-	<i>Hypostomus</i> sp
<i>Trypanosoma</i> sp.2	24,89	1,93	13,22	15,25	8,97	0,61	0,28	1,54	2,87	1,82	5,81	<i>H. regani</i>+ <i>strigaticeps</i>
<i>T. dominguesi</i> (d)	25,5	2,1	9,4	13,7	12,3	0,7	0,18	1,4	3,9	1,1	7,29	<i>Hypostomus alatus</i>
<i>T. itoi</i> I (e)	25,88	2,18	12,7	13,77	12,1	0,75	0,28	1,2	3,1	1,14	3,96	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>Trypanosoma</i> sp.1	29,02	1,92	11,50	16,52	10,64	0,61	0,28	1,43	2,85	1,71	5,64	<i>H. albopunctatus</i>
<i>T. lopesi</i> (f)	31,95	2,5	6,4	19,5	4,55	0,7	0,2	1,3	3,45	2,35	7,6	<i>Rhinelepis áspera</i>
<i>T. barreto</i> (g)	36,2	3,87	14,12	19,65	16,65	0,78	0,41	2,65	4,4	1,22	40,37	<i>Hypostomus paulinus</i>
<i>T. itoi</i> II (e)	43,77	3,4	11,17	21,76	22,0	0,84	0,38	1,8	3,57	0,99	8,89	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. pintoi</i> (h)	45,1	3,3	12,0	25,3	19,8	0,8	0,46	2,2	4,2	1,3	14,4	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. regani</i> IV (c)	46,1	3,3	16,6	23,3	-	0,9	-	3,1	4,6	-	-	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. pradoi</i> II (b)	47,58	3,47	17,17	25,62	21,97	0,75	0,75	2,53	4,97	1,17	19,32	<i>Hypostomus ancistroides</i>
<i>T. regani</i> V (c)	49,5	2,6	16,0	24,2	-	0,8	-	2,6	4,3	-	-	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. petenuscii</i> (i)	50,1	3,4	12,8	26,7	23,1	0,8	0,3	3,0	5,0	1,2	30,5	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. barrosi</i> (j)	53,9	3,3	19,8	30,9	22,7	0,9	0,2	2,8	4,6	1,4	34,9	<i>Hypostomus</i> sp.
<i>T. lamanoi</i> (k)	56,7	3,1	13,7	30,3	26,4	1,1	0,3	3,1	5	1,1	35,4	<i>Hypostomus ancistroides</i>
<i>T. birmanii</i> I (l)	57,2	3,8	9,4	30,3	26,9	0,9	0,43	2,5	4,9	1,1	27,3	<i>Hypostomus commersonii</i>
<i>T. affonsoi</i> (m)	57,8	3,6	16,7	30,3	27,5	0,8	0,39	2,8	3,8	1,1	19,6	<i>Hypostomus tietensis</i>
<i>T. birmanii</i> II (l)	59,2	4,5	14,4	31,3	27,8	1,0	0,46	2,6	5,6	1,1	42,4	<i>Hypostomus commersonii</i>
<i>T. birmanii</i> III (l)	59,2	4,5	14,4	31,3	27,8	1,0	0,5	2,6	5,6	1,1	42,4	<i>Hypostomus commersonii</i>
<i>T. zungaroi</i> IV (c)	61,5	9	0	32	-	7	-	4,5	5,5	-	-	<i>Pseudopmelodus zungaro</i>
<i>T. limae</i> (n)	66,64	3,81	11,22	39,58	27,05	1,33	0,42	3,4	5,49	1,46	41,52	<i>Hoplias lacerdae</i>
<i>T. venustissimum</i> II(o)	71,5	2,6	3,5	-	-	1	-	-	3	1,3	-	<i>Plecostomus plecostomus</i>
<i>T. immanis</i> II (p)	114,5	-	6	-	-	0,7	-	-	-	1,2	-	<i>Loricariichthys anus</i>
<i>T. immanis</i> I (q)	125,6	3,8	7	-	-	1,2	-	-	-	1	-	<i>Loricariichthys anus</i>

Onde (a) EIRAS *et al.*, 1990. (b) RIBEIRO *et al.*, 1993. (c) FONSECA & VAZ, 1928. (d) LOPES *et al.*, 1989. (e) RIBEIRO *et al.*, 1990 (a). (f) RIBEIRO *et al.*, 1989. (g) LOPES *et al.*, 1990. (h) RIBEIRO *et al.* 1990 (b). (i) CARRARO *et al.*, 1992. (j) RIBEIRO *et al.*, 1992. (k) COSTA *et al.*, 1992. (l) RIBEIRO *et al.*, 1991. (m) LOPES *et al.*, 1992. (c) FONSECA & VAZ, 1928. (n) LOPES *et al.*, 1996. (o) FROÉS *et al.*, 1979. (p) FROÉS *et al.*, 1978.

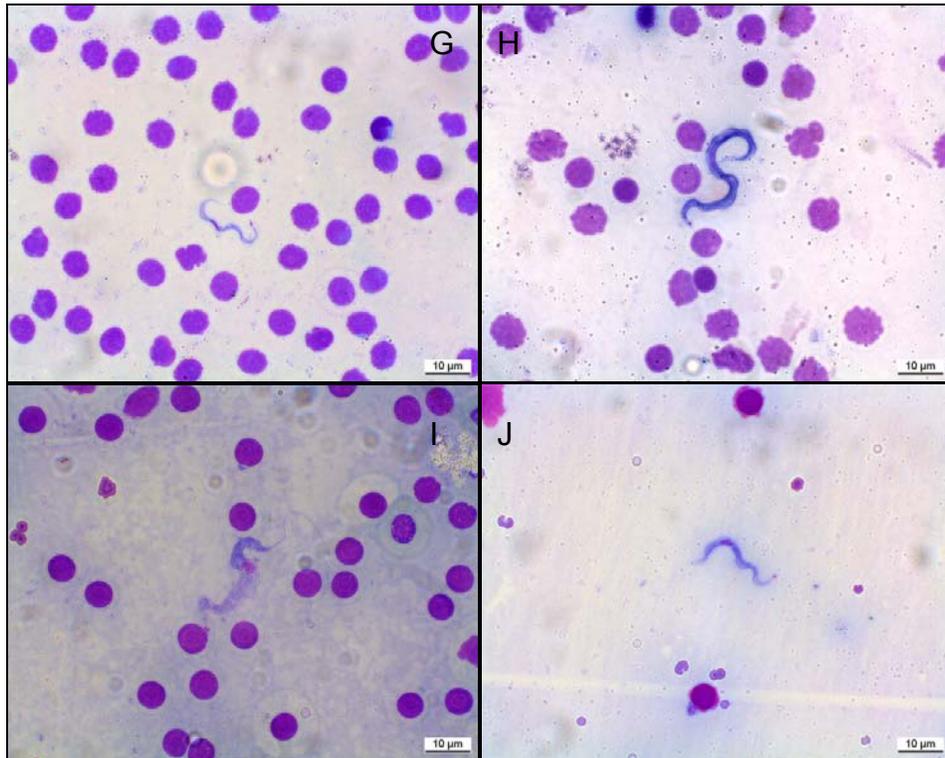
Os parasitas encontrados nas três espécies de peixes estudados apresentaram morfologicamente as seguintes características: polimórficos, citoplasma denso, núcleo elíptico bem visível, apresentando contornos nítidos, tocando ou não as bordas do corpo e de cromatina frouxa, cinetoplasto terminal nítido localizado a uma distância média de 0,40µm (±0,23) da extremidade posterior. O corpo afila-se gradualmente para ambas as extremidades. A membrana ondulante é nítida na maioria dos exemplares, fazendo em alguns casos muitas ondulações e em outros casos o número de ondulações é menor. Foram diagnosticados parasitas que apresentaram no final da extremidade anterior um flagelo livre e longo, enquanto outros não apresentaram flagelo

livre. Outra característica evidenciada foi que morfológicamente duas formas distintas foram observadas, alguns parasitas apresentaram a forma do corpo delgada e curta enquanto que outros apresentaram um corpo longo e largo e o citoplasma difuso (Pranchas 1, 2 e 3)



Prancha 1 - Formas tripomastigotas presentes no sangue de *Hypostomus albopunctatus*.

- A: Forma longa;
- B: Forma curta;
- C: Membrana com várias ondulações;
- D: Membrana com poucas ondulações;
- E: Exemplar com flagelo livre;
- F: Exemplar sem flagelo livre.



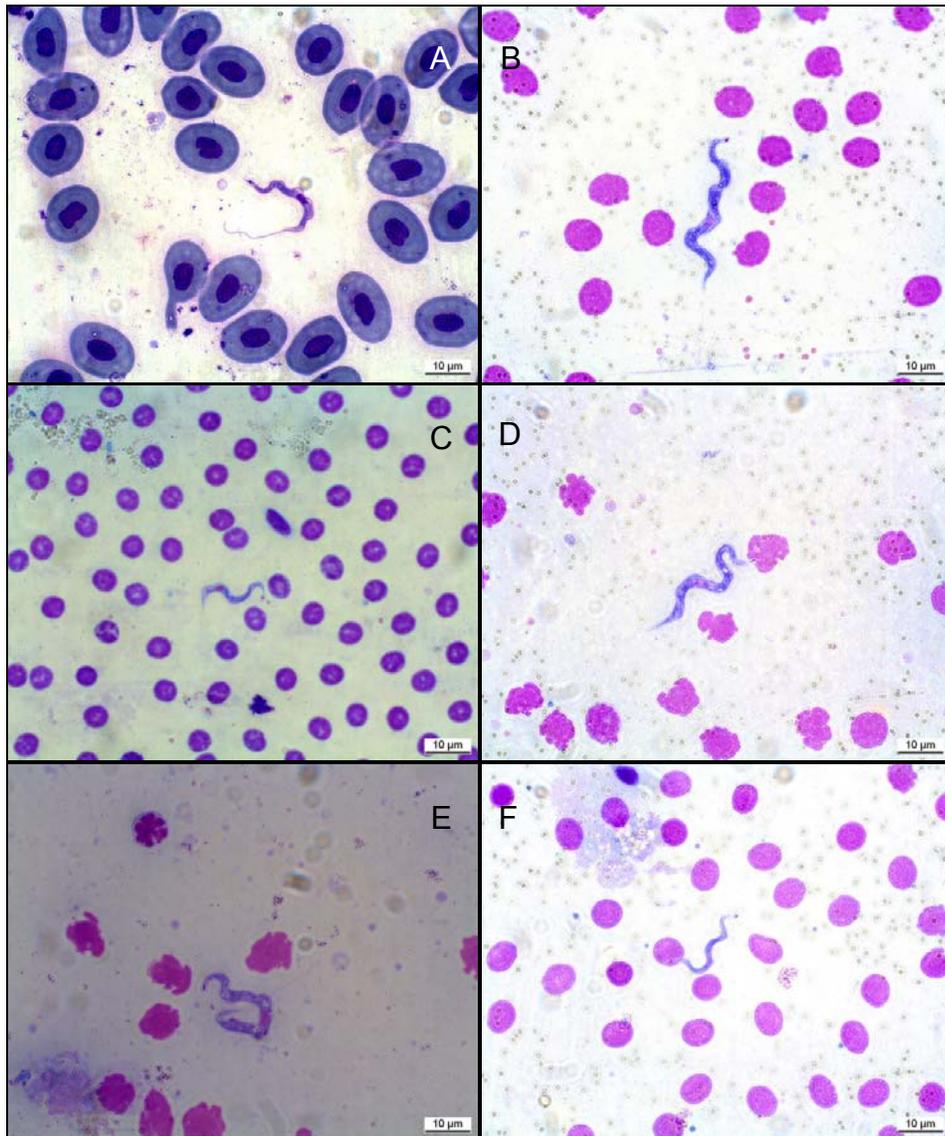
Prancha 1 (cont.)- Formas tripomastigotas presentes no sangue de *Hypostomus albopunctatus*.

G: Forma delgada;

H: Forma larga;

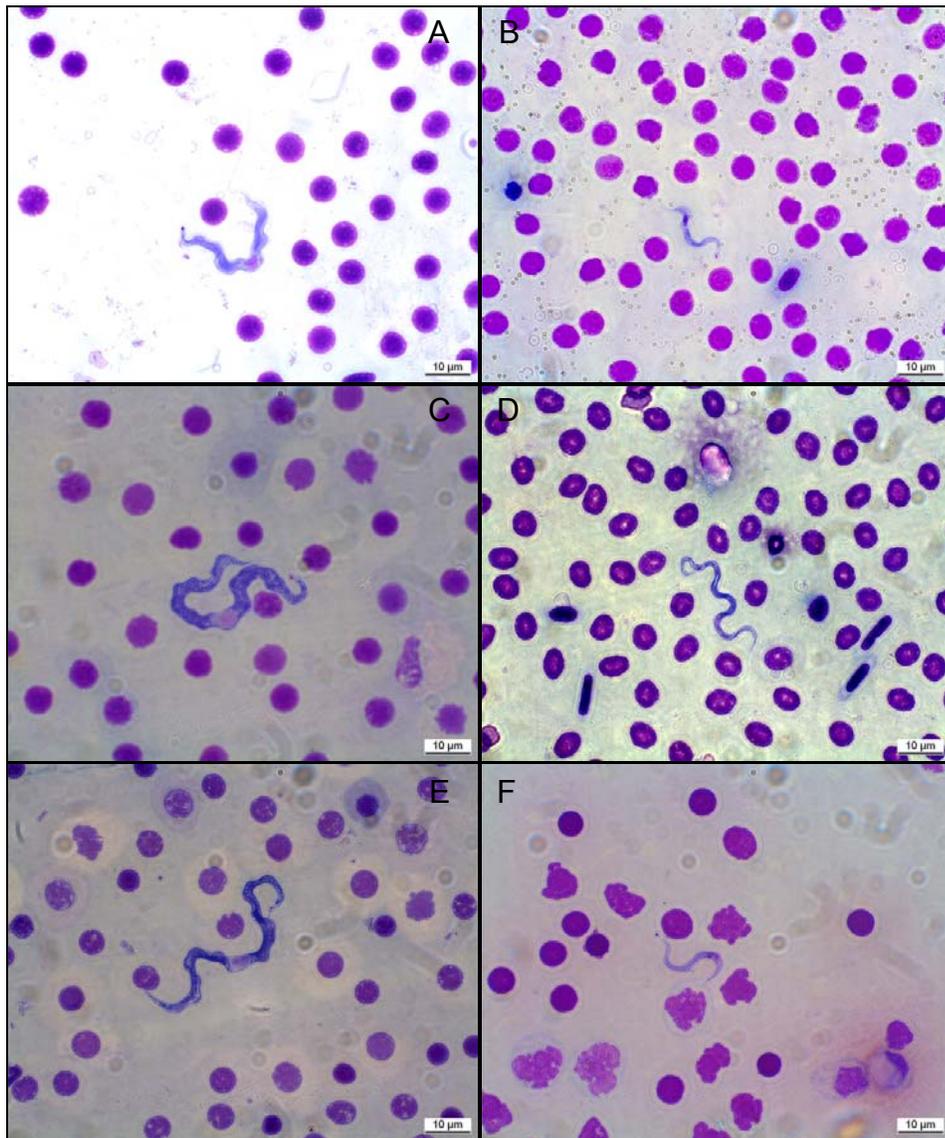
I: Exemplar com citoplasma difuso;

J: Exemplar com citoplasma regular.



Prancha 2 - Formas tripomastigotas presentes no sangue de *Hypostomus regani*.

- A: Exemplar com flagelo livre e membrana com várias ondulações;
- B: Exemplar sem flagelo livre e membrana com poucas ondulações;
- C: Forma curta;
- D: Forma longa;
- E: Forma larga e com citoplasma difuso;
- F: Forma delgada e com citoplasma regular.



Prancha 3 - Formas tripomastigotas presentes no sangue de *Hypostomus strigaticeps*.

- A: Exemplar com flagelo livre e membrana com várias ondulações;
- B: Exemplar sem flagelo livre e membrana com poucas ondulações;
- C: Forma larga e com citoplasma difuso;
- D: Forma delgada e com citoplasma regular;
- E: Forma longa;
- F: Forma curta;

Após a realização da morfometria dos tripanossomas foi estabelecida a frequência de ocorrência de acordo com a variação do comprimento do corpo para auxiliar na análise de pleomorfismo (Figura 13).

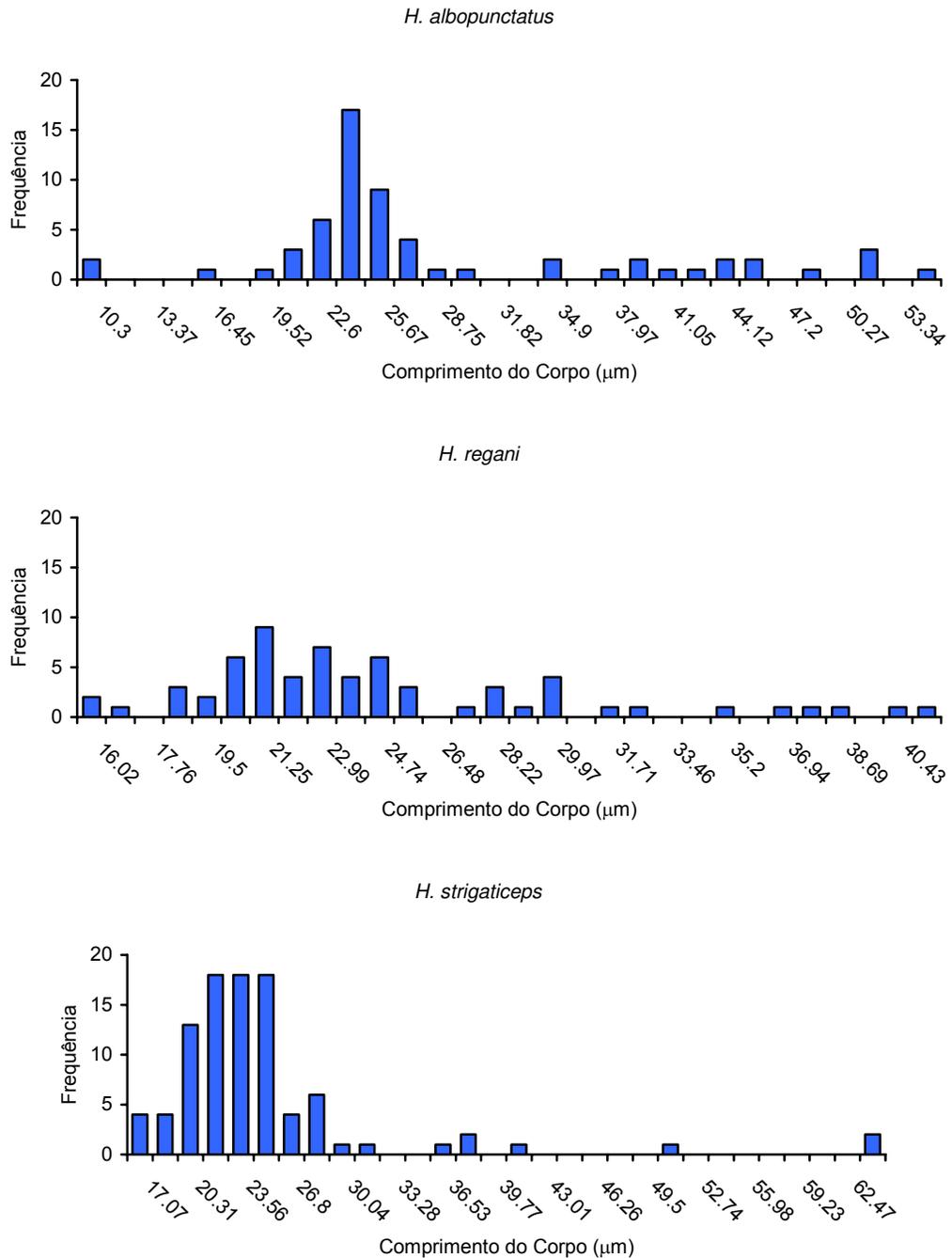


Figura 13 – Distribuição de frequência por comprimento do corpo dos tripanossomas encontrados nas tres espécies de cascudos entre fevereiro de 2008 e fevereiro de 2009, Rio Mogi- Guaçu, Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP.

5. DISCUSSÃO

As prevalências por *Trypanosoma* sp. encontradas nesse trabalho (*Hypostomus strigaticeps* 52,0%, *Hypostomus regani* 44,0% e *Hypostomus albopunctatus* 46,6%) situam-se acima dos valores encontrados por Khan (1977) em peixes do Atlântico Norte – *Hippoglossoides platessoides* 26%, *Limanda ferruginea* 11%, *Glyptocephalus cynoglossus* 11%, *Lycooides reticulatus* 30%, *Anarhichas minor* 29%, *Anarhichas lupus* 23% - e Burreson (2007) em peixes do Pacífico – *Parophrys vetulus* (*Trypanosoma pacifica* 16,1%), *Microstomus pacificus* (*T. khani* 9,8%), abaixo do que Zintl et al. (1997) encontrou em enguias europeias (*Anguilla anguilla* – 77,7%) e semelhante aos resultados de Davies et al. (2005) em peixes de água doce da África (53%).

Em relação à densidade os valores relatados nesse trabalho mostraram *Hypostomus strigaticeps* 0,78 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,98$), *Hypostomus regani* 0,78 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,63$) e *Hypostomus albopunctatus* 0,63 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,46$), estes resultados ficaram acima daqueles encontrados por Khan (1977) – 0,1 parasitas/ μ L de sangue para *Hippoglossoides platessoides* e para *Limanda ferruginea*, e abaixo dos valores descritos por Gu et al. (2007 (b)) em *Cyprinus carpio* (62,5 parasitas/ μ L de sangue).

A bibliografia sobre descrição de espécies de *Trypanosoma* em Loricariidae é extensa, mas nenhuma referência é feita à prevalência ou densidade destes protozoários em seus hospedeiros.

Apesar de não ser estatisticamente significativa as figuras 8 e 9 mostram uma variação tanto na prevalência quanto na densidade nas três espécies de peixes examinados ao longo do ano, apresentando diminuição nos meses mais frios e secos e aumento nos meses quentes e úmidos.

Zintl et al. (1997) em trabalho de ocorrência natural de *Trypanosoma granulosum* em enguia europeia (*Anguilla anguilla*) observaram que flutuações na parasitemia no verão e outono (entre junho e outubro) ocorre possivelmente por fatores locais como alterações nas populações de hirudíneos, mudanças bruscas na temperatura ou migração de enguias já infectadas para a região em estudo. A hipótese da alteração na população de hirudíneos já havia sido aventada por Khan (1982), que

associou a baixa prevalência de hemoflagelados em peixes ao aumento excessivo na temperatura ambiente, sendo esse um fator impeditivo para a sobrevivência e reprodução das sanguessugas vetoras (*Johanssonia arctica*).

Islam & Woo (1992) estudando o efeito da temperatura sobre a multiplicação de *Trypanosoma danilewskyi*, constataram aumento significativo na parasitemia em goldfish (*Carassius auratus*) infectados experimentalmente quando foi aumentada a temperatura dos tanques de 10⁰C para 20⁰C. O metabolismo dos protozoários são dependentes de enzimas e as interações enzima-substrato podem ser afetadas pela variação de temperatura em relação ao intervalo do ótimo fisiológico (PAIN, 1987). Needham (1970 *apud* ZINTL *et al.*, 1997) manteve tinca selvagem (*Tinca tinca*) infectados com *Trypanosoma tincae* em um ambiente livre de sanguessugas à mesma temperatura que ocorre em ambiente natural, observando um aumento da parasitemia durante o verão. A variação da parasitemia no peixe ocorre provavelmente por efeito da migração dos tripanossomas para o sangue periférico (aumento) ou perda da infecção (redução), uma vez que não foram encontradas formas reprodutivas no hospedeiro vertebrado (LETCH, 1980; D'AGOSTO & SERRA-FREIRE, 1993).

A relação entre peso e comprimento do peixe com a densidade de infecção não apresentou dados estatísticos significativos reafirmando a hipótese que a densidade depende da disponibilidade de vetor e das variações sazonais e não das características do hospedeiro.

No presente estudo, dos 11 cascudos originariamente positivos soltos nos tanques de criação, apenas 3 recapturados após 2 meses mantiveram a infecção. As solturas e recapturas dos cascudos coletados foram realizadas entre maio e outubro coincidindo com o período do ano em que as prevalências e as densidades decrescem e se mantêm baixa (junho a outubro tabela 2 e figuras 8 e 9). Zintl *et al.* (1997) afirmam que enguias em cativeiro conseguem manter a infecção patente por um longo período de tempo, mesmo na ausência de reinfecção. O estudo experimental de *T. mukasai* mostrou que os tripanossomas podem permanecer por sete meses no sangue de "catfish" (NEGM-ELDIN, 1997 *apud* EIRAS *et al.*, 2008). No presente estudo os peixes que estavam positivos perderam a infecção após 2 meses e somente exemplares de *Hypostomus regani* mantiveram a infecção. Porém o período de análise foi curto e

provavelmente esses peixes também se tornariam negativos se analisados depois de um período maior.

Por definição, pleomorfismo é a presença de várias formas de desenvolvimento do parasita no mesmo organismo hospedeiro. Em flagelados sanguíneos de peixes, da mesma forma que em outros, o pleomorfismo é entendido como uma manifestação fenotípica sequencial de um genótipo que aparecem no estágio de tripomastigota em hospedeiros vertebrados. O pleomorfismo pode se expressar nos seguintes aspectos: mudanças no comprimento total e na largura do corpo (formas delgadas ou largas), no número de ondulações na membrana ondulante, na presença ou ausência de cariossoma distinto, na presença de estrias na superfície do corpo, na presença e número de grânulos citoplasmáticos, na distância do cinetoplasto da parte posterior, no comprimento do flagelo livre (LOM, 1979).

Segundo Gibson *et al.* (2005) os tripanossomas de peixes de água doce encontrados na Europa, podem ser agrupados em monomórficos ou polimórficos, sendo que no primeiro grupo os parasitas apresentam morfologia similar na fase inicial, aguda e crônica da infecção, diferindo apenas no comprimento. No segundo grupo, os parasitas também mostram alterações no comprimento, mas concomitantemente apresentam variações na largura do corpo na fase crônica.

Em estudo do ciclo de vida do *Trypanosoma cobitis*, Letch (1980) relata que a maioria dos peixes infectados por tripanossomas capturados em ambiente natural mostraram grande leque de tripanossomas de diferentes morfologias no sangue periférico, os quais podem ser resultados de múltiplas reinfecções.

De acordo com a variação do comprimento do corpo dos tripanossomas analisados pode-se observar que o pleomorfismo aparece de maneira a caracterizar a infecção como já estabelecida, uma vez que alguns autores (LOM, 1979; LETCH, 1980) dizem que durante o curso da infecção, as formas curtas e delgadas aparecem logo no início e conforme a infecção vai amadurecendo as formas de tripanossomas vão tornando-se longas e largas. Outros autores afirmam ainda que o pleomorfismo está relacionado com a temperatura ambiente sendo que as formas curtas e finas aparecem nos períodos mais quentes e as longas e largas nos períodos frios. No presente trabalho, as diferenças observadas nas formas dos tripanossomas apresentadas ao

longo do ano não caracterizam essa variação relacionada com a temperatura, nem com a idade da infecção.

A amplificação do DNA extraído do sangue dos peixes não apresentou resultados positivos provavelmente pelo fato do baixo número de flagelados no sangue dos peixes examinados (densidade média geral de 0,75 parasitas/ μ L de sangue ($\pm 0,75$), diminuindo a oferta de DNA e dificultando o anelamento dos oligonucleotídeos específicos.

Morfologicamente a espécie *Trypanosoma* sp.1 apresenta valor de comprimento do corpo (29,02 μ m) maior que *T. itoi* (25,88 μ m), *T. dominguesi* (25,5 μ m), *Trypanosoma* sp2 (24,89 μ m), *T. strigaticeps II* (23,5 μ m), *T. regani II* (23,1 μ m) e menor que *T. lopesi* (31,95 μ m), *T. barretoii* (36,2 μ m), *T. itoi II* (43,77 μ m), *T. pintoii* (45,1 μ m) e *T. regani* (46,1 μ m) a espécie apresenta ainda o valor da distância da parte anterior até o núcleo (10,64 μ m) maior que *T. pradoi I* (10,57 μ m), *T. lopesi* (4,55 μ m), *Trypanosoma* sp.2 (8,97 μ m) e menor que as outras espécies apresentadas na tabela 5.

Trypanosoma sp. 2, apresenta valor do comprimento do corpo (24,89 μ m) maior que *T. strigaticeps II* (23,5 μ m), *T. regani II* (23,1 μ m), *T. strigaticeps I* (21,9 μ m), *T. plecostomi I* (21,5 μ m) e menor que *T. dominguesi* (25,5 μ m), *T. itoi I* (25,88 μ m), *Trypanosoma* sp.1 (29,02 μ m), *T. lopesi* (31,95 μ m). E valor da distância da parte anterior até o núcleo (8,97 μ m) maior apenas que *T. lopesi* (4,55 μ m) e menor que todos os outros tripanossomas apresentados na tabela 5. O *Trypanosoma* sp. 2, se aproxima muito de *T. strigaticeps II* diferindo apenas no valor do comprimento do corpo já mencionado e no tamanho do flagelo livre (*Trypanosoma* sp. 2 (13,22 μ m) e *T. strigaticepsII* (12,00 μ m)). Mesmo sendo encontrado infectando o mesmo hospedeiro, quando comparado com *T. regani IV* e *T. regani V*, *Trypanosoma* sp. 2 apresenta valores muito menores em referência à todos os parâmetros analisados.

Contudo, diante das diferentes formas morfológicas observadas nos parasitos, verifica-se que a correta identificação da espécie ou espécies só será possível com o seqüenciamento, o que certamente será realizado em um futuro próximo.

6. CONCLUSÃO

- A prevalência e densidade de infecção por *Trypanosoma* spp. nas três espécies de peixes variaram com as estações do ano.
- Pela análise morfológica *Trypanosoma* sp.1 e *Trypanosoma* sp. 2 podem ser considerados de espécies diferentes;
- As análises evidenciaram a presença de pleomorfismo nos tripanossomas encontrados nas três espécies de peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, C. D. 1977 Flagellate Parasites of fish *IN* KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa. vol1.- Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagellates of Fish** – New York: Academic Press, p. 358-412.
- BRITTO, S. G. C. (coord); 2003. **Peixes do Rio Paranapanema**. São Paulo. Edição Horizonte Geográfico. 112p.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. 2007 **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 195p. s. 23.
- BURRESON, E. M. 2007. Hemoflagellates of oregon marine fishes with the description of new species of *Trypanosoma* and *Trypanoplasma*. **Journal Parasitology**. v. 93 (6), p. 1442-1451.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. 1997. Parasitology meet ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. **The Journal of Parasitology**. v. 83(4), p. 575-583.
- CARRARO, A. A.; LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; ALBUQUERQUE, S.; WATANABE, I.; SATAKE, T.; BRENTGANI, L. G.; SOARES, T. R. S.; BAHLS, A. S. 1992. Tripanossomos de peixes brasileiros XXVII. *Trypanosoma petenuscii* sp. n. encontrado no cascudo *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), capturado no rio Paraná, município de Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Anais da IX Jornada Paulista de Parasitologia**. v. 1, p. 21-22.
- CASATTI, L. 2005 Fish assemblage structure in a first order stream, Southeastern Brazil: Longitudinal distribution, seasonality, and microhabitat diversity. **Biota Neotropica**. v. 5, p.1-9.
- CASATTI, L.; ROCHA, F. C.; PEREIRA, D. C. 2005. Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in Southeastern Brazilian streams. **Biota Neotropica**. v. 5(2), p.1-9.
- COSTA, J. R. V.; LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; CARRARO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; GARAVELLO, J. C. 1992. Tripanossomos de peixes brasileiros XXIII. *Trypanosoma lamanoi* sp. n. encontrado no cascudo *Hypostomus ancistroides* Hering 1911 (Pisces, Loricariidae) capturado no açude Fartura, município de São Sebastião da Gramma, Estado de São Paulo, Brasil. **Anais da IX Jornada Paulista de Parasitologia**. v. 1, p. 18-20.
- D'AGOSTO, M. & SERRA-FREIRE, N. M. 1993. Estádios evolutivos de tripanossomas de *Hypostomus punctatus* Valenciennes (Osteichthyes, Loricariidae) em infecção natural de *Batrachobdella Gemmata* Blanchard (Hirudinea, Glossiphoniidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 10, p. 417-426.
- DAVIES, A. J.; GIBSON, W. C.; FERRIS, V. R.; BASSON, L.; SMIT, N. J. 2005. Two genotypic groups of morphologically similar fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. **Diseases of Aquatic organisms**. v. 66, p. 215-220.

- DELARIVA, R. L. & AGOSTINHO, A. A. 2001. Relationship between morphology and diets of six Neotropical loricariids. **Journal of Fish Biology**. v. 66 (58), p. 215-220.
- EIRAS, J. C. 1994. **Elementos de Ictioparasitologia**. Porto: Edições Afrontamento, 339p.
- EIRAS, J. C.; REGO, A. A.; PAVANELLI, G. C. 1990. *Trypanosoma nupelianus* sp. n (Protozoa, Kinetoplastida) parasitizing *Rhinelepis aspera* (Osteichthyes, Loricariidae) from Paraná river, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 85 (2), p. 283-1846.
- EIRAS, J. C.; SEGNER, H.; WAHLI, T.; KAPOOR, B. G. 2008. **Fish Diseases- vol. 1** Enfield: Science Publishers, 612p.
- FIGUEROA, F.; MAYER, W. E.; LOM, J.; DYKOVÁ, I.; WELLER, M.; PECKOVÁ, H.; KLEIN, J. 1999. Fish Trypanosomes: Their position in kinetoplastid phylogeny and variability as determined from 12S rRNA Kinetoplast Sequences. **Journal Eukaryotic Microbiological**. v. 46(5), p. 473-481.
- FONSECA, F. & VAZ, Z. 1928. Novos trypanosomas de peixes brasileiros. **Anais Faculdade Medicina São Paulo**. v. 3, p. 69-94.
- FROÉS, O. M.; FORTES, E.; LIMA, D. F.; LEITE, V. R. V. 1978. Três espécies novas de tripanossomas de água doce do Brasil (Protozoa, Kinetoplastida). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 38(2), p. 461-468.
- FROÉS, O. M.; FORTES, E.; LIMA, D. F.; LEITE, V. R. V. 1979. Tripanossomas (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes de água doce do Brasil. II: Novos tripanossomas de cascudos (Pisces, Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 39(2), p. 425-429.
- FROESE, R. & D. PAULY. Editors. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (05/2010).
- GARAVELLO, J. C. & GARAVELLO, J. P. 2004. Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do São Francisco, Sergipe, Brazil (Pisces, Loricariidae, Hypostominae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 64 (3b),p.591-598.
- GIBSON, W. C.; LOM, J.; PECKOVÁ, H.; FERRIS, V. R.; HAMILTON, P. B. 2005. Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. **Parasitology**. v. 130, p. 405-412.
- GODOY, M. P. 1975. **Peixes do Brasil**, subordem characoidei- Bacia do Rio Mogi Guassu. 1ª edição. Ed. Franciscana. Piracicaba. 216p.
- GOSLINE, W. A. 1971. **Functional morphology and classification of teleostean fishes. vol. IX** Honolu: The University Press of Hawaii, 208p. 1971.
- GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; GONG, X. 2007 (a). Redescription of *Trypanosoma siniperca* Chang 1964 from freshwater fish of China based on morphological and molecular data. **Parasitology Research**. v. 100, p. 395-400.

- GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; KE, X.; GONG, X. 2007(b). Morphological and genetic differences of *Trypanosoma* in some Chinese freshwater fishes: difficulties in species identification. **Parasitology Research**. v. 101, p. 723-730.
- ISLAM, A. K. M. N.; & WOO, P. T. K. 1991. Anemia and its mechanism in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 11, p. 37-43.
- ISLAM, A. K. M. N. & WOO, P. T. K. 1992. Effects of temperature on the in vivo and in vitro multiplication of *Trypanosoma danilewskyi* Laveran Mesnil. **Folia Parasitologica**. v. 39, p. 1-12.
- KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. 2006. Trypanosomes infecting cod *Gadus morhua* L. In the North Atlantic: A resurrection of *Trypanosoma pleuronectidium* Robertson, 1906 and delimitation of *T. murmanense* Nikitin, 1927 (emend.), with a review of other trypanosomes from North Atlantic and Mediterranean teleosts. **Systematic Parasitology**, v. 65, p. 175-203.
- KHAN, R. A. 1976. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. **Canadian Journal of Zoology**. V. 54, p. 1840-1849.
- KHAN, R. A. 1977. Susceptibility of marine fish to trypanosomes. **Canadian Journal of Zoology**. v. 55, p. 1235-1241.
- KHAN, R. A. 1982. Biology of the marine piscicolid leech *Johanssonia arctica* (Johansson) from Newfoundland. **Proc. Helminthol. Soc. Wash.** v. 49, p. 266-278.
- LETCH, C. A. The life-cycle of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow 1883. 1980. **Parasitology**. v. 80, p. 163-169.
- LOM, J. & DYKOVÁ, I. 1992. Protozoan parasites of fish. **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**. v. 26. Elsevier. Amsterdam.
- LOM, J. & SUCHANKOVA, E. 1974. Comments on the life cycle of *Trypanosoma danilewskyi*. Proceedings of the III. International Congress on Parasitology. **Facta Publication**. v. 1, p. 66-67.
- LOM, J. Biology of Trypanosomes and Trypanoplasms of fish. *IN*: LUMSDEN, W. H. R. 1979. ed. **Biology of Kinetoplastidae – Vol.2**. p.269-337.
- LOPES, R. A.; SATAKE, T.; BRENTGANI, L. G.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A.; RIBEIRO, R. D. 1989. Trypanosomes of Brazilian fishes. III. *Trypanosoma dominguesi* sp. n. from armored catfish *Hypostomus alatus* Castelnau 1855 (Pisces, Loricariidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. v. 64, p. 83-88.
- LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; GARCIA, T. A. R. 1990. Trypanosomes of Brazilian fishes. II. *Trypanosoma barretto* sp. n. from *Hypostomus paulinus* (Siluriformes, Loricariidae). **Angewandte Parasitologie**. v. 31, p. 11-14.
- LOPES, R. A.; RIBEIRO, R. D.; ZUIM, S. M. F.; GARAVELLO, J. C.; CARRARO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; SATAKE, T. 1992. Tripanossomos de peixes brasileiros. XX. *Trypanosoma affonsoi* n. sp. encontrado no cascudo *Hypostomus tietensis* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae), do rio Piracicaba, localidade de Santa Maria da Serra (

- represa de Barra Bonita), Estado de São Paulo, Brasil. **Anais da 44° reunião Anual da SBPC**. v. 1, p. 744-745.
- LOPES, R. A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T.; RIBEIRO, R. D.; BRENTGANI, L. G.; SALA, M. A. 1996. Tripanossomos de peixes brasileiros. XXXI. *Trypanosoma limae* sp. n. encontrado no trairão *Hoplias lacerdae*, Ribeiro 1908 (Pisces, Erythrinidae), capturado no rio Comandante Fontoura, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Regional de Ciências**. São José do Rio Preto. V. 6, p. 239-242.
- OVERATH, P.; HAAG, J.; MAMEZA, M. G.; LISCHKE, A. 1999. Freshwater fish trypanosomes: Definition of two types, host control by antibodies and lack of antigenic variation. **Parasitology**. v. 119, p. 591-601.
- PAIN, R. H. 1987. Temperature and Macromolecular structure and function. IN: BOWLER, K. & FULLER, B. J. (eds.). **Temperature and Animal cells. Symp. Soc. Exp. Biol.** V. 41, p. 21-33.
- POWER, M. E. 1984. Habitat quality and the distribution of armored catfish in a Panamanian stream. **Journal of Animal Ecology**. v. 53, p.357-374.
- POWER, M. E. 1990. Resource enhancement by indirect effects of grazers: armored catfish, algae, and sediment. **Ecology**. v. 71 (3), p. 897-904.
- RIBEIRO, R. D.; SATAKE, T.; NUTI SOBRINHO, A.; BRENTGANI, L. G.; BRITSKI, H. A.; LOPES, R. A. 1989. Tripanosomes of brazilian fishes. IV. *Trypanosoma lopesi* sp. n. from armored catfish *Rhinelepis áspera* Agassiz 1829 (Teleostei, Loricariidae). **Zoologischer Anzeiger**. Jena. V. 222(3-4), p. 244-248.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A. 1990 (a). Trypanosomes of Brazilian fishes. VIII. *Trypanosoma itoi* sp. n. from armored catfish *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), from Moji-Guaçu river, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. **Ciência e Cultura**. v. 42, p. 1192- 1195.
- RIBEIRO, R. D., LOPES, R. A.; SATAKE, T.; NUTI SOBRINHO, A.; BRITSKI, H. A. 1990 (b). Trypanosomes of brazilian fishes. IX. *Trypanosoma pintoii* sp. n. from armored catfish *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), from Mogi- Guaçu river, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 50(3), p. 559-562.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; BRITSKI, H. A. 1991. Trypanosomes of brazilian fishes. XIII. *Trypanosoma birmani* sp. n. from *Hypostomus commersonii* Valenciennes 1840 (Pisces, Loricariidae), from Ribeira de Iguape river, SP. Brazil. **Acta Biológica Leopoldensia**. v.13(2), p. 75-84.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; GARAVELLO. J. C.; CARRARO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; SATAKE, T.; TOLDO, M. P. A. 1992. Tripanossomos de peixes brasileiros. XXVI. *Trypanosoma barroii* sp. n. encontrado no cascudo *Hypostomus* sp., capturado no rio Tocantins, localidade de Itaguatins, Estado de Goiás, Brasil. **Anais da IX Jornada Paulista de Parasitologia**. v. 1, p. 16-17.
- RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; COSTA, J. R. V. 1993. Tripanossomos de peixes brasileiros. XIV.

- Trypanosoma pradoi* sp. n. Em *Hypostomus ancistroides* ihering 1991 (Pisces, Loricariidae), capturado no córrego Laureano, município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**. v.15, p. 36-45.
- SAS Institute Incorporation. 1996. **SAS User's Guide: Statistics**. Release 6.12. North Caroline, Cory. 1098 p.
- SCHAEFER, S. A. & LAUDER, G. 1986. Historical transformation of functional design: evolutionary morphology of feeding mechanisms in loricarioid catfishes. **Systematic Zoology**. v. 35, p. 489-508.
- TAKLE, G. B. & SNARY, D. 1993. South American trypanosomiasis (Chagas'disease). In: WARREN, K. S. (Ed.). **Immunology and molecular biology of parasitic infections**. Ed. Blackwell. Boston. P. 213-236.
- THATCHER, V. E. 2006. **Amazon Fish Parasites**. Segunda edição. Sofia- Moscow: Pensoft, vol.1, 508p.
- WOO, P. T. K. 1995. **Fish Diseases and Disorders – Vol.1. Protozoan and Metazoan Infections**. Cambrigde: CAB International. 808p.
- WOO, P. T. K. 1996. Protective Imunne Response of Fish to Parasitic Flagellates. **Annual Review of Fish Diseases**. v. 6, p. 121-131.
- WOO, P. T. K. & BLACK, G. A. 1984. *Trypanosoma danilewskyi*: host specificity and host's effect on morphometrics. **The Journal of Parasitology**. v. 70, p. 788-793.
- WOO, P. T. K. & POYTON, S. L. 1999. Diplomadida, Kinetoplastida and Amoebida (Phylum Sarcomastigophora). IN: WOO, P. T. K 1. ed. **Fish Diseases and Disorders. Vol. 1.- Protozoan and Metazoan infections-** New York: CABI Publishing, p. 27-96.
- ZINTL, A.; POOLE, W. R.; VOORHEIS, H. P.; HOLLAND, C. V. 1997. Naturally occurring *Trypanosoma granulosum* infections in the European eel, *Anguilla anguilla* L. from County Mayo, Western Ireland. **Journal of Fish diseases**. v. 20, p. 333-341.

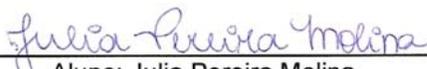
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR TRIPANOSSOMATÍDEOS (PROTOZOA:KINETOPLASTIDA) PRESENTES EM TRÊS ESPÉCIES DE CASCUDO (PISCES: LORICARIIDAE) DO RIO MOGI-GUAÇU, SP.":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp (Atual CEUA/ Unicamp), sob Protocolo(s) nº1475-1.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Julia Pereira Molina


Orientador: Marlene Tiduko Ueta

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:
Função: