



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIA PEREIRA MOLINA

Análise de Trypanosoma spp. em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi-Guaçu, SP: estudo morfológico, molecular e análise filogenética.

CAMPINAS
(2016)

JULIA PEREIRA MOLINA

Análise de *Trypanosoma* spp. em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi-Guaçu, SP: estudo morfológico, molecular e análise filogenética.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Animal na área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULIA PEREIRA MOLINA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARLENE TIDUKO UETA.

Orientadora: Marlene Tiduko Ueta

CAMPINAS

(2016)

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M733a Molina, Julia Pereira, 1985-
Análise de *Trypanosoma* spp. em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi-Guaçu, SP : estudo morfológico, molecular e análise filogenética / Julia Pereira Molina. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Marlene Tiduko Ueta.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma*. 2. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases. 3. Filogenia. 4. Sanguessugas. 5. Loricariidae. I. Ueta, Marlene Tiduko, 1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of *Trypanosoma* spp. in infections on armored catfishes and leeches from Mogi-Guaçu river, SP : morphological, molecular study and phylogenetic analysis

Palavras-chave em inglês:

Trypanosoma

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases

Phylogeny

Leeches

Loricariidae

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Marlene Tiduko Ueta [Orientador]

Luiz Eduardo Roland Tavares

Maria Isabel Muller

Danilo Ciccone Miguel

Tarcilla Corrente Borghesan

Data de defesa: 15-12-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 15 de dezembro de 2016.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (orientadora)

Prof. Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares

Dra Maria Isabel Müller

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Dra. Tarcilla Corrente Borghesan

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

**A minha família por
estar sempre ao meu lado.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta**, pela orientação e dedicação durante todo esse tempo, pela imensa ajuda em todas as fases deste trabalho, pela amizade e respeito.

Ao **Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.**

A **Prof. Dra. Marta Maria Geraldtes Teixeira** e ao **Prof. Dr. Erney Felício Plessmann de Camargo** pela ajuda e sugestões na parte molecular do trabalho e por terem cedido o laboratório e todo o material necessário para realização dos experimentos.

Ao amigo **Bruno Fermio** pela imensa ajuda e incansáveis tentativas nos experimentos moleculares e pela paciência nas inúmeras dúvidas.

A todos os colegas do **Laboratório de Taxonomia e Filogenia de tripanossomatídeos**, por me acolherem tão bem durante os experimentos realizados na USP.

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

A **Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha**, pela ajuda nos experimentos de cultura.

A **Profa. Dra. Hildete Prisco Pinheiro**, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos **Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel** e **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho** pela leitura atenciosa no exame prévio.

A **Dra. Maria Isabel Müller** pela amizade e sugestões relevantes no exame prévio.

Aos meus amigos de laboratório **L3**, pela companhia e apoio durante esses anos.

A **Fundação CAPES** pelo auxílio financeiro nessa pesquisa.

Ao meu noivo **Erico Bastos**, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e companheirismo em todos os momentos. Por dividir comigo os momentos bons e também os difíceis, sempre com muito amor.

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.

Molina, J.P. Análise de *Trypanosoma* spp. em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi-Guaçu, SP: estudo morfológico, molecular e análise filogenética (Tese). Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

RESUMO

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* são flagelados do Filo Euglenozoa e são parasitas de um grande número de hospedeiros. Os tripanossomas, transmitidos por hirudíneos foram reportados em diversas espécies de peixes de água salgada e doce, a maioria descrita com base nas características morfológicas. Novos estudos moleculares envolvendo marcadores diferentes do SSU rRNA estão sendo empregados para resolver a filogenia do grupo, bem como uma descrição de novas espécies. Este trabalho tem como objetivos caracterizar morfológicamente as diferentes formas de *Trypanosoma* observadas em infecção natural de hirudíneos e peixes do gênero *Hypostomus* coletados no rio Mogi-Guaçu; caracterizar por técnicas moleculares os exemplares de *Trypanosoma* spp. encontradas no sangue dos cascudos e hirudíneos; determinar relações filogenéticas entre tripanossomas encontrados nesse estudo, entre espécies de tripanossomas de outras espécies de peixes com base na sequência dos genes SSU V7V8 e gGAPDH; comparar também padrões filogenéticos dos tripanossomas e analisar os grupos obtidos com seus hospedeiros e respectivos vetores e finalmente identificar os hospedeiros invertebrados. Entre agosto de 2012 e setembro de 2014 foram coletados 433 exemplares de cascudos sendo 138 *Hypostomus albopunctatus*, 160 *Hypostomus regani* e 135 *Hypostomus strigaticeps*. O sangue foi coletado e esfregaços foram confeccionados, para a determinação da positividade e densidade. A prevalência geral de tripanossomas foi de 78% e densidade média geral de 0,8 parasitas/ μ l de sangue. As análises estatísticas mostraram relação apenas entre a prevalência e o ano de coleta. Relações com peso, comprimento dos peixes e estação do ano não foram significativas. Hirudíneos do gênero *Haementeria* sp. foram coletados para análises histológicas, morfológicas e moleculares. Foram medidos 60 parasitas tripomastigotas, vinte parasitas para cada espécie de peixe e os valores foram comparados com os de outras espécies de peixes do gênero. Os parasitas encontrados nas três espécies de peixes

apresentaram polimorfismo intraespecífico evidente e não foi possível separar em espécies. As análises histológicas dos hirudíneos sugerem a presença de ninho de amastigota. Os resultados moleculares incluíram um grande número de isolados novos na filogenia do gênero *Trypanosoma*. Os estudos moleculares e morfológicos corroboram a existência de pelo menos uma espécie nova de tripanossoma em cascudos brasileiros, As análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH apoiaram a monofilia dos tripanossomatídeos de peixes.

Palavras-chave: *Trypanosoma*, gGAPDH, V7V8, hirudíneos, cascudos, rio Mogi-Guaçu.

Molina, J.P. Analysis of *Trypanosoma* spp. in infections on armored catfishes and leeches from Mogi-Guaçu River, SP: Morphological, molecular study and phylogenetic analysis (Thesis). Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

ABSTRACT

The flagelates of genus *Trypanosoma* belong to Phylum Euglenozoa and are parasites of a large number of hosts. Trypanosomes transmitted by leeches 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. New molecular studies involving different markers of SSU rRNA are being used to resolve the group phylogeny, as well as the description of new species. This work aims to characterize the morphology and by molecular techniques *Trypanosoma* spp. parasites found in infected leeches and catfish of the genus *Hypostomus* from Mogi-Guaçu river, and determine phylogenetic relationships among trypanosomes found in this study and others, based on the sequence of the SSU gene and V7V8, gGAPDH, also compare phylogenetic patterns of trypanosomes and analyze the groups obtained with their hosts and their vectors and finally identify the species of invertebrate hosts. Between august 2012 and september 2014, 433 specimens of armored catfish were collected (138 *Hypostomus albopunctatus*, 160 *Hypostomus regani*, and 135 *Hypostomus strigaticeps*). Blood was collected for blood smears preparation to analysis of positive presence and density of trypanosomes. A prevalence of 78,0% with an average density of 0,8 parasites/ μ l of blood was found. Statistical analyzes showed a relationship only between prevalence and year of collection. No relation between the presence of the parasite and the weight, fish length or season were found. Leeches genus *Haementeria* sp. were collected from the body surface of the catfish, for molecular, histological and morphological analysis. A total of 60 trypanosomes were measured, twenty of each species, and the measurements were compared with those of other parasite species found in different species of fish. The parasites found in the three species of fish presented evident polimorfism so it was impossible to separate species.

The leeches histological analyzes suggested the presence of amastigotes. The molecular results included a large number of new isolates of the genus *Trypanosoma*. Molecular and morphological studies support the existence of at least one new species of trypanosome in Brazilian catfishes. Phylogenetic analyzes based on SSU rRNA genes and gGAPDH supported the monophyly of fish trypanosomes.

Keywords: *Trypanosoma*, gGAPDH, V7V8, leeches, armored catfishes, Mogi-Guaçu river.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia do gênero <i>Trypanosoma</i> baseada nos marcadores moleculares SSU rDNA e gGAPDH. Modificado de Fermino et al (2015).	25
Figura 2: Esquema do fragmento V7V8 (SSU rDNA).....	31
Figura 3: Esquema da região gGAPDH.....	32
Figura 4: Rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP. A: Vista da barragem . B: Local da coleta.....	40
Figura 5: Exemplar de <i>Hypostomus strigaticeps</i>	41
Figura 6: Exemplar de <i>Hypostomus regani</i>	41
Figura 7: Exemplar de <i>Hypostomus albopunctatus</i>	42
Figura 8: Tanques de manutenção do CEPTA/ICMBIO. A: Tanques circulares. B: Tanques retangulares.....	42
Figura 9: Hirudíneos na superfície externa do cascudo.	43
Figura 10: Punção cardíaca em <i>Hypostomus strigaticeps</i>	45
Figura 11: 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.	46
Figura 12: Hirudíneos aderidos a boca de <i>Hypostomus strigaticeps</i>	55
Figura 13: MEV de sanguessugas encontradas em <i>Hypostomus</i> . (A) visão ventral, (B). Ventosa posterior, (C) Detalhe do tegumento, (D) Região anterior.....	56
Figura 14: Cortes histológicos de sanguessugas, espessura 5 micra, coloração por hematoxilina-eosina. (A) corte transversal, aumento 10x. (B) corte transversal, aumento 40x. (C) corte transversal, aumento 100x.	57
Figura 15: Corte histológico transversal de hirudíneo evidenciando ninho de amastigota.	58
Figura 16: Análises de componentes principais dos parâmetros morfológicos dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos coletados entre agosto de 2012 e setembro de 2014, no Rio Mogi-Guaçu, Pirassunuga, São Paulo, Brazil. (<i>Hypostomus regani</i> é chamado aqui de (P), <i>Hypostomus albopunctatus</i> (R) e <i>Hypostomus strigaticeps</i> (B).	62
Figura 17: Forma tripomastigota de <i>Hypostomus strigaticeps</i> evidenciando comprimento do corpo (longo).....	66
Figura 18: Forma tripomastigota de <i>Hypostomus strigaticeps</i> evidenciando comprimento do corpo (curto).....	66
Figura 19: Forma tripomastigota evidenciando flagelo livre (indicado pela seta azul) e nucleo elíptico (indicado pela seta preta). Aumento de 100x.	67
Figura 20: Forma tripomastigota evidenciando vacúolos citoplasmáticos (indicados pelas setas verdes) e cinetoplasto terminal (indicado pela seta vermelha). Aumento de 100x.....	67

Figura 21: Forma tripomastigota evidenciando ondulação da membrana (indicada pela seta laranja) e núcleo elíptico (indicado pela seta preta). Aumento de 100x.....	68
Figura 22: Filogenia do clado aquático baseado em sequências do 18S. Modificado de Gibson et al 2005.	69
Figura 23: Árvore filogenética de tripanossomas de peixes e sanguessugas desses peixes com o posicionamento dos isolados encontrados, os isolados encontrados no presente estudo estão representado por (★). Árvore filogenética feita em análise de máxima verossimilhança de sequências de gGAPDH de tripanossomas de loricariídeos brasileiros desse estudo, sequências de <i>T. abeli</i> também de cascudos brasileiros, incluindo sequências de tripanossomas de peixes da Europa, África e Ásia, assim como sequências de tripanossomas de tartarugas e ornitorrincos também colocados no clado aquático. Sequências de outros tripanossomas e tripanossomatídeos não tripanossomas foram utilizados como outgroup nessa árvore filogenética. Números dos ramos representam suporte de bootstrap (>50) estimadas com 500 pseudoreplicadas in RaxML, utilizando GTRGAMMA.	73
Figura 24: Árvore filogenética de tripanossomas de peixes e sanguessugas desses peixes com o posicionamento dos isolados encontrados, os isolados encontrados no presente estudo estão representado por (★). Árvore filogenética feita em análise de máxima verossimilhança de sequências de V7V8 de tripanossomas de loricariídeos brasileiros desse estudo, sequências de <i>T. Abeli</i> também de cascudos brasileiros, incluindo sequências de tripanossomas de peixes da Europa, África e Ásia, assim como sequências de tripanossomas de tartarugas e ornitorrincos também colocados no clado aquático. Sequências de outros tripanossomas e tripanossomatídeos não tripanossomas foram utilizados como outgroup nessa árvore filogenética. Números dos ramos representam suporte de bootstrap (>50) estimadas com 500 pseudoreplicadas in RaxML, utilizando GTRGAMMA.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de p para Qui-quadrado, entre as a prevalência das três espécies de peixes e as variáveis, estação do ano e ano de coleta.	53
Tabela 2: Valores das estatísticas descritivas das variáveis peso e comprimento, relacionadas com a prevalência de infecção.	54
Tabela 3: Valores (em µm) da média das medidas dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos, entre agosto de 2012 e setembro de 2014.	59
Tabela 4: Matriz de correlação entre as variáveis morfométricas das formas tripomastigotas sanguíneas encontradas nas três espécies de cascudos.	61
Tabela 5: Autovalores da matriz de correlação da análise de componentes principais mostrando a porcentagem de explicação da variabilidade dos dados.	61
Tabela 6: Morfometria das espécies de <i>Trypanosoma</i> sp. descritos em diferentes espécies de peixes. As espécies em destaque referem-se aos do presente estudo.	65

Tabela 7: Isolados utilizados no estudo, os respectivos marcadores utilizados e posição	71
--	-----------

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Área de estudo.....	17
Hospedeiro vertebrado.....	17
Gênero <i>Trypanosoma</i>	19
Evolução dos tripanossomatídeos.....	22
Hospedeiro invertebrado.....	26
Desenvolvimento e ciclo biológico.....	27
Taxonomia de tripanossomatídeos.....	28
Marcadores moleculares.....	30
Filogenia de tripanossomatídeos.....	32
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
Local de coleta.....	40
Coletas de peixes.....	40
Coleta de Hirudíneos.....	43
Criação e Manutenção de Hirudíneos.....	43
Histologia.....	44
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	44
Esfregaço sanguíneo.....	44
Análise Morfométrica.....	45
Cultura dos parasitas.....	46
Análise estatística.....	46
Extração do DNA.....	47
Amplificação do DNA.....	48
Purificação, Clonagem e Sequenciamento.....	49
Filogenia.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	99

INTRODUÇÃO

Área de estudo

A bacia do rio Paraná é uma ampla região sedimentar do continente sul-americano que inclui porções territoriais do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, totalizando uma área que se aproxima dos 1,5 milhão de quilômetros quadrados. A bacia possui uma forma ovalada com eixo maior Norte e Sul (Milani et al, 2007). A bacia está inserida no segundo maior sistema de drenagem da América do Sul, abrigando uma ictiofauna bastante diversa, mas ainda pouco conhecida (Lowe- McConnell, 1999). A região do alto Paraná inclui os cursos de água de maior porte do Estado de São Paulo e é conhecida pela grande diversidade de peixes, com 38 famílias, 236 espécies nativas descritas. (Langeani et al, 2007).

O rio Mogi Guaçu, pertencente à bacia do Paraná, possui 473 km de extensão, nasce no Estado de Minas Gerais a 1.594m de altitude no município de Bom Repouso (Brigante & Espíndola, 2003). No Estado de São Paulo, deságua no rio Pardo a uma altitude de 490 m, no município de Pontal (SP), e se junta ao rio Grande, um dos afluentes do rio Paraná, percorrendo a maior parte de seu curso (84%) em território paulista (Brigante & Espíndola, 2003). Em seu trecho médio, o rio Mogi-Guaçu apresenta uma extensa planície alagável, com mais de 90 lagoas marginais de dimensões variadas e diferentes graus de conectividade com o rio. Este trecho compreende a região de Cachoeira de Emas nos municípios de Pirassununga e Luis Antônio (SP), onde o gênero de peixe mais encontrado é o *Hypostomus* (Gonçalves & Braga, 2008).

Hospedeiro vertebrado

Os peixes são os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (Torres & Pereira, 2008), com aproximadamente 20.000 espécies descritas (Lowe- McConnell, 1999). Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, tendo em vista apenas duas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes)

(Torres & Pereira, 2008). A biota de peixes de água-doce da América do Sul e Central são as maiores do mundo, mas a grande diversidade de animais é com certeza subestimada. A resposta para tamanha diversidade é ainda obscura, algumas hipóteses estão concentradas entre processos geológicos e/ou ecológicos (Reis et al, 2003).

Os peixes desse tipo de ecossistema oferecem uma oportunidade única para estudos biogeográficos e, isso acontece, pois, sua dispersão depende diretamente das conexões que existem ou se formam entre rios e seus afluentes. Com esses estudos é possível entender a geologia e cronologia dos eventos ocorridos nos rios de muitos anos atrás (Bermingham & Martin, 1998; Montoya- Burgos, 2003; Chiachio et al, 2008).

A ordem Siluriformes compreende mais de 3093 espécies de peixes de água-doce e marinha, habitando todos os continentes, exceto a Antártida, contudo mais de 50% das espécies, incluindo os loricarídeos vivem na América tropical (Da Silva et al, 2014; Silva et al, 2014).

A família Loricariidae é a mais numerosa da ordem Siluriformes, com 800 espécies descritas e 300 reconhecidas, mas ainda sem descrição. Estudos morfológicos e moleculares suportam a monofilia dos loricarídeos (Lucena et al, 2012). A grande maioria dos loricarídeos são peixes de fundo (Covain & Fish-Muller, 2007; Ferraris Jr., 2007), geralmente de tamanho pequeno a médio (Ferraris jr. 2007; Lucena et al, 2012; Reis et al, 2003). Os exemplares pertencentes a essa família apresentam características próprias, o corpo coberto por placas ósseas e lábios modificados em uma espécie de ventosa. Essas modificações possibilitam a colonização de todos os tipos de habitat. Com extenso número de placas ósseas, os loricarídeos possuem a maior taxa de fosfato de cálcio em seu corpo, em comparação à todas as espécies já analisadas para esse composto (Vanni et al, 2002), característica que os tornam importantes ecologicamente na dinâmica de nutrientes de muitos rios neotropicais (Knoll et al, 2009). Esta família é composta de seis subfamílias: Delturinae, Hypostominae, Hypoptopomatinae, Lithogeneinae, Loricariinae e Neoplecostominae (Reis et al, 2006; Ferraris Jr., 2007).

Dentro dessa família, particularmente no gênero *Hypostomus*, há uma grande semelhança morfológica entre as espécies, o que dificulta sua identificação. Os peixes desse gênero são nativos da América do Sul e

abrigam espécies ornamentais e de consumo (Da Silva et al, 2014; Silva et al, 2014). Somente na Bacia do Paraná existem mais de 16 espécies de *Hypostomus* conhecidas (Agostinho & Julio Jr., 1999). Os peixes da subfamília Hypostominae podem respirar facultativamente ar atmosférico, caso a taxa de oxigênio dissolvido na água esteja muito baixa. Estes animais utilizam o estômago, que possui inúmeros capilares, como órgão respirador acessório (Mattias et al, 1998). São peixes obrigatoriamente de fundo e se alimentam principalmente de um conjunto de detritos e algas (Buck & Sazima, 1995). O gênero *Hypostomus* é confirmado e considerado hospedeiro mais comum de tripanossomatídeos (Ribeiro et al, 1990). No Brasil mais de 60 espécies de tripanossomas foram descritas em peixes marinhos e de água-doce como por exemplo *Trypanosoma hypostomi*, *T. chagasi*, *T. guaibensis*, e *T. lopesi*, descritas em loricarídeos. A alta prevalência em cascudos pode ser consequência dos hábitos semi-sedentários, que possibilita maior infestação por ectoparasitas, que por sua vez transmitem os protozoários (Froés et al, 1978).

Os peixes do gênero *Hypostomus* são popularmente conhecidos como cascudos e as espécies de interesse para esse trabalho são: *Hypostomus albopunctatus* (Regan, 1907), que apresenta uma distribuição ao longo da bacia do Paraná (Froese & Pauly, 2010), ocorre em trechos lóticos e em tributários. *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) uma espécie encontrada nas bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai (Britto, 2003; Froese & Pauly, 2010) e *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907), espécie abundante e amplamente distribuída na bacia do Paraná, especificamente na bacia do Tietê (Casatti et al, 2005).

Gênero *Trypanosoma*

O filo Euglenozoa (Eukaryota, Excavata) compreende três ordens: Diplomida, Euglenida e Kinetoplastida, abriga animais com estilos de vida diversos como: Euglenozoa (autótrofos fotossintetizantes), heterótrofos de vida-livre como *Bodo saltans* e parasitas facultativos ou obrigatórios como o gênero *Trypanosoma* (Stevens, 2008).

Com o aumento do número de espécies descritas e o advento de novos parâmetros taxonômicos, características morfológicas, biológicas e

moleculares têm havido alterações no posicionamento taxonômico dos membros do filo euglenozoa. Os organismos deste filo foram reclassificados em 3 classes: Kinetoplastea, Euglenoidea e Diplonemea (Moreira et al, 2001; Simpson & Roger, 2004).

Os membros da classe Kinetoplastea se caracterizam pela presença do cinetoplasto, que é uma região especializada da única mitocôndria, constituída por moléculas de DNA circular concatenadas, localizada na base flagelar e que contém o DNA mitocondrial (Vickerman, 1976). Um estudo recente baseado em filogenia molecular dividiu a classe Kinetoplastea em duas subclasses: a) Prokinetoplastina, contendo as espécies basais *Ichtyobodo necator* e *Perkinsiella amoebae*; b) Metakinetoplastina, compreendendo a ordem Tripanosomatida e três novas ordens, Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida. Esta classificação determinou que a ordem Tripanosomatida abrigasse 11 gêneros da família Trypanosomatidae: *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Trypanosoma* (ciclo de vida heteroxênico), *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e (monoxênicos) *Serglia*, *Argomonas*, *Strigomonas*, *Wallaciomonas*, *Paratrypanosoma*, *Norrymonas* (Moreira et al, 2004; Adl et al, 2012).

De acordo com os parâmetros taxonômicos tradicionais, que envolvem características morfológicas e ciclo de vida, os cinetoplastídeos foram classificados em duas subordens: Bodonina e Trypanosomatina. As espécies da subordem Bodonina apresentam 2 flagelos localizados em lados opostos, sendo habitantes de ambientes aquáticos de água doce ou salgada (vida livre), ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos. A subordem Trypanosomatina compreende protozoários uniflagelados, endoparasitas obrigatórios e pertencentes a apenas uma família, Trypanosomatidae (Vickerman, 1976; Moreira et al, 2004; Simpson et al, 2006). A família Trypanosomatidae é parasita de todas as classes de vertebrados, incluindo seres humanos, plantas e invertebrados, principalmente insetos. Os parasitas de plantas (*Phytomonas*) e vertebrados, gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, podem ser patogênicos a seus hospedeiros a quem são transmitidos por vetores invertebrados (Viola et al, 2008a e b; Teixeira et al, 2011; Borghesan et al, 2013). Os tripanossomatídeos são o grupo de maior sucesso de

parasitas na terra, incluindo muitas espécies de importância médica, veterinária e econômica (Simpson et al, 2004).

As espécies de *Trypanosoma* possuem uma distribuição global e variável, abrigando desde espécies hospedeiro-específicas a parasitas generalistas. A gama vai de parasitas não patogênicos até aqueles altamente patogênicos. Os artrópodes são os vetores de tripanossomas de aves e mamíferos, enquanto as sanguessugas transmitem os protozoários entre os vertebrados aquáticos ou para hospedeiros que tiveram qualquer parte do seu ciclo de vida no ambiente aquático. Os parasitas de anfíbios e répteis podem ser transmitidos por sanguessugas, moscas e mosquitos (Hoare, 1972; Stevens et al, 2001; Hamilton et al, 2004 2007; Ferreira et al, 2007, 2008; Viola et al, 2008a e b, 2009a e b).

O gênero *Trypanosoma* é vasto e diverso, compreendendo mais de 470 espécies nomeadas, parasitando um vasto número de hospedeiros. São de difícil detecção em microscopia óptica quando analisados em hospedeiros com baixa carga parasitária. A divergência entre as espécies, a ampla variedade de hospedeiros e a distribuição global sugerem que tripanossomatídeos teriam ao menos 100 milhões de anos e datariam dos primeiros vertebrados habitantes do planeta (Stevens et al, 2001; Hamilton et al, 2004, 2007; Viola et al, 2009a). Os Kinetoplastidas são um grupo facilmente reconhecido, todos compartilham o fato de serem parasitas de vertebrados, além de possuírem uma morfologia característica, na forma tripomastigota, no sangue dos vertebrados. Outra característica impar é a presença de uma única mitocôndria contendo moléculas de DNA concatenadas. (Hoare, 1972; Lake et al, 1988; Vickerman, 1994). Esse kDNA pode apresentar diferentes padrões de distribuição, sendo uma massa concentrada na base do flagelo (eukinetoplastea), podendo ser dispersa por toda a mitocôndria em pequenas porções de massas de tamanhos iguais (polykinetoplastea), ou desigualmente distribuída em porções difusas e de diversos tamanhos na mitocôndria (pankinetoplastea). Não somente essas características únicas atraíram a atenção de estudiosos para esse grupo, mas também a presença de grupos de grande importância médica e o fato de kinetoplastídeos de vida livre serem tão abundantes e serem predadores microbiológicos de grande importância em ecossistemas aquáticos e

terrestres. Todo esse interesse traz um grande desejo de se reconstruir uma robusta filogenia do grupo para o melhor entendimento de sua evolução genética, bioquímica e estrutural (Moreira et al, 2004).

Estes organismos apesar de apresentarem a morfologia simples de organismos unicelulares, possuem diversas estratégias e são capazes de desenvolver as mais diferentes soluções para os problemas comuns de ser uma célula eucariótica. As peculiaridades dos kinetoplastidas são inúmeras, entre elas, presença de trans-splicing, transcrição policistrônica e glicose compartimentalizada (Simpson et al, 2006).

Embora capazes de recombinação gênica os tripanossomas não se beneficiam da troca genética para validar sua taxonomia (Gaunt et al, 2003; Borghesan et al, 2013). Diversos estudos têm demonstrado que recombinações genéticas (reprodução sexuada) são eventos raros entre os tripanossomatídeos que, em geral, se propagam na natureza como populações clonais, apesar da formação de híbridos já ter sido sugerida em *T. cruzi* (Gaunt & Miles, 2000). Entretanto, os estudos de diversidade genética demonstram que a estrutura populacional dos tripanossomatídeos é basicamente clonal e que, se existentes na natureza, recombinações são muito esporádicas (Tibayrenc, 1995).

Evolução dos tripanossomatídeos

Duas origens evolucionárias tem sido propostas para o gênero. A primeira adota que os parasitas tenham vindo de um hospedeiro vertebrado e teriam evoluído de um parasita intestinal. Outra teoria traz esses protozoários como originados de um *Trypanosoma* parasita de invertebrado. No centro da resolução dessa teoria está uma problemática ainda maior, teriam os parasitas uma única origem evolucionária? Seriam eles monofiléticos? O primeiro estudo filogenético, baseado na comparação dos genes mitocondrial e ribossomal RNAs (rRNA), mostraram o grupo como sendo parafilético. Entretanto a inclusão de outros taxons e de uma ampla gama de hospedeiros suportaram a teoria do grupo ser monofilético (Maslov et al, 1996; Hamilton et al, 2004; Stevens, 2008).

Baker (1963) afirmou que o gênero *Trypanosoma* gera muitas especulações sobre seu surgimento e origem. Afirmou ainda que em 1904

Léger propôs que os tripanossomas teriam se originado dos biflagelados tripanoplasmas, mais tarde porém nesse mesmo ano ele sugeriu que alguns tripanossomas poderiam ter se originado dos uniflagelados Leptomonas, parasitas de intestino de invertebrados, com isso ele afirmava o grupo como sendo difilético, com alguns se originado de tripanoplasmas e tendo o flagelo situado na parte posterior e outros se originando de leptomonas e que ficaram com o flagelo situado na parte anterior. Mostrou que em estudo de 1906 Woodcock expressou suas afirmações sobre os flagelados terem derivado de parasitas intestinais de insetos. Em 1908 Brumpt relatou a transmissão transovariana de tripanossomas de água doce de sanguessugas para seus descendentes, com isso ele sugeriu que as sanguessugas seriam os primeiros hospedeiros dos tripanossomas. Essa hipótese foi refutada pensando que se os tripanossomas poderiam ser passados de geração para geração de hirudíneos não havia necessidade de se parasitar vertebrados e por isso a evolução não podia ser explicada. Em mesmo estudo Baker (1963) afirmou que em 1910, Hartmann & Jollos publicaram árvores filogenéticas mostrando a origem dos tripanossomatídeos de um único ancestral comum que seriam leptomonas. Com estudos posteriores se chegou ao consenso que realmente o ancestral dos flagelados seriam mesmo os parasitas do intestino de invertebrados.

A hipótese de que os flagelados teriam evoluído de parasitas do trato intestinal de insetos é aceita, a proximidade morfológica em algum estágio da vida de todos os tripanossomatídeos faz com que seja altamente provável eles terem evoluído de um grupo ancestral comum. Na história evolutiva é difícil imaginar como uma grande variedade de insetos não hematófagos teriam se tornado hospedeiros desse grupo de parasitas, isso somente seria explicado caso o próprio inseto tenha sido o primeiro hospedeiro, qualquer tentativa de transferência desses flagelados de vertebrados para esses invertebrados parece improvável (Baker, 1963).

Em estudos posteriores as evidências sugerem a monofilia do grupo que possui uma única origem evolucionária. O ancestral mais provável seria um *Trypanosoma* parasita de inseto. De uma única origem os parasitas teriam irradiado para todas as classes de vertebrados e passaram a possuir uma larga variedade de vetores. As filogenias propostas até o momento

mostram que os tripanossomas de peixes se acumulam todos em um único e bem suportado clado, nas árvores filogenéticas de gGAPDH e nas de SSU rRNA no chamado “clado aquático”, que inclui todos os hirudíneos transmissores de *Trypanosoma* sp. (Hamilton et al, 2004; Stevens, 2008).

Concomitante, essa evidência sugere o seguinte cenário: O primeiro *Trypanosoma* provavelmente parasita de um inseto sugador, sofreu uma adaptação e se tornou dependente de um hospedeiro vertebrado, dando então origem aos outros tripanossomas, como sugerido por Hoare (1972). Essa mudança de inseto hospedeiro para inseto transmissor foi provavelmente um evento terrestre. A adaptação para a transmissão de tripanossomas para peixes e anfíbios, por hirudíneos aquáticos, seria um evento secundário como sugeridos por Maslov et al (1996); Hamilton et al (2004) e Stevens (2008).

As análises filogenéticas baseadas na subunidade menor do gene 18S (SSU rRNA) e o gene glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (gGAPDH) únicas e combinadas, mostram os tripanossomas como sendo monofiléticos com o gênero dividido em oito clados bem suportados (Figura 1). O “Clado cruzi”, que inclui dois tripanossomas de mamíferos do novo mundo (*T. cruzi* e *T. rangeli*) além de tripanossomas de morcegos do novo e velho mundo e um tripanossoma de canguru australiano e tripanossomas de uma grande variedade de roedores, uma espécie em lagomorfos e uma na ordem insectívora. O “Clado brucei”, que abriga tripanossomas de mamíferos africanos que são transmitidos por moscas tse-tse, a maioria sendo patogênica para animais domésticos (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. simiae* e *T. vivax*), sendo que duas espécies de *T. brucei* são patogênicas para o homem. O “Clado de aves” que possuem tripanossomas de aves e artrópodes. O “Clado lagartos e serpentes” que abriga espécies de tripanossomas de cobras e lagartos “Clado crocodilianos” onde estão os tripanossomas de jacarés e crocodilos e finalmente o “Clado aquático” que inclui principalmente tripanossomas de vertebrados aquáticos e anfíbios, apesar de pertencerem a esse clado também uma espécie de tripanossoma de tartaruga e uma espécie de tripanossoma de ornitorrinco. Dos clados aceitos todos, exceto o clado aquático é predominante ou restrito a uma classe de hospedeiros vertebrados. No clado aquático existe uma restrição

em dois subclados, formados por tripanossomas de anuros e outro por tripanossomas de peixes, nesse último porém os hospedeiros não são monofiléticos incluindo peixes cartilaginosos e teleosteos. No caso dos hospedeiros invertebrados cinco dos oito clados aceitos apresentam restrição a um hospedeiro vetor (Hamilton et al, 2007).

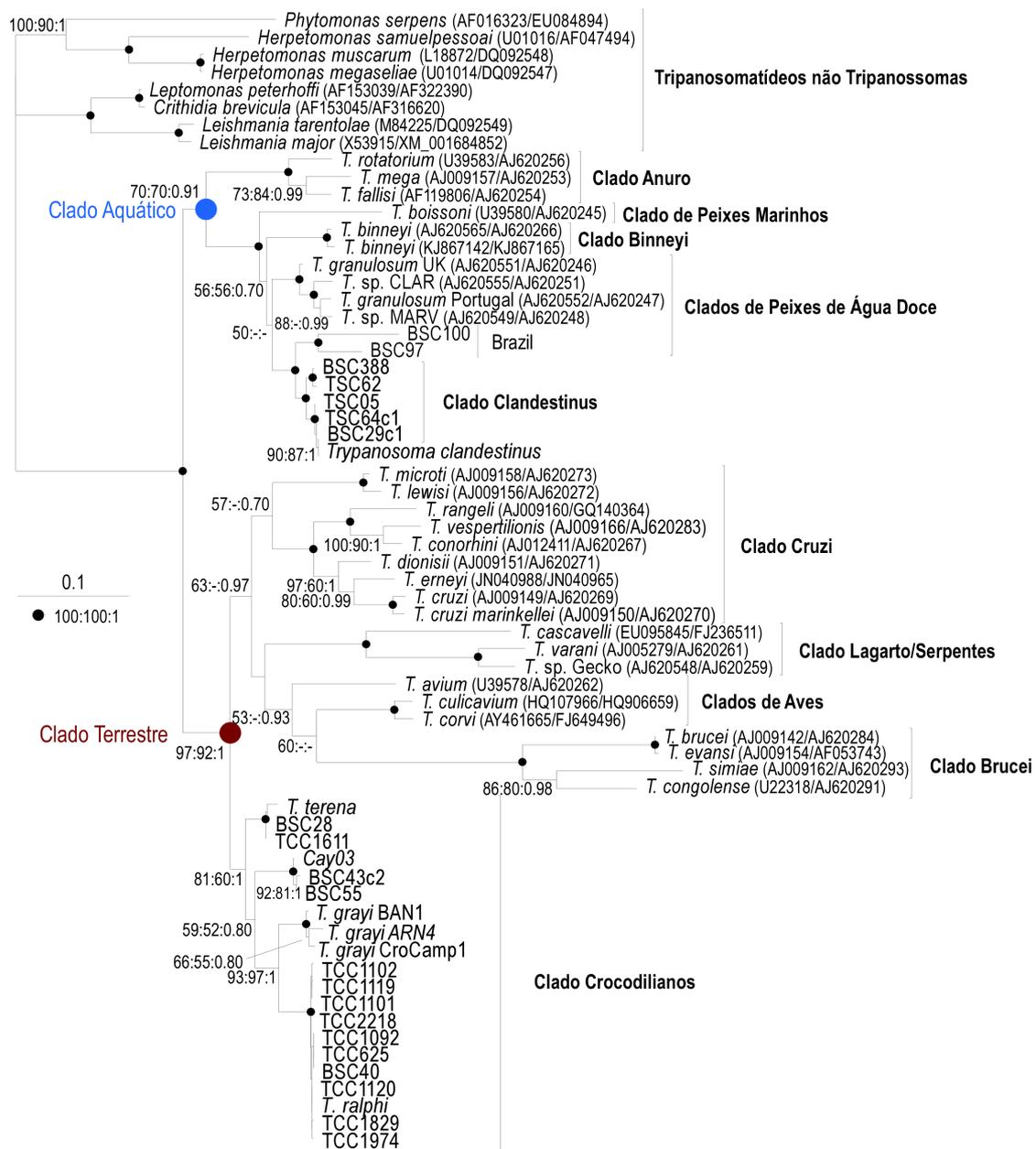


Figura 1: Filogenia do gênero *Trypanosoma* baseada nos marcadores moleculares SSU rDNA e gGAPDH. Modificado de Fermino et al (2015).

Os animais dos filos Annelida e Arthropoda descenderam de um grupo ancestral comum e divergiram no curso da evolução no período pré cambriano, muito antes do surgimento dos vertebrados. Existem, portanto, três explicações para a presença de tripanossomas tanto em insetos como em anelídeos, isso levando em conta que os flagelados são monofiléticos e teriam sido primeiro parasitas de invertebrados: a primeira seria que os tripanossomas de hirudíneos e vertebrados aquáticos teriam todos evoluído desses insetos, outra hipótese seria que os tripanossomas de insetos evoluíram dos encontrados em sanguessugas e por último a hipótese que os dois grupos de tripanossomas seriam descendentes de um parasita encontrado no ancestral comum desses animais. As análises das variações de desenvolvimento do parasita no seu hospedeiro, bem como os eventos evolucionários necessários para explicar sugerem a terceira proposta como a mais plausível e passível de aceitação. A conhecida presença de leptomonas no intestino de moluscos, nematódeos e rotíferas sugerem que os tripanossomatídeos estavam presentes em animais invertebrados muito antes da divergência dos grupos de anelídeos e artrópodes, isso pois acredita-se que moluscos, nematódeos e rotíferas tiveram seu processo de diferenciação anterior aos Annelida e Arthropoda (Baker, 1963).

Hospedeiro invertebrado

Os hirudíneos pertencem ao filo Annelida e classe Hirudinea, com cerca de 500 espécies de sanguessugas encontradas em ambientes marinhos e dulcícolas. A Classe Hirudinea é dividida em 3 subclasses: Branchiobdellida, Achantobdellida e Euhirunea, a última abrigando a maioria das sanguessugas. Existem espécies de hirudíneos consideradas predadoras, mas na sua grande maioria, são ectoparasitas sanguíneas de um grande número de hospedeiros. Apesar de serem raramente restritas a uma espécie de hospedeiro, estudos mostram que as sanguessugas parasitam apenas uma classe de vertebrados. As sanguessugas de água doce estão distribuídas por várias regiões na América do Sul onde predominam espécies da família Glossiphoniidae (ordem Rhynchobdellida) e da subordem Hirudiniformes (ordem Arhynchobdellida).

Desenvolvimento e ciclo biológico

As formas dos parasitas encontrados nos peixes são as tripomastigotas (Eiras, 1994; Woo, 1995).

Em peixes, o ciclo de vida da maioria dos tripanossomas é desconhecida, mas os hirudíneos têm sido identificados como os hospedeiros e vetores dos tripanossomas para peixes de água doce (Khan, 1976; Jones & Woo, 1991). Hirudíneos também são os vetores prováveis para tripanossomas de peixes marinhos, especialmente no hemisfério norte, embora muitas vezes, a transmissão não seja comprovada (Hayes et al, 2014).

A patogenia das tripanossomíases de peixes é pouco conhecida. Os estudos que vêm sendo realizados estão geralmente relacionados a infecções experimentais. (Becker, 1977; Eiras et al, 1990; Eiras et al, 2008). Apesar da maioria dos peixes infectados serem assintomáticos, a infecção severa pode provocar sinais como anemia, esplenomegalia, hipoglicemia (Islam & Woo, 1991b; Su et al, 2014).

Os hirudíneos que parasitam peixes, o fazem apenas temporariamente para se alimentarem. Em infestações severas, sanguessugas podem causar anemia e até morte do hospedeiro, quadro que pode ser agravado se associado ao número elevado de flagelados presentes no sangue do animal (Islam & Woo, 1991a; Woo, 1995; Thatcher, 2006).

O fator de condição representa um indicativo quantitativo do estado de saúde do peixe (Vazzoler, 1996). As análises das variações deste fator, encontrados entre populações e ou entre indivíduos, podem ser usados para demonstrar os efeitos que algumas situações, tais como a qualidade do ambiente ou disponibilidade de alimento, podem ter nos organismos (Bolger & Conolly, 1989). Por ser uma medida dependente da saúde do animal, também pode ser efetiva para indicar os efeitos dos parasitas em seus hospedeiros, tanto em ambiente natural como artificial (Ranzani-Paiva et al, 2000).

O fator de condição e a presença ou abundância de certas espécies de parasitas são variáveis (Ranzani-Paiva et al, 2000). Geralmente um peixe é naturalmente infectado por algumas espécies de parasitas que coexistem, cada hospedeiro abriga uma infracomunidade de parasitas (Bush et al, 1997).

O desenvolvimento do parasita nos peixes compreende várias etapas com características distintas, com uma fase patente e uma crônica, sendo esta última de longa duração. Em espécies polimórficas a forma tripomastigota é típica da fase crônica. Estudos mostram que não ocorrem divisões ou mudanças de fase do parasitas, sugerindo que os tripanossomas de peixes se multiplicam exclusivamente no vetor. (Lom, 1979; Lom & Dyková, 1992; Eiras, 1994; Eiras et al, 2008).

O desenvolvimento de tripanossomas em sanguessugas ocorre inicialmente no ceco ou no estômago dos invertebrados com formas epimastigotas em divisão, posteriormente ocorre uma migração para a probóscide onde são encontradas as formas metacíclicas, que serão depois transmitidas ao hospedeiro vertebrado (Martin & Dessler, 1991).

Taxonomia de tripanossomatídeos

Ao contrário dos tripanossomas de mamíferos, existem poucos parâmetros taxonômicos claramente definidos e utilizados pela comunidade científica para a classificação de tripanossomas de anfíbios, répteis, aves e peixes (Hoare & Wallace, 1966).

O conhecimento de tripanossomas de peixes marinhos na África do Sul, em 2006, estava limitada a três espécies nomeadas com base em seus hospedeiros vertebrados e, até o momento, os estudos sobre relações filogenéticas entre tripanossomas e peixes são limitados a espécies de água doce (Hayes et al, 2014).

Os ciclos de vida de tripanossomas revelam problemáticas frequentes, além disso as relações filogenéticas entre estes flagelados são incertas. Em espécies de peixes de água doce predominam os estudos filogenéticos de tripanossomas, utilizando seqüências de rDNA 18S. Apenas algumas espécies marinhas, como *Trypanosoma boissoni* (Ranque, 1973) e *Trypanosoma senegalense* (Ranque,1973) oriundos do Senegal, *Trypanosoma pleuronectidium* (Robertson,1906) e *Trypanosoma murmanense* (Nikitin,1927), da Noruega, possuem estudos envolvendo biologia molecular (Hayes et al, 2014).

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

Existem poucas informações sobre a diversidade genética, relações filogenéticas, gama de hospedeiros, vetores, ciclo de vida e distribuição geográfica desses parasitas. Conseqüentemente a taxonomia desse grupo continua problemática (Teixeira et al, 2011; Lima et al, 2012).

Diversas espécies de tripanossomas estão descritas em diversos grupos de vertebrados, porém algumas dessas espécies podem ser sinônimos. A identificação taxonômica convencional de tripanossomas de peixes é baseada nas diferenças das características morfológicas dos parasitas (Lopes et al, 1989; Eiras et al, 1990). Outro método inconclusivo é a classificação baseada na especificidade do hospedeiro, essa teoria se torna fraca pela facilidade em se obter infecção cruzada experimental (Viola et al, 2008b, Viola et al, 2009b). Até recentemente, identificação de gêneros e espécies de tripanossomas eram baseadas na morfologia, comportamento e características bioquímicas dos parasitas, além da análises de seus hospedeiros e origem dos mesmos. No caso de tripanossomas com mais de um hospedeiro, particularmente a espécie *T. cruzi* o estudo era facilitado pela existência do ciclo de vida envolvendo insetos hematófagos, animais silvestres e domésticos bem como seres humanos. Isso não ocorre porém com tripanossomatídeos parasitas exclusivamente de insetos por exemplo, que são morfológicamente indistinguíveis, os outros fatores comumente utilizados para descrição de novas espécies também não funcionam nesse caso pois as espécies de tripanossomas, bem como os insetos que as abrigam, são encontrados em uma distribuição mundial, além da possibilidade de um inseto abrigar mais de uma espécie de tripanossomatídeo. Todas essas problemáticas enfraquecem o tradicional sistema de taxonomia que vinha sendo proposto (Borghesan et al, 2013)

A taxonomia tradicional não possibilita a determinação de novas espécies com segurança, devido em grande parte ao pleomorfismo dos parasitas do gênero *Trypanosoma*. Técnicas moleculares têm sido mais efetivas quando aplicadas nas determinações taxonômicas envolvendo

tripanosomas (Figuroa et al, 1999; Karlsbakk & Nylund, 2006; Gu et al, 2007a; Gu et al, 2007b).

A taxonomia dos Tripanossomatídeos adquiriu a atual forma depois que Hoare & Wallace (1966) propuseram um critério para definição de gênero, baseado em fenótipo e ciclo de vida. Esse critério resolveu a desordem vigente na taxonomia de tripanossomatídeos, porém ainda mostra problemas. Um problema recorrente era resultado da dificuldade no reconhecimento dos morfotipos utilizados para definir cada gênero, que requeria especialista e treinamento. O critério ainda esbarrava em outra problemática, nem todos os novos tripanossomatídeos descritos se encaixavam no modelo de gênero propostos por Merzlyak et al (2001), Svobodova et al (2007) e Lima et al (2012).

Vem se tornando evidente que a análise molecular pode promover uma reavaliação da taxonomia do grupo de tripanossomatídeos. Uma abordagem interessante seria a separação das espécies de *Trypanosoma* baseando-se nas linhagens de seus ancestrais, além dos critérios já utilizados como o fenótipo do parasita, especificidade e origem do hospedeiro. Análises moleculares, morfologia, informações sobre o comportamento e biogeografia do hospedeiro contribuem e são de grande valia para designação de uma espécie de *Trypanosoma* (Borghesan et al, 2013).

O conhecido polimorfismo de tripanossomas sanguíneos pode facilmente ser efeito da ocorrência de infecções mistas. Estudos moleculares tem revelado um grande número de parasitas encontrados na natureza e que apresentam formas indistinguíveis. Todos esses fatores impedem a correta avaliação de toda a coleção de tripanossomas existentes, sua diversidade, seus hospedeiros e seu alcance geográfico (Fermino et al, 2015).

Marcadores moleculares

Os genes nucleares de DNA ribossomal (rDNA) dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um dos mais complexos padrões de moléculas de RNA. Os genes de rDNA (18S e 24S) sempre foram considerados adequados para se realizar testes de inferências de relacionamentos filogenéticos, isso ocorre principalmente

porque esses genes se apresentam em todos os organismos, além de possuírem uma equivalência funcional. A região geralmente escolhida para as análises é a subunidade menor (SSU), devido a sua facilidade de amplificação por PCR, seu tamanho e o fato de possuir regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas. Estudos utilizando sequências de SSU rDNA têm contribuído para o esclarecimento de questões filogenéticas e evolutivas dos tripanossomas. (Hernández et al, 1990)

O clado tripanossoma é de difícil determinação em decorrência de problemas de alinhamento envolvendo o 18S rDNA com regiões de muita variação de nucleotídeos e grande número de inserções e deleções. Por esses e outros motivos, análises filogenéticas utilizando a sequência total do 18S e outros genes vem sendo utilizadas (Hamilton et al, 2004, 2007; Austen et al, 2009). Essas sequências de genes adicionais podem vir a resolver a filogenia do grupo (Viola et al, 2009a).

O sequenciamento (barcoding) da região variável V7V8 da SSU rDNA (Figura 2) foi confirmada como uma ferramenta poderosa para avaliar a diversidade genética dos tripanossomatídeos em geral (Maia da Silva et al, 2004; Ferreira et al, 2007,2008; Viola et al, 2008a, 2009 a, b e Lima et al,2012).

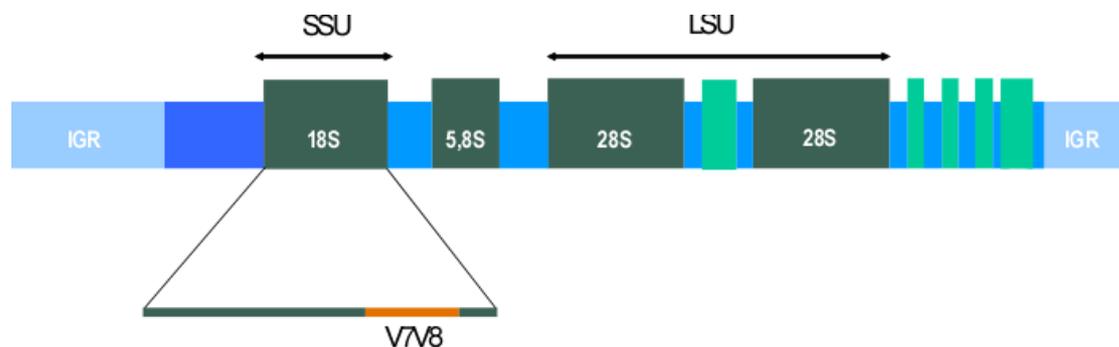


Figura 2: Esquema do fragmento V7V8 (SSU rDNA).

As sequências V7V8 são suficientes para distinguir as espécies, são úteis para análises de polimorfismo e relações genéticas entre espécies próximas, além de poderem ser incluídas em largas sequências para inferir filogenias. Entretanto, apesar de possibilitar a distinção entre espécies de *Trypanosoma* o uso parcial ou total apenas da SSU rDNA é considerada insuficiente para analisar nos níveis específicos da filogenia. Por todos esses

motivos, o sequenciamento do gGAPDH vem sendo utilizado na filogenia desses grupos. (Viola et al, 2009 a, b).

O gene gGAPDH (Figura 3) aparenta ser um grande candidato para reconstrução da filogenia do gênero *Trypanosoma*, pois evolui lentamente em comparação a SSU rDNA. O gene em questão (glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase) é uma enzima glicolítica essencial, por ser um gene de cópia única, os genes codificantes de proteínas trabalham com restrições evolutivas bem diferentes e por isso o estudo desses genes podem complementar as análises baseadas em SSU rDNA. Esse gene possui menor taxa de evolução molecular, tornando-se, portanto, uma boa opção para estudos evolutivos em escalas de tempo maior. O gene gGAPDH vem sendo estudado em membros de todas as três ordens do filo Euglenozoa, incluindo os próprios tripanossomatídeos, um Bodonida (Wiemer et al, 1995), um Euglenida (Henze et al, 1995) e dois diplonemidas (Qian & Keeling, 2001) e já existem diversas sequências disponíveis (Hamilton et al, 2004).



Figura 3: Esquema da região gGAPDH.

Filogenia de tripanossomatídeos

Existe um consenso no estudo do gênero *Trypanosoma* que o divide em dois grandes clados: terrestre e aquático. No clado terrestre estão inseridos os tripanossomas de maior interesse médico e veterinário. O clado aquático estaria dividido em dois grupos principais, um cujo vetor são sanguessugas, isoladas de peixes de água doce e salgada, de ornitorrinco e de tartaruga. O outro grupo é formado por tripanossomas de anuros e um isolado de camaleão. O posicionamento do clado aquático nas análises filogenéticas do grupo gera algumas questões, alguns trabalhos sugerem que este seja o grupo irmão dos demais tripanossomas (Hamilton et al, 2004, Stevens et al, 2001) e outros que esse seja uma irradiação interna ao gênero (Wright et al, 1999; Martin et al, 2002).

A combinação de técnicas moleculares e análises morfológicas é a melhor estratégia para identificação de espécies até o momento (Svobodova et al, 2007; Yurchenko et al, 2008, 2009; Viola et al, 2009 a, b); Maslov et al, 2010; Lima et al, 2012). A gradual melhora e mudanças nas classificações é uma parte da dinâmica taxonômica que apresenta constantes descobertas. Existem estudos que separam as espécies baseando-se em linhagens ancestrais descendentes substituindo critérios como fenótipos, geografia e hospedeiros de origem, no entanto concomitantemente as informações filogenéticas, as características biológicas, morfológicas, comportamentais bem como biogeográficas são de extrema importância para a designação de novas espécies (Borghesan et al, 2013).

Em geral, no entanto, apesar dos parasitas de peixes representarem modelos importantes para estudos ecológicos e evolutivos, apenas alguns deles são atualmente examinados em detalhe, o que limita o conhecimento da biodiversidade. (Scholz & Choughury, 2014).

Interações entre espécies é a forma fundamental de entender os padrões macro evolutivos e de diversificação. Um dos mais relevantes exemplos de interação inter-específica é o padrão co-evolutivo entre hospedeiros e parasitas. Nessas interações, a co-especiação pode surgir se os dois organismos dividem uma história evolutiva comum, e nesse caso os parasitas seguem os eventos de especiação do seu hospedeiro (Nieberding et al, 2008). A história é favorecida pela força da relação parasita-hospedeiro bem como o alto nível de especiação entre hospedeiro e parasita e a capacidade de transmissão vertical de parasitas entre os hospedeiros. No nível filogenético, a história comum entre dois taxons é melhor observado em árvores filogenéticas congruentes (Nieberding et al, 2008).

A co- especiação é um processo em constante evolução, porém a co-diferenciação entre linhagens de um hospedeiro e seu parasita devem ser detectáveis nos níveis intraespecíficos (Nieberding et al, 2008). Em geral hospedeiros simpátricos e filogeneticamente relacionados que dividem o mesmo nicho ecológico, exibem comunidades semelhantes de parasitas, estas determinadas por semelhança nos recursos e possivelmente pela fisiologia do hospedeiro. Entretanto a troca de hospedeiro pode enfraquecer esses links evolutivos. Além de que algumas espécies podem infectar

hospedeiros entre pouca ou grande distância filogenética. A similaridade entre parasitas geralmente diminui com o aumento da distância geográfica entre as populações de hospedeiros (Garcia et al, 2011).

O número de estudos filogenéticos de tripanossomas de peixes tem aumentado nos últimos anos, estes focados em parasitas coletados diretamente do sangue de peixes europeus, africanos e asiáticos. Os resultados mostram que os estudos moleculares e filogenéticos são necessários para a identificação dos tripanossomas de peixes brasileiros (Lemos et al, 2015).

Existe uma crescente evidência de que as histórias evolutivas de hospedeiros e parasitas estão associadas e, conseqüentemente os parasitas podem servir como representantes para entender a história evolutiva. Filogeografia comparativa e biogeografia de hospedeiros e seus parasitas obrigatórios podem revelar as impressões deixadas em espécies contemporâneas, de processos evolutivos como a co-evolução, dispersão e colonização (Fermino et al, 2013).

Os tripanossomas de peixes constituem um grupo amplamente distribuído, porém, está entre os menos estudados do gênero *Trypanosoma*. Embora estes tripanossomas apresentem um grande número de espécies hospedeiras e, desta forma, sejam amplamente distribuídos no mundo, apenas poucos isolados foram analisados em estudos filogenéticos.

Informações mais confiáveis sobre a diversidade de tripanossomas de peixes e seu relacionamento com tripanossomas de outros hospedeiros necessitam da análise de um grande número de isolados, de diferentes regiões e hospedeiros, com a utilização de diversos métodos de análise de polimorfismos e filogenia, baseados em genes e seqüências distintas.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos sobre tripanossomas de peixes se restringe a descrições morfológicas. Embora os parâmetros taxonômicos tradicionais, tais como morfologia e hospedeiro de origem, sejam insuficientes, estes são ainda adotados na classificação e pouco se conhece sobre variabilidade genética, posicionamento taxonômico e filogenia desses tripanossomas. Um aspecto muito peculiar e interessante desses tripanossomas é a transmissão de suas espécies por sanguessugas (vetores aquáticos).

As diferentes análises filogenéticas geraram controvérsias sobre o posicionamento desse grupo nas filogenias do gênero *Trypanosoma*. Não existem informações sobre a diversidade morfológica e molecular, relacionamentos genéticos e filogenia de tripanossomas de peixes sul-americanos, onde se concentra grande parte da diversidade desses hospedeiros.

Portanto, considerando que existem poucos estudos sobre tripanossomas de peixes brasileiros e que a diversidade genética, filogenia e taxonomia dos tripanossomas de peixes em geral são aspectos ainda pouco explorados e bastante controversos, novos estudos nessa área são de grande importância. Com base nesses dados um estudo molecular poderia alterar o número de espécies, além de confirmar possíveis novas espécies.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Caracterizar, baseando-se em dados morfológicos e morfométricos, as diferentes formas de *Trypanosoma* observadas em infecções naturais de hirudíneos e peixes do gênero *Hypostomus*.
- Caracterizar por técnicas moleculares os exemplares de *Trypanosoma* encontrados no sangue dos cascudos e hirudíneos vetores em infecções naturais.
- Determinar graus de relacionamento genético e inferir relações filogenéticas entre tripanossomas encontrados neste estudo e isolados de outras regiões do mundo, e entre espécies de tripanossomas de outras espécies de peixes e hirudíneos, com base na sequência dos genes V7V8 (SSU rDNA) e gGAPDH.
- Analisar padrões filogenéticos dos tripanossomas e dos respectivos peixes hospedeiros.
- Identificar os hospedeiros invertebrados dos tripanossomas de peixe.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta

As coletas foram realizadas no Rio Mogi-guaçu, (Figura 4 (A)) Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP (21°55'55"S e 47°22'37"W) (Figura 4 (B)).

Os parâmetros indicadores de qualidade de água foram: Coloração marrom, a quantidade de oxigênio dissolvido variou entre 6 a 9mg/L (padrão CONAMA >5), pH entre 6 a 8U. pH (padrão CONAMA 6 até 9), temperatura da água entre 20,1°C a 29,1°C (sem padrão). Para os parâmetros ecotoxicológicos o rio é considerado não tóxico. Em relação aos parâmetros físicos e químicos, não atenderam os padrões de qualidade da resolução CONAMA em três parâmetros: alumínio dissolvido, ferro dissolvido e fósforo total. Os padrões hidrobiológicos (nível de clorofila-a e feofitina-a) e microbiológicos (Número de unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli*) estão dentro da normalidade exigida pela resolução.



A

B

Figura 4: Rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP. A: Vista da barragem . B: Local da coleta.

Coleta de peixes

Três espécies de *Hypostomus* (Figura 5, Figura 6 e Figura 7) foram coletados mensalmente, entre agosto de 2012 e junho de 2014.



Figura 5: Exemplar de *Hypostomus strigaticeps*.



Figura 6: Exemplar de *Hypostomus regani*.



Figura 7: Exemplar de *Hypostomus albopunctatus*.

Os peixes foram coletados com auxílio de tarrafas e mantidos em tanques circulares de 1000 L (Figura 8 A)), e ou em tanques retangulares de 5000L (Figura 8 B)) no Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEPTA/ICMBio. Em seguida foi realizada a biometria antes da coleta de sangue. Após a coleta de sangue, os peixes amostrados foram devolvidos ao rio.



Figura 8: Tanques de manutenção do CEPTA/ICMBIO. A: Tanques circulares. B: Tanques retangulares.

Coleta de Hirudíneos

Os ectoparasitas foram coletados em ambiente natural, retirados da superfície externa dos peixes com auxílio de pinça (**Figura 9**). Alguns exemplares foram distendidos em concentrações crescentes de etanol, fixadas em tampão de formol 10% e depois conservados em etanol 70%, para posterior identificação e dissecação para procura de formas tripomastigotas no tubo digestório (Moser et al, 2006). Outros hirudíneos foram mantidos vivos para diferentes finalidades: criação em laboratório para obtenção de gerações livres de infecção, para análises moleculares, preparações histológicas e preparações em microscopia eletrônica de varredura.

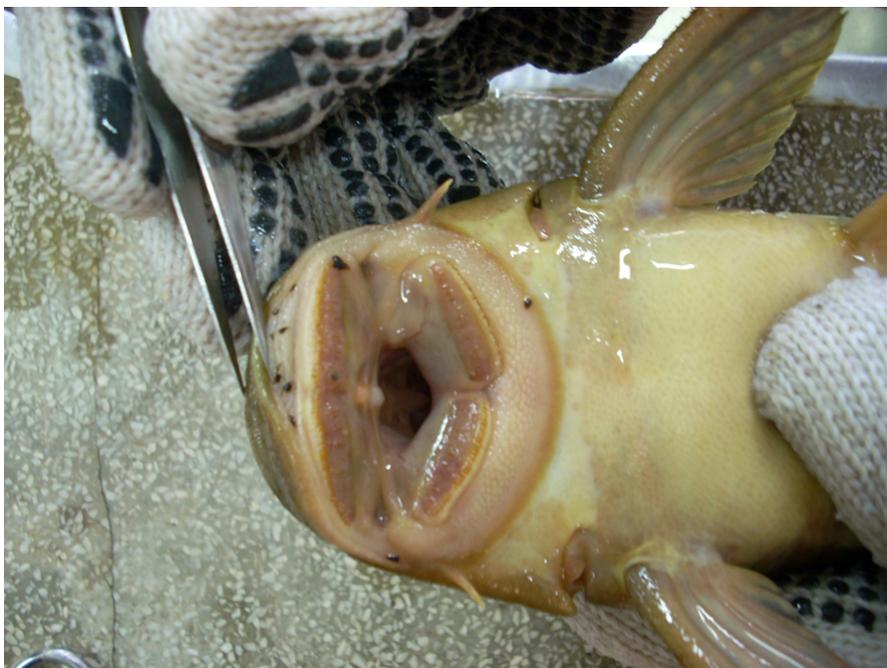


Figura 9: Hirudíneos na superfície externa do cascudo.

Criação e Manutenção de hirudíneos

Para a manutenção, os hirudíneos foram colocados em recipientes pequenos com água de clorada, à temperatura ambiente e alimentados com fígado de camundongo (fragmentos de fígado fresco adicionados ao aquário duas vezes por semana, por períodos de uma a duas horas, e na sequência efetuada a troca da água do recipiente). Seguindo Letch (1979, 1980), os hirudíneos foram mantidos junto ao progenitor até o momento do primeiro repasto sanguíneo. Assim os jovens foram retirados do ventre da

sanguessuga adulta com um pincel macio (Letch, 1979) e separados em dois grupos, o primeiro mantido em aquários para obtenção de gerações futuras, o segundo grupo para se alimentar de peixes infectados obtidos em ambiente natural.

Alguns hirudíneos adultos foram preparados para identificação por análise morfológica.

Histologia

As sanguessugas foram fixadas em formol 10%. As amostras fixadas passaram pelo processo de desidratação, utilizando álcool etílico em concentrações crescentes (70°GL, 80°GL, 90°GL e Absoluto), em seguida foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

O material embocado foi cortado em micrótomo, com espessura de 5µm. As laminas foram desparafinadas, coradas com Hematoxilina e Eosina e montadas em bálsamo do Canadá.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As sanguessugas foram colocadas em tubos cônicos e preparadas para exame sob microscopia eletrônica de varredura:

- Lavagem com tampão cacodilato, por 30min (3x10')
- Fixação em glutaraldeído 2,5% por 24horas.
- Segunda lavagem com tampão cacodilato, por 30min (3x10')
- Fixação com tetróxido de ósmio por 1 hora.
- Terceira lavagem com tampão cacodilato, por 30min (3x10').

Após essas etapas as amostras passaram pelo processo de desidratação em ordem crescente de álcoois do 50°GL a Absoluto com 30min de duração para cada álcool. As amostras, após a desidratação, foram submetidas ao ponto crítico, montagem em stubs, metalização em ouro e análises ao Microscópio Eletrônico de Varredura.

Esfregaço Sanguíneo

O sangue dos peixes foi obtido, por de punção cardíaca (**Figura 10**) com auxílio de uma seringa de 1mL. Foram retiradas cinco alíquotas de 5µl com

as quais foram confeccionadas cinco lâminas de extensão em camada delgada, que foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa para pesquisa de flagelados.



Figura 10: Punção cardíaca em *Hypostomus strigaticeps*.

Análise Morfométrica

Para avaliação das características morfológicas das formas tripomastigotas, imagens dos parasitas foram capturadas em fotomicroscópio através do programa Leica Image Manager IM 50[®], e medidas (Figura 11) seguindo os parâmetros: 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). Para o estabelecimento do índice flagelar (IF), índice nuclear (IN), do volume nuclear (VN) e volume do cinetoplasto (VK) foram utilizadas fórmulas segundo Lopes et al (1989) e Eiras et al (1990).

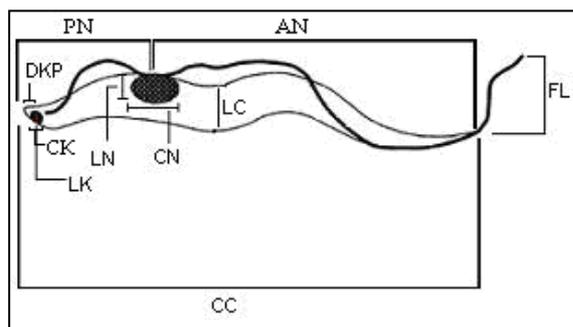


Figura 11: CC: comprimento total do corpo (sem flagelo), FL: comprimento do flagelo livre, PN: distância da extremidade posterior ao núcleo, AN: distância da extremidade anterior ao núcleo, LC: Largura do corpo, LN: largura do núcleo, CN: comprimento do núcleo, LK: largura cinetoplasto, CK comprimento do cinetoplasto, DKP: distância do cinetoplasto à extremidade posterior.

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.

Cultura dos parasitas

Foi testado o meio proposto por Ahmed et al (2014) para o cultivo das formas tripomastigotas sanguíneas.

Foram feitas quatro coletas para os experimentos de cultura, sendo utilizados 18 peixes, seis exemplares de cada espécie. Tubos falcon de 15 mL contendo 1mL de meio de cultura LIT foram levados para o campo, já refrigerados. Antes da utilização, os tubos contendo meio foram deixados à temperatura ambiente e nesses foram inoculados o mesmo volume de sangue (1mL) de peixes, retirado por punção cardíaca. Os tubos foram lacrados e mantidos à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório onde foram armazenados em estufa com temperatura controlada de 25°C. A cada quatro dias os meios contendo os parasitas foram examinados e foram feitas lâminas para pesquisa de evidência de divisão dos parasitas.

Análise Estatística

A prevalência e a densidade foram calculadas segundo os critérios definidos por Bush et al (1997).

Foi realizado o teste qui-quadrado para verificar a associação entre as três espécies de peixes e as variáveis: ano de coleta e estação do ano.

Depois foram calculadas as estatísticas descritivas das variáveis peso e comprimento dos peixes, esses valores foram relacionados com a prevalência de infecção dos peixes, e utilizados para comparar as diferenças entre os parâmetros morfométricos entre as espécies de peixes.

Com os testes prontos foi ajustado um modelo de regressão logística para a probabilidade da prevalência (positividade diferente de 0). O modelo foi testado para as variáveis: Ano de coleta, estação do ano, peso e comprimento dos peixes.

Foi realizado o teste ANOVA para cada variável morfológica (CC, FL, PN, AN, LC, LN, CN, LK, CK, DKP, IF, IN, VN, e VK), utilizando uma transformação em Log para achar a normalidade. Para as variáveis com resultados significativos para diferenciar as espécies obtidos no ANOVA, foi aplicado o teste comparação múltipla de Tukey com intervalo de confiança de 5%.

Análise multivariada (Johnson & Wichern, 2007) foi realizada utilizando PCA (Análise de componentes principais) e análises Cluster. Devido a alta porcentagem de valores faltantes (>50%), as variáveis (FF, IF, DKP) foram excluídas da análise multivariada. Para obter uma melhor aproximação do normal, uma transformação em log de todas as variáveis foi utilizada. É importante dizer que cada componente é uma combinação linear de todas as variáveis originais, em qual todos os componentes são independentes.

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., 9.3).

Extração do DNA

O DNA foi obtido de amostras de sangue fixados em etanol absoluto e armazenados à temperatura ambiente, e de hirudíneos inteiros coletados dos peixes.

Parte do sangue coletado dos peixes foi utilizado para extração do sangue total seguindo protocolo segundo Hamilton et al (2004).

Inicialmente, coletava-se um pouco do sangue total e o conteúdo era centrifugado a 13000rpm por 5 minutos. Era então descartado o etanol do tubo e adicionado 200 µL de Digsol Buffer (50mM de TRIS-HCL, 200mM EDTA, 117mM NaCl 1% SDS), e 10 µL de Proteinase K, o tubo então era homogeneizado e incubado por 3 horas a 55°C. Após a incubação acrescentava-se 400 µL de acetato de amônia (solução 4M) e o tubo era levado ao vortex por 15 minutos. Depois disso o material era centrifugado a 13000rpm por 15 minutos à temperatura de 10°C, logo após o sobrenadante era transferido para outro tubo onde eram adicionados 1ml de etanol 100% homogeneizava-se o tubo. Após essa etapa a amostra passava por centrifugação à 15000rpm por 15 minutos e então o etanol era descartado e era acrescentado 1ml de etanol 70% e centrifugado novamente à 15000rpm por 15 minutos, após isso o etanol era descartado e o tubo era deixado para secar em temperatura ambiente por 2 dias e finalmente era adicionado 30 µL TE (TRIS-HCL e EDTA).

Foram coletados hirudíneos presentes na superfície do corpo e na região oral dos cascudos para extração do DNA utilizando o mesmo método referido para extração de sangue, com diferença apenas na primeira etapa, no caso das sanguessugas estas foram primeiramente maceradas.

Foram utilizados 34 peixes para os experimentos moleculares sendo (8 *H. strigiceps*, 12 *H. albopunctatus* e 14 *H. regani*) e as sanguessugas retiradas desses peixes.

Amplificação do DNA

Nas reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 200mM de dNTP; 100ng de cada oligonucleotídeo; 100ng de DNA genômico; 5µl de tampão (200mM de Tris-HCl, pH 8.4; 500mM de KCl e 1,5mM de MgCl₂); 2,5u de Taq DNA Polimerase e água bidestilada deionizada e autoclavada (qsp 50ul).

Foram utilizados os marcadores V7V8 do SSU rRNA e gGAPDH para identificação de tripanossomas em hirudíneos e no sangue dos peixes. A amplificação do marcador LCO/HCO (COI), foi feita apenas para as amostras

de hirudíneos, para identificação das mesmas.

PCR da região SSU rRNA foi feita utilizando os primers (609F) 5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C3' e (706R) 5' CTG AGA CTG TAA CCT CAA 3' (Noyes et al, 1999).

Nested PCR da sequência gGAPDH foi feita utilizando primeiro round de primers (GAPDH SF) 5' GTG GCG GTK GTY GAC ATG AAC A3' e (GAPDH SR) 5' TTG GAG TCR TAG ATR GAG CT3', e o segundo round de primers internos (GAP 3F) 5' GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3' e (GAP 5R) 5' CCG AGG ATG YCC TTC ATG 3'.

PCR da região LCO/HCO foi feita utilizando os primers (LCO1490F) 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G3' e (HCO2198R) 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'.

De 2 a 5µl do produto da reação foram aplicados em gel de agarose 2% com tampão TAE 2x, utilizando-se o marcador de peso molecular 1Kb, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V. As condições para a amplificação do gene foram diferentes para cada região:

Programa PCR GAPDH- desnaturação inicial a 94^oC por 3 minutos, seguido de mais 35 ciclos com desnaturação (94^oC por 1'), anelamento (55^oC por 1') e extensão (72^oC por 1') e finalmente extensão final a 72^oC por 10 minutos.

Programa PCR V7V8- desnaturação inicial a 94^oC por 5 minutos, seguido de mais 35 ciclos com desnaturação (94^oC por 45"), anelamento (48^oC por 45") e extensão (72^oC por 1') e finalmente extensão final a 72^oC por 7 minutos.

Programa PCR LCO/HCO - desnaturação inicial a 94^oC por 5 minutos, seguido de mais 30 ciclos com desnaturação (94^oC por 45"), anelamento (48^oC por 45") e extensão (72^oC por 1') e finalmente extensão final a 72^oC por 7 minutos.

Purificação, Clonagem e Sequenciamento

O DNA obtido foi clonado e 6 clones foram sequenciados para cada gene, de cada amostra de *Trypanosoma*. A clonagem foi feita utilizando o kit: pGEM® -T and pGEM -T Easy Vector System (Promega), de acordo com protocolo do fabricante.

As amostras foram purificadas utilizando o kit: Wizard® Plus SV minipreps DNA purification System (Promega).

O sequenciamento foi realizado no ICBII– USP (setor de sequenciamento 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.

Filogenia

Para inferências filogenéticas utilizando análises de Máxima Verossimilhança (ML), as sequências foram alinhadas utilizando CLUSTALX (Thompson et al, 1997). Dois alinhamentos foram criados, um contendo a região V7V8 da SSU rRNA (820 pb), um contendo a região gGAPDH (608 pb), utilizando alinhamentos prévios incluindo um grande número de taxons como guia (Hamilton et al, 2004). As análises ML foram feitas utilizando RAxML v.2.2.3 (Stamatakis, 2006) como descrito anteriormente (Ferreira et al, 2008, Borghesan et al, 2013). O GTR (general time reversible) modelo de substituição de nucleotídeos com a proporção de invariáveis e a distribuição Gamma foram escolhidos para as análises genéticas. O modelo GTR foi utilizado em cada análise individual.

As porcentagens de similaridade foram calculadas no programa MEGA5 (Tamura et al, 2011) pelo método de distância p.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Atual CEUA/Unicamp) sob protocolo N°2786-1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados, entre agosto de 2012 e setembro de 2014, 433 exemplares de três espécies de cascudos, sendo 138 *Hypostomus albopunctatus* (peso médio $301,5 \pm 72,1$ g e comprimento médio $26,4 \pm 2,2$ cm), 160 *Hypostomus regani* (peso médio $297,5 \pm 69,8$ g e comprimento médio $28,5 \pm 2,9$ cm) e 135 *Hypostomus strigaticeps* (peso médio $289,0 \pm 85,4$ g e comprimento médio $28,2 \pm 2,7$ cm). Dos 433 peixes examinados, 338 estavam positivos para *Trypanosoma* sp., equivalendo a uma prevalência geral de 78,0%, sendo 76,0% para *Hypostomus albopunctatus*, 80,0% para *Hypostomus regani* e 77,0% para *Hypostomus strigaticeps*. A densidade média de tripanossomas presentes no esfregaço sanguíneo foi de 0,8 parasitas/ μ l de sangue.

Existem poucos trabalhos relatando prevalência e parasitemia de tripanossomas em sangue de peixes. Molina et al (2016) em trabalho anterior relataram prevalências mais baixas para as mesmas espécies de peixes, assim como uma menor prevalência geral (47,6%). As prevalências relatadas por Lemos et al (2015) para *Hypostomus affinis* (100%) e *Hypostomus luetkeni* (90%), encontradas no mesmo gênero de hospedeiro, foram maiores do que as encontradas no presente estudo. Quando comparada com descrições de prevalências encontradas em outras famílias de hospedeiro, os valores do presente estudo são maiores que os valores encontrados por Khan (1977) em peixes do Atlântico Norte – *Hippoglossoides platessoides* 26%, *Limanda ferruginea* 11%, *Glyptocephalus cynoglossus* 11%, *Lycoides 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%), semelhante do que Zintl et al (1997) encontraram em enguias européias (*Anguilla anguilla* – 77,7%) maior do que os resultados de Davies et al (2005) em peixes de água doce da África (53%).

Em relação à densidade, os valores relatados nesse trabalho mostraram que 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). Lemos et al (2015) relataram uma parasitemia de $0,9 \times 10^2$ parasitas/ml de sangue para *Hypostomus affinis* e $1,0 \times 10^2$ parasitas/ml de sangue para *Hypostomus luetkeni*, resultados maiores do que o encontrado no presente estudo. Amostras de sangue obtidas do coração e/ou rins podem garantir uma sensibilidade maior na detecção de tripanossomas de peixes, isso pelo fato de serem os sítios de infecção mais comuns destes parasitas (Lemos et al, 2015).

A literatura sobre descrição de espécies de *Trypanosoma* em Loricariidae é extensa, mas são poucas as referências de prevalência ou densidade destes protozoários em seus hospedeiros (Molina et al, 2016). Além da diferença de hospedeiros, fatores físicos, químicos e biológicos da água bem como a disponibilidade do hospedeiro invertebrado podem explicar essas diferenças nos valores de prevalência e densidade.

No presente estudo apesar da alta prevalência encontrada nenhuma patologia aparente foi observada nos peixes coletados.

Foi calculado o qui quadrado entre as prevalência das três espécies de peixes e as estações do ano e entre o ano de coleta. Para a variável estação do ano, não foram encontradas correlações significativas. Para a variável ano de coleta foram encontrados valores significativos para *Hypostomus regani* e *Hypostomus strigaticeps* (Tabela 1). Os resultados obtidos com esse teste confirma o obtido com o modelo.

Tabela 1: Valores de p para Qui-quadrado, entre as a prevalência das três espécies de peixes e as variáveis, estação do ano e ano de coleta.

Espécie de Peixe	Ano de coleta	Estação do ano
<i>H. strigaticeps</i>	P= <0,0001	P= 0,3830
<i>H. regani</i>	P= 0,6616	P=0,9671
<i>H. albopunctatus</i>	P= 0,0004	P=0,0481

As análises de estatísticas descritivas para as variáveis peso e comprimento não encontraram resultados significativos, observando os valores encontrados das médias, máximo e mínimo dos valores biométricos é possível concluir que não existe relação entre os dados morfométricos dos peixes e a prevalência de infecção (Tabela 2).

Tabela 2: Valores das estatísticas descritivas das variáveis peso e comprimento, relacionadas com a prevalência de infecção.

Espécie	Preval	N Obs	Variável	Médias	DP	Mínimo	Máximo
<i>H. strigaticeps</i>	0	31	C	28,00	2,27	22,40	32,00
	0	31	P	301,45	64,50	178,00	414,00
	1	104	C	27,41	2,69	20,00	36,50
	1	104	P	276,01	74,82	104,00	537,00
Espécie	Preval	N Obs	Variável	Média	DP	Mínimo	Máximo
<i>H. regani</i>	0	40	C	29,73	2,79	24,50	37,00
	0	40	P	317,13	80,92	210,00	591,00
	1	128	C	29,28	3,13	21,00	35,80
	1	128	P	308,59	85,74	95,00	567,00
Espécie	Preval	N Obs	Variável	Média	DP	Mínimo	Máximo
<i>H. albopunctatus</i>	0	29	C	28,09	4,51	12,20	33,00
	0	29	P	288,17	72,12	100,00	396,00
	1	105	C	28,74	2,80	21,00	36,50
	1	105	P	299,37	68,13	95,00	537,00

Onde: (0) caracteriza prevalência negativa e (1) prevalência positiva, (C) variável comprimento e (P) variável peso.

Esses resultados ajudam a suportar a hipótese que a prevalência da infecção depende mais de fatores como a disponibilidade de vetor e não das características do hospedeiro. Existem poucos relatos de comparação de prevalências com características biométricas do hospedeiro, Molina et al (2016) também não encontraram relações significativas entre a prevalência e os valores morfométricos para as mesmas espécies de peixes.

Os resultados obtidos com o modelo de regressão logística para as quatro variáveis, apresentaram valores significativos apenas para a variável ano de coleta, os valores foram significativos apenas para *Hypostomus strigaticeps* e *Hypostomus albopunctatus*, confirmando o resultado do teste qui-quadrado. Para *Hypostomus strigaticeps* observou-se que a razão de chance de ser positivo foi de 5,7 vezes maior em 2012 do que em 2014 e 9,0 vezes maior de ser positivo em 2013 do que em 2014. Para a espécie *Hypostomus albopunctatus* a relação foi inversa, ou seja, foi obtida uma razão de chance de 15,6 vezes maior de os peixes serem positivos em 2014 do que em 2012 e 6,84 vezes maior que em 2013. Esses resultados podem sugerir a ocorrência de eventos externos específicos (temperatura,

disponibilidade de vetor, bem como suscetibilidade do hospedeiro). Zintl et al (1997) já haviam relatado que flutuações na parasitemia podem ocorrer possivelmente por fatores locais como alterações nas populações de hirudíneos e mudanças bruscas na temperatura ou migração do hospedeiro vertebrado. Khan (1982), 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 (*Johanssonia arctica*).

No período correspondente foram coletados hirudíneos para a manutenção em laboratório. No total foram coletados 85 exemplares. Nenhuma nova geração de hirudíneos (F2) foi obtida. As sanguessugas de coletas posteriores foram fixadas para histologia e para análises moleculares. Foram encontrados hirudíneos aderidos a boca (Figura 12), nadadeiras e brânquias com prevalência geral de 25,3%.



Figura 12: Hirudíneos aderidos a boca de *Hypostomus strigaticeps*.

As sanguessugas foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura e os resultados poderão auxiliar na identificação da espécie (Figura 13).

A sanguessuga encontrada foi a mesma para as três espécies de peixes. Foi sequenciado o gene COI e comparando com as sequências já

descritas no banco de dados mundial GenBank foi possível identificar apenas o gênero, *Haementeria*, e pelo método molecular usado (barcoding) sugere ser uma espécie nova.

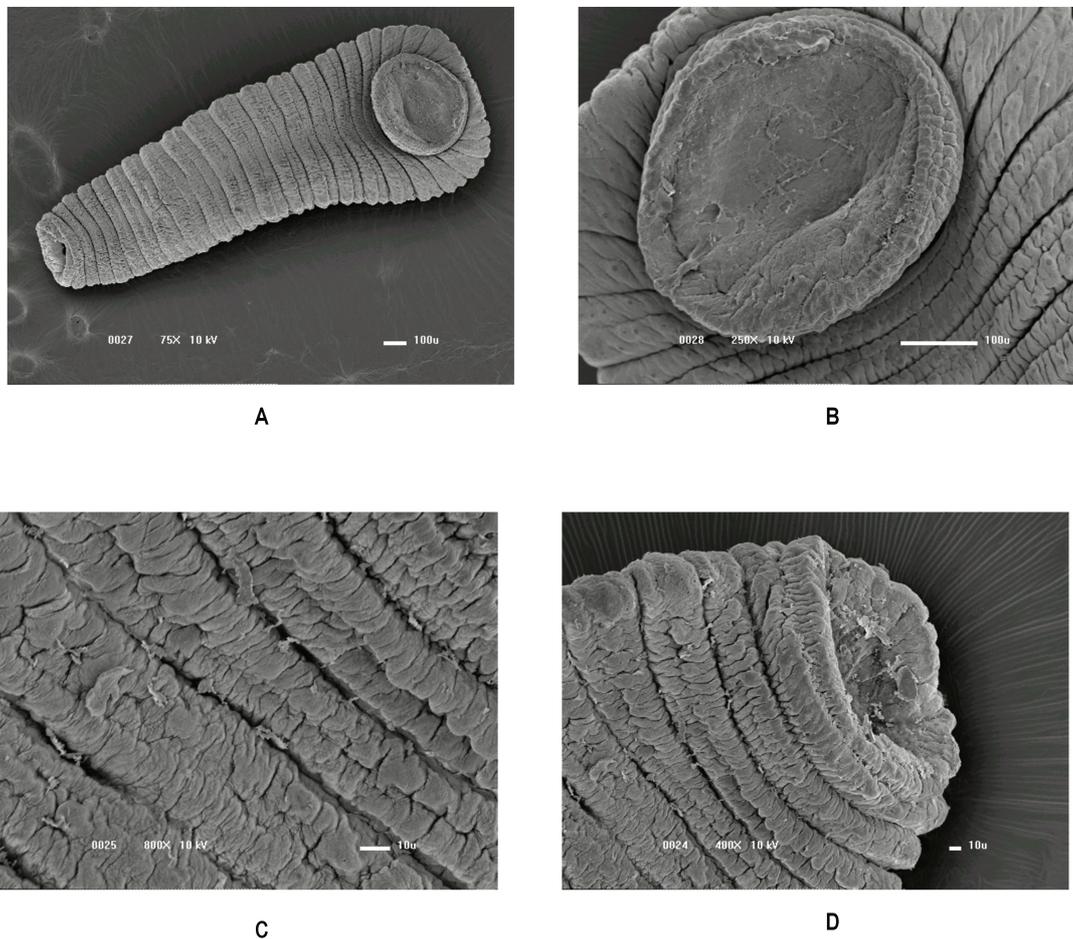


Figura 13: MEV de sanguessugas encontradas em *Hypostomus*. (A) visão ventral, (B). Ventosa posterior, (C) Detalhe do tegumento, (D) Região anterior.

Estudos anteriores examinando sanguessugas, as formas esferomastigotas foram observadas no sistema digestivo, e as formas epimastigotas no intestino, enquanto as formas tripomastigotas metacíclicas aparecem na probóscide após a digestão sanguínea. Porém estudos sobre a migração dos tripomastigotas de peixes em hirudíneos ainda geram dúvidas (Khan, 1978; Jones & Woo, 1991, 1992).

Cortes histológicos de hirudíneos (Figura 14Figura 15) sugerem a presença de ninho de amastigota. Em estudo anterior Lemos et al (2015)

observaram formas epimastigotas no ceco estomacal e intestino de *Haementeria brasiliensis*.

A importância desse achado auxilia na confirmação dos hirudíneos como hospedeiros, evidenciando o local onde as divisões dos tripanossomas ocorrem, já que não são encontradas outras formas nos peixes, apenas tripomastigotas.

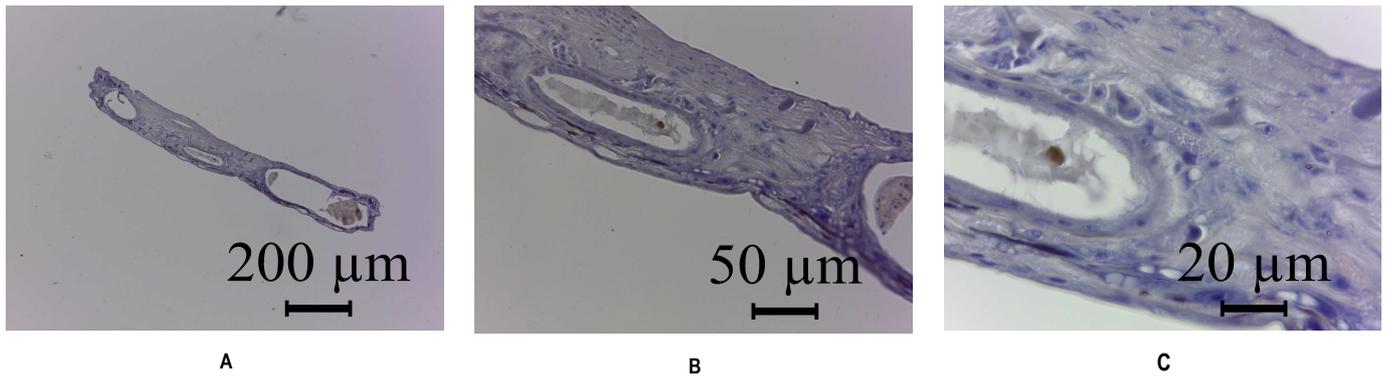


Figura 14: Cortes histológicos de sanguessugas, espessura 5 micra, coloração por hematoxilina-eosina. (A) corte transversal, aumento 10x. (B) corte transversal, aumento 40x. (C) corte transversal, aumento 100x.

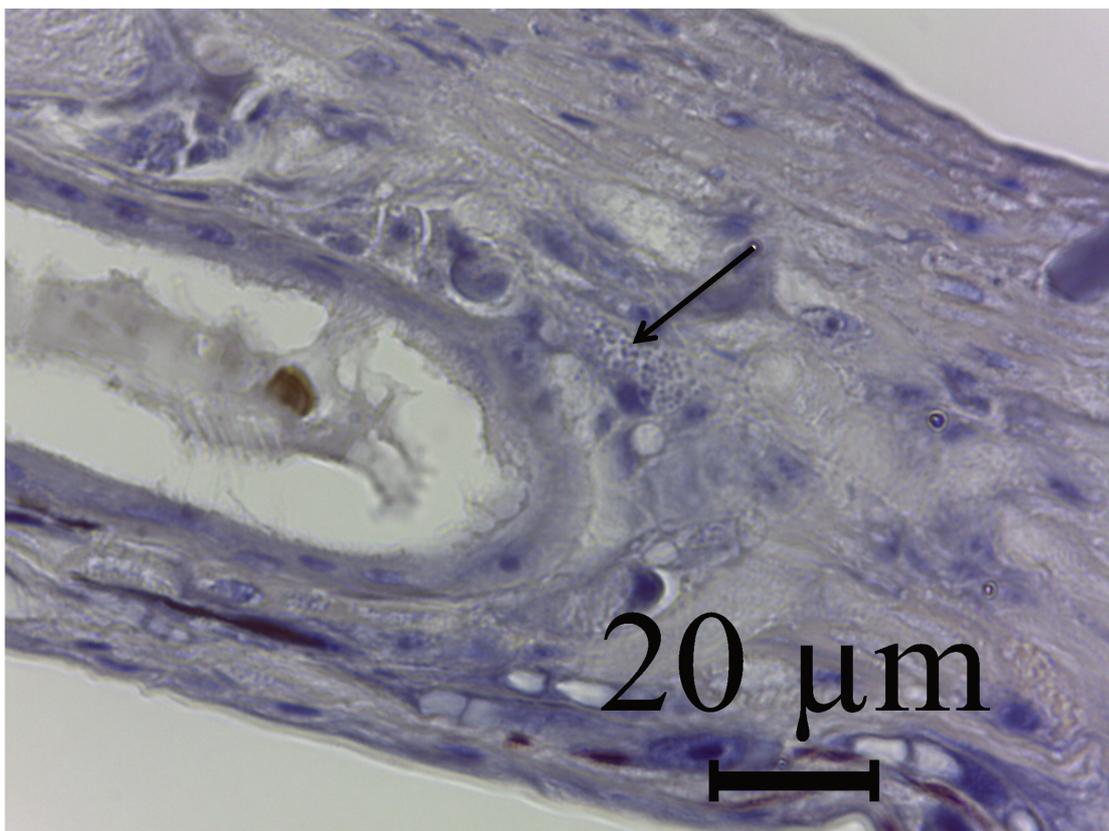


Figura 15: Corte histológico transversal de hirudíneo evidenciando ninho de amastigota.

Nos experimentos de cultura, os flagelados do sangue de peixes se mantiveram vivos, mas não foram observadas mudanças de forma, nem multiplicação.

Foram feitas culturas de tripanossomas em 4 coletas: março, maio, junho e julho de 2014. A primeira com 12 tubos contendo o meio LIT, sendo 4 tubos para cada uma das três espécies de peixes. Desde a primeira até a quinta semana, não foram observados parasitas, apenas células de sangue.

Na segunda cultura foram utilizados 30 tubos com o meio LIT, 10 para cada espécie de peixe, sabidamente positivos pelo exame de sangue a fresco. Apenas 4 tubos, todos correspondendo a *H. regani* apresentaram parasitas, 2 com movimento intenso e outros 2 com pouco ou nenhum movimento. Em exame de 10 μl de cultura dos 4 tubos, foram contados 8, 3, 9, e 6 parasitas na primeira semana de cultura. Nas 4-5 semanas subsequentes não foram observadas modificações expressivas.

Na terceira cultura em meio LIT foram utilizados 6 tubos, 2 para cada espécie de peixe sabidamente positivos. Dois tubos de *H. regani* mostraram

parasitas vivos, com grande movimentação, com 35 e 22 espécimes em 10µl, respectivamente. Estes tripomastigotas mantiveram-se nesta forma nas 3 semanas seguintes. Nesta terceira cultura houve contaminação por bactéria e tratados com antibióticos, os parasitas não sobreviveram.

Na quarta tentativa foram utilizados 18 tubos contendo o meio de cultura proposto, 6 tubos para cada espécie de peixe. O mesmo padrão das outras tentativas foi observado, foram encontrados parasitas vivos nos tubos, nas primeiras semanas, porém nas subseqüentes não foi observada a divisão dos tripanossomas, até a morte dos mesmos.

As formas sanguíneas de *Trypanosoma* de peixes caracteristicamente se multiplicam por divisão binária, em dois tripomastigotas iguais, e geralmente em formas epimastigotas nos meios de cultura. O produto final do metabolismo de protozoários consiste em dióxido de carbono, piruvato, uréia e amônia (Bryant, 1982; Larsen et al, 1988). Esses “metabólitos” são tóxicos aos parasitas e são responsáveis pela lise dos flagelados e pela formação de formas arredondadas (Li & Woo, 1991). Isso ocorre primeiramente porque as culturas se tornam pobres nutricionalmente e também por esses resíduos se acumularem no meio (Ahmed et al, 2014).

Sessenta tripomastigotas foram fotografados e medidos com auxílio do fotomicroscópio, sendo, 20 de cada espécie de peixe do presente estudo. Na Tabela 3 encontram-se as médias dos parâmetros de mensuração morfológica dos parasitas. A identificação taxonômica tradicional das espécies de tripanossomas de peixes baseada nas características morfológicas dos parasitas, traz diversos problemas e divergências associado ao polimorfismo.

Tabela 3: Valores (em µm) da média das medidas dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos, entre agosto de 2012 e setembro de 2014.

Espécie	CC	FL	PN	AN	LC	LK	LN	CN	IN	AN	DKP	CK	AK	IF	VN	VK
<i>Hypostomus albopunctatus</i>	22,02	7,70	10,13	9,30	1,96	0,61	1,43	2,55	1,71	4,07	0,45	1,02	0,55	2,90	5,64	0,28
<i>Hypostomus Regani</i>	20,60	15,45	11,32	6,89	1,94	0,58	1,59	2,34	1,88	4,72	0,33	0,95	0,52	1,95	5,79	0,24
<i>Hypostomus strigaticeps</i>	20,10	11,70	10,20	7,20	1,93	0,63	1,50	2,70	1,78	4,08	0,41	0,97	0,65	2,87	5,82	0,29

Comprimento do corpo (CC), flagelo livre (FL), distância da parte posterior ao núcleo(PN), distância da parte anterior ao núcleo(AN), Largura do corpo (LC), largura do núcleo(LN), comprimento do núcleo (CN), área do núcleo (AN), largura do cinetoplasto (LK), comprimento do cinetoplasto (CK), índice nuclear (IN), volume do núcleo (VN).

Os tripomastigostas sanguíneos encontrados em *H. regani*, *H. strigaticeps* e *H. albopunctatus* se mostraram polimórficos, sendo que o número e a proporção dos morfotipos variaram entre as amostras de sangue.

A variação morfológica observada, se utilizada como único critério taxonômico, poderia suportar a descrição de um número errado de espécies nessas amostras. Uma possibilidade seria que os diferentes morfotipos encontrados possam representar distintos estágios de desenvolvimento da mesma espécie.

O pleomorfismo se caracteriza pela 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 aparece 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 de estrias na superfície do corpo, na presença e no número de vacúolos citoplasmáticos, na distância do cinetoplasto da parte posterior, no comprimento do flagelo livre (Lom, 1979).

Diferente dos resultados obtidos por Molina et al (2016), que encontraram diferenças significativas para o comprimento do corpo e a largura do núcleo, as análises estatísticas do presente estudo mostraram que apenas para os parâmetros LK e VK existiram diferenças significativas (com intervalo de significância de 0,05 de Tukey) entre as espécies, onde *Hypostomus strigaticeps* e *Hypostomus albopunctatus* ficaram iguais (agrupado) e *Hypostomus regani* apareceu diferente. Os valores diferentes encontrados para as mesmas espécies de peixe confirma a hipótese de que os parâmetros morfológicos das formas tripomastigotas do sangue dos peixes são fatores fracos para a diferenciação dos parasitas, considerando o alto pleomorfismo (Figuerola et al, 1999; Karlsbakk & Nylund, 2006; Gu et al, 2007a; Gu et al, 2007b).

Testes de comparação múltipla foram feitas e os dados não formaram grupos. Na matriz de correlação entre os parâmetros medidos é possível

visualizar de forma clara e imediata, potenciais relações entre os dados. Mostra que os parâmetros analisados não criam relações fortes, ficam relacionados apenas variáveis dependentes (Tabela 4). O resultado obtido com os testes ANOVA foram os mesmos que os resultados obtidos nas análises de componentes principais (PCA). Na Tabela 5 podemos ver que com apenas dois componentes do teste PCA, 66% da variabilidade pode ser explicada.

Tabela 4: Matriz de correlação entre as variáveis morfométricas das formas tripomastigotas sanguíneas encontradas nas três espécies de cascudos.

	logCC	logPN	logAN	logLC	logLK	logLN	logCN	logIN	logArN	logArK	logVN	logVK	logCK
logCC	1,00	0,80	0,79	0,51	-0,11	0,35	0,58	-0,24	0,48	0,03	0,51	0,02	0,20
logPN	0,80	1,00	0,35	0,36	-0,28	0,26	0,39	0,34	0,38	-0,06	0,36	-0,14	0,12
logAN	0,79	0,35	1,00	0,47	0,05	0,38	0,64	-0,76	0,53	0,03	0,55	0,07	0,06
logLC	0,51	0,36	0,47	1,00	0,02	0,73	0,45	-0,23	0,62	0,15	0,67	0,09	0,13
logLK	-0,11	-0,28	0,05	0,02	1,00	-0,07	-0,21	-0,25	-0,22	0,78	-0,15	0,90	0,37
logLN	0,35	0,26	0,38	0,73	-0,07	1,00	0,60	-0,20	0,89	0,09	0,91	-0,05	-0,01
logCN	0,58	0,39	0,64	0,45	-0,21	0,60	1,00	-0,37	0,82	-0,13	0,87	-0,21	-0,15
logIN	-0,24	0,34	-0,76	-0,23	-0,25	-0,20	-0,37	1,00	-0,27	-0,08	-0,31	-0,17	0,03
logArN	0,48	0,38	0,53	0,62	-0,22	0,89	0,82	-0,27	1,00	-0,10	0,96	-0,20	-0,12
logArK	0,03	-0,06	0,03	0,15	0,78	0,09	-0,13	-0,08	-0,10	1,00	-0,01	0,85	0,61
logVN	0,51	0,36	0,55	0,67	-0,15	0,91	0,87	-0,31	0,96	-0,01	1,00	-0,14	-0,08
logVK	0,02	-0,14	0,07	0,09	0,90	-0,05	-0,21	-0,17	-0,20	0,85	-0,14	1,00	0,73
logCK	0,20	0,12	0,06	0,13	0,37	-0,01	-0,15	0,03	-0,12	0,61	-0,08	0,73	1,00

As análises de componentes principais não suportaram a formação de grupos entre as três espécies (Figura 16). As análises multivariadas assim como os resultados das análises de cluster não mostraram a formação de grupos. Nas análises de cluster encontramos 40 grupos de um total de 60 elementos, o que suportou os achados das outras análises.

Tabela 5: Autovalores da matriz de correlação da análise de componentes principais mostrando a porcentagem de explicação da variabilidade dos dados.

Nº de componentes	Autovalores	Diferença	Proporção	Cumulativo
1	5,31	2,03	0,40	40%
2	3,28	1,66	0,25	66%

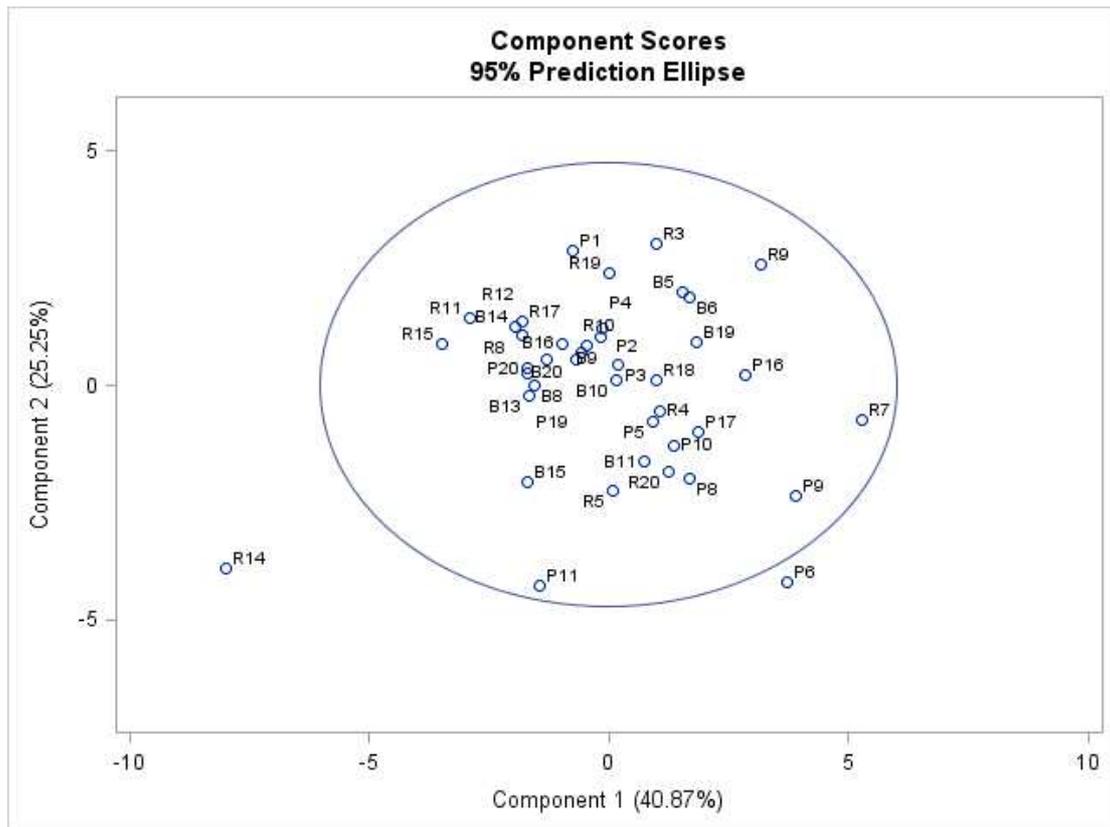


Figura 16: Análises de componentes principais dos parâmetros morfológicos dos tripanossomas encontrados nas três espécies de cascudos entre agosto de 2012 e setembro de 2014, no Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo, Brazil. (*Hypostomus regani* é chamado aqui de (P), *Hypostomus albopunctatus* (R) e *Hypostomus strigaticeps* (B).

Os resultados estatísticos reforçam os resultados moleculares obtidos, onde também não foi encontrada uma divisão por espécie de hospedeiro, em todos os clados formados nas análises filogenéticas observamos a presença de isolados das três espécies de peixes bem como de isolados de hirudíneos retirados desses peixes. Os resultados corroboram o encontrado por Fermino et al (2013, 2015) e Lemos et al (2015), onde os hospedeiros vertebrados abrigam infecções mistas de tripanossomas.

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 (Gibson et al, 2005).

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 reinfecções.

Nas amostras de sangue não foi possível distinguir entre o polimorfismo inter e intra específico e por isso a impossibilidade de atribuir determinado morfotipo para determinada espécie ou genótipo encontrado.

Para facilitar a descrição morfológica dos flagelados sanguíneos, dados morfológicos foram utilizados para dividir os tripomastigotas sanguíneos em três morfotipos, foram escolhidos os parâmetros morfológicos: comprimento do corpo, largura do corpo e tamanho do flagelo livre.

Assim como observado por Lemos et al (2015) os morfotipos apresentados nesse estudo podem representar a mistura de espécies e ou genótipos desses tripanossomas como foi encontrado nas análises das sequências moleculares.

Existe hoje mais de 30 espécies de tripanossomas reportadas em loricariídeos brasileiros, sendo pelo menos 25 em cascudos, incluindo aproximadamente 15 espécies descritas em *Hypostomus* spp (Eiras et al, 2012).

No entanto nenhuma espécie foi descrita em *H. regani*, *H. strigaticeps* e *H. albopunctatus* anteriormente a esse estudo.

Na Tabela 6 estão os valores das médias obtidas dos parâmetros morfológicos, para as formas tripomastigotas do presente estudo e os valores dos parâmetros descritos em outras espécies de peixes, bem como o já relatado para as mesmas espécies de peixes e outros que compartilham o mesmo gênero.

Os morfotipos identificados nas amostras de sangue dos cascudos desse estudo se assemelham amplamente aos flagelados descritos anteriormente em outros cascudos. No entanto, os tripomastigotas encontrados nos sangue dos peixes desse estudo foram no geral menores em comprimento e largura dos que os encontrados em outras espécies de cascudos. Apesar disso, os tripomastigotas encontrados em outras espécies

dividem características morfológicas em comum com pelo menos um dos morfotipos aqui descritos, por exemplo apresentaram valores para comprimento do corpo muito semelhantes a *T. pradoi*, encontrado em uma outra espécie de *Hypostomus*. *T. plecostomi* I também divide formas sanguíneas similares com os morfotipos aqui descritos. O recém descrito *Trypanosoma abeli* (divididos na tabela em 4 morfotipos) encontrados em duas espécies de cascudos apresentaram valores maiores para os parâmetros de comprimento do corpo e largura do corpo.

No geral os parasitas encontrados nas três espécies de peixes estudados apresentaram morfológicamente as seguintes características: polimórficos, citoplasma denso, núcleo elíptico bem visível (**Figura 19** e **Figura 21**), apresentando contornos nítidos, tocando ou não as bordas do corpo e de cromatina frouxa, cinetoplasto terminal nítido (**Figura 20**). O corpo afila-se gradualmente para ambas as extremidades. A membrana ondulante é nítida na maioria dos exemplares, fazendo em alguns casos muitas ondulações (**Figura 21**) e em outros casos o número de ondulações é menor. Foram observados parasitas que apresentaram no final da extremidade anterior um flagelo livre longo (**Figura 19**). Alguns parasitas apresentaram a forma do corpo curta (**Figura 18**) enquanto que outros apresentaram um corpo longo (**Figura 17**).

Tabela 6: 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	Referência
<i>T. nupelianus</i>	17.60	2.18	12.70	13.77	12.10	0.75	0.28	1.20	3.10	1.14	3.96	<i>Rhinelepis aspera</i>	Eiras et al., 1990
Morfotipo 1	20,10	1,93	11,70	10,20	7,20	0,63		1,50	2,70	1,78	5,82	<i>H. strigaticeps</i>	Presente estudo
<i>T. pradoi I</i>	20.20	1.57	8.77	9.63	10.57	0.67	0.67	1.23	2.10	0.91	2.34	<i>Hypostomus ancistroides</i>	Ribeiro et al., 1993
Morfotipo 2	20,60	1,94	15,45	11,32	6,89	0,58	0,24	1,59	2,34	1,88	5,79	<i>H. regani</i>	Presente estudo
<i>T. plecostomi I</i>	21.50	2.30	14.00	12.00	-	0.50	-	2.10	2.90	-	-	<i>Hypostomus</i> sp.	Fonseca & Vaz, 1928
Morfotipo 3	22,02	1,96	7,70	10,13	9,30	0,61	0,28	1,43	2,55	1,71	5,64	<i>H. albopunctatus</i>	Presente estudo
<i>Trypanosoma</i> Morf. I	24.73	1.94	15.45	14.98	8.71	0.58	0.24	1.59	2.96	1.88	5.79	<i>H. regani</i>	Molina et al., 2016
<i>Trypanosoma</i> Morf. II	25.01	1.93	11.70	15.12	9.43	0.63	0.29	1.50	2.81	1.78	5.82	<i>H. strigaticeps</i>	Molina et al., 2016
<i>T. dominguesi</i>	25.50	2.10	9.40	13.70	12.30	0.70	0.18	1.40	3.90	1.10	7.29	<i>Hypostomus alatus</i>	Lopes et al., 1989
<i>T. abeli</i> Morf. 4	28.01	1.58	13.49	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H.luetkeni/ H. affinis</i>	Lemos et al., 2015
<i>Trypanosoma</i> Morf. III	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>	Molina et al., 2016
<i>T. barretoi</i>	36.20	3.87	14.12	19.65	16.65	0.78	0.41	2.65	4.40	1.22	40.37	<i>Hypostomus paulinus</i>	Lopes et al., 1990
<i>T. birmanii I</i>	57.20	3.80	9.40	30.30	26.90	0.90	0.43	2.50	4.90	1.10	27.30	<i>Hypostomus commersonii</i>	Ribeiro et al., 1991
<i>T. affonsoi</i>	57.80	3.60	16.70	30.30	27.50	0.80	0.39	2.80	3.80	1.10	19.60	<i>Hypostomus tietensis</i>	Lopes et al., 1992
<i>T. abeli</i> Morf. 3	61.00	5.5	41.60	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H.luetkeni/ H. affinis</i>	Lemos et al., 2015
<i>T. zungaroi IV</i>	61.50	9.00	0.00	32.00	-	7.00	-	4.50	5.50	-	-	<i>Pseudopmelodus zungaro</i>	Fonseca, 1928
<i>T. abeli</i> Morf. 2	64.57	2.73	21.07	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H.luetkeni/ H. affinis</i>	Lemos et al., 2015
<i>T. limae</i>	66.64	3.81	11.22	39.58	27.05	1.33	0.42	3.40	5.49	1.46	41.52	<i>Hoplias lacerdae</i>	Lopes et al., 1996
<i>T. abeli</i> Morf. 1	67.30	4.08	20.80	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>H.luetkeni/ H. affinis</i>	Lemos et al., 2015
<i>T. venustissimum II</i>	71.50	2.60	3.50	-	-	1.00	-	-	3.00	1.30	-	<i>Plecostomus plecostomus</i>	Froés et al., 1979
<i>T. immanis II</i>	114.50	-	6.00	-	-	0.70	-	-	-	1.20	-	<i>Loricariichthys anus</i>	Froés et al., 1978

Comprimento do corpo (CC), flagelo livre (FL), distância da parte posterior ao núcleo(PN), distância da parte anterior ao núcleo(AN), Largura do corpo (LC), largura do núcleo(LN), comprimento do núcleo (CN), área do núcleo (AN), largura do cinetoplasto (LK), comprimento do cinetoplasto (CK), índice nuclear (IN), volume do núcleo (VN).

Estes achados corroboram o fato de que a morfologia e morfometria não são suficientes para distinguir espécies de tripanossomas de peixes, porém são de extrema importância e relevância e complementam a descrição de qualquer espécie de tripanossoma (Lemos et al, 2015).

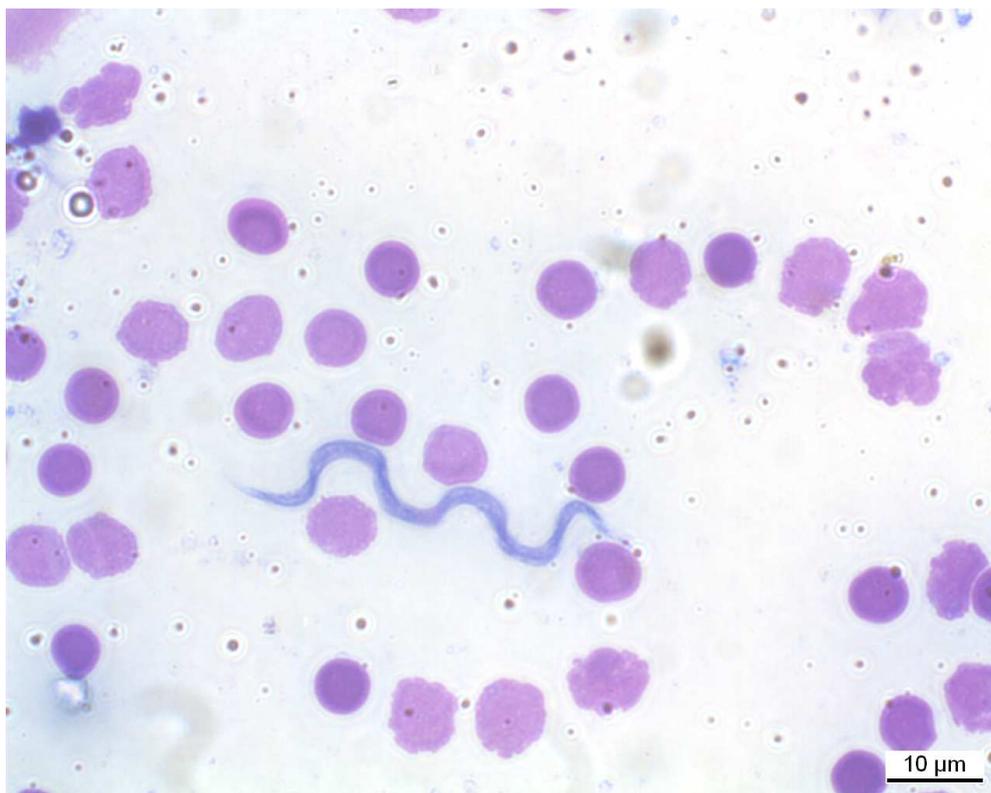


Figura 17: Forma tripomastigota de *Hypostomus strigaticeps* evidenciando comprimento do corpo (longo).



Figura 18: Forma tripomastigota de *Hypostomus strigaticeps* evidenciando comprimento do corpo (curto)



Figura 19: Forma tripomastigota evidenciando flagelo livre (indicado pela seta azul) e núcleo elíptico (indicado pela seta preta). Aumento de 100x.



Figura 20: Forma tripomastigota evidenciando vacúolos citoplasmáticos (indicados pelas setas verdes) e cinetoplasto terminal (indicado pela seta vermelha). Aumento de 100x.

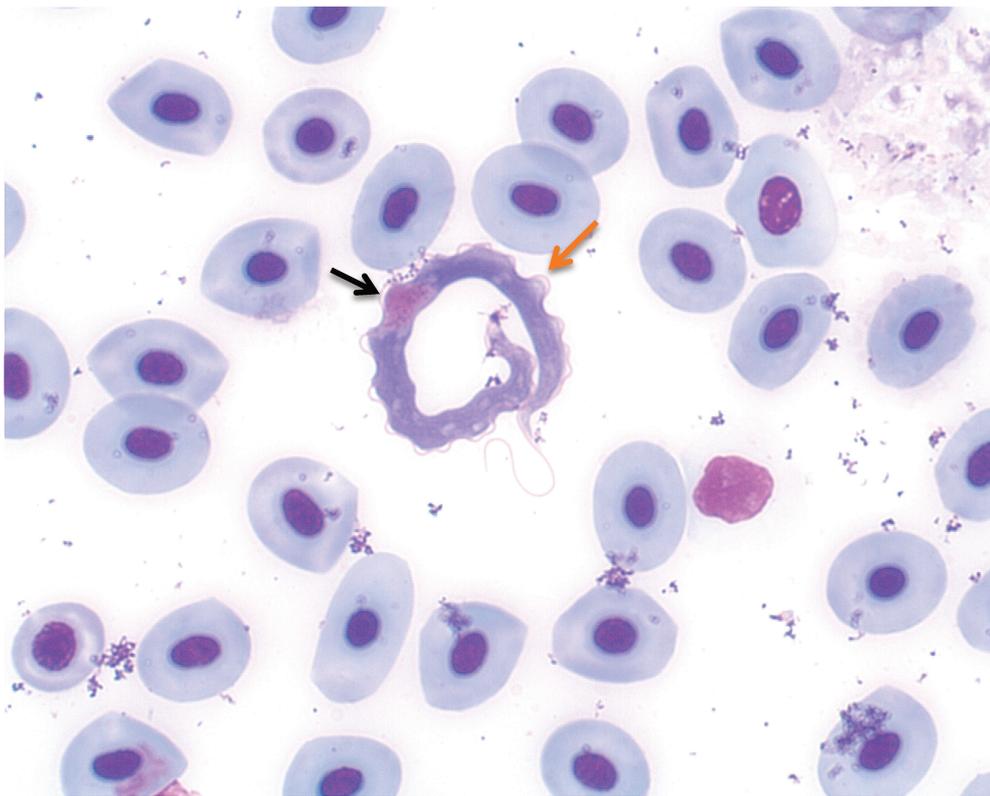


Figura 21: Forma tripomastigota evidenciando ondulação da membrana (indicada pela seta laranja) e núcleo elíptico (indicado pela seta preta). Aumento de 100x.

Existe um consenso no estudo do gênero *Trypanosoma* que o divide em dois grandes clados: terrestre e aquático, essa divisão provavelmente ocorre pelo hospedeiro invertebrado. No clado terrestre predominam como hospedeiros invertebrados e vetores, os dípteros hematófagos e carrapatos, e no clado aquático predominam os hirudíneos, com exceção dos tripanossomas de anuros que também podem ser transmitidos por dípteros. No clado terrestre estão inseridos os tripanossomas de maior interesse médico e veterinário (Hamilton et al, 2007).

O clado chamado aquático, é composto de tripanossomas de sanguessugas aquáticas, peixes e hospedeiros semi-aquáticos como quelônios, sapos, ornitorrincos e jacarés. Em 1999 um estudo de Stevens & Gibson, dividiram o clado aquático em dois grupos. O primeiro formado por tripanossomas cujo vetor seriam sanguessugas, neste grupo então estariam os isolados de peixes de água doce e salgada, isolado retirado de uma sanguessuga aquática (*T. sp* K&A), uma espécie retirada de ornitorrinco (*T. binneyi*) e um isolado de tartaruga (*T. chelodina*), isso comprova a relação

de co-evolução destes parasitas e seus vetores. O outro grupo foi formado por tripanossomas de anuros e um isolado encontrado em camaleão (*T. therezieni*). Até o momento não havia muita informação sobre esses parasitas em peixes da América do sul (Figura 22).

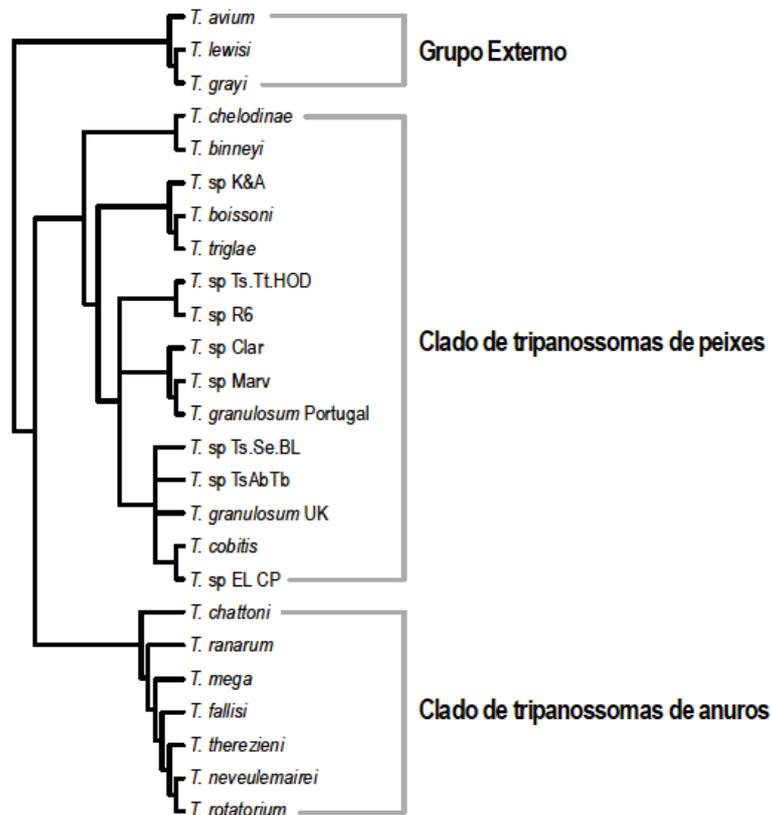


Figura 22: Filogenia do clado aquático baseado em sequências do 18S. Modificado de Gibson et al 2005.

A maioria dos estudos moleculares e filogenéticos de tripanossomas de peixes são baseados em análises de sequências do SSU rRNA e mostram um grande clado englobando todos os tripanossomas de peixes, dividindo-o em dois, tripanossomas de peixes de água doce e tripanossomas de peixes marinhos. O posicionamento de tripanossomas de tartarugas e ornitorrincos é mal resolvido, porém eles sempre agrupam junto com os tripanossomas de peixes em árvores filogenéticas (Gibson et al, 2005; Gu et al, 2007(a); Gu et al, 2010; Hayes et al, 2014; Su et al, 2014, Fermino et al, 2015; Lemos et al, 2015).

No presente estudo, ampliações obtidas de SSU rRNA e gGAPDH obtidas diretamente do sangue de peixes tiveram de ser clonadas antes do sequenciamento, devido a presença de mais de uma sequência por amostra,

indicando que os hospedeiros examinados no presente estudo possuíam infecções mistas de tripanossomas. Os clones amplificados para cada marcador bem como sua posição na filogenia proposta estão listados na Tabela 7. Apesar de terem sido identificadas mais de um genótipo de tripanossoma pelas análises das sequências, a falta de organismos em cultura dificulta sua descrição.

Tabela 7: Isolados utilizados no estudo, os respectivos marcadores utilizados e posição filogenética.

ISOLADO	Data	HOSPEDEIRO	MARCADORES	CLONE	POSIÇÃO
1B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	1Bc1 1Bc3 1Bc4	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02 Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02 <i>T. abeli</i>
1B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	GAPDH	1Bc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
2R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	GAPDH/ V7V8	2Rc4/ 2Rc2	<i>T. abeli</i>
3P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH/ V7V8	3Pc4/ 3Pc2	<i>T. abeli</i>
5P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH	5Pc1	<i>T. clandestinus</i>
5P	jun/14	<i>H. regani</i>	V7V8	5Pc3	<i>T. abeli</i>
6P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH	6Pc1	<i>T. abeli</i>
7R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	GAPDH/ V7V8	7Rc1/ 7Rc3	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
8R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	GAPDH/ V7V8	8Rc1/ 8Rc4	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
9P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH/ V7V8	9Pc2/ 9Pc3	<i>T. abeli</i>
10B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	GAPDH	10Bc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
10B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	10Bc3	<i>T. abeli</i>
11R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	GAPDH/ V7V8	11Rc3	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
12B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	GAPDH	12Bc3	<i>T. abeli</i>
12B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	12Bc6	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
13B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	GAPDH	13Bc1 13Bc4	<i>T. abeli</i> Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
14P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH	14Pc2	<i>T. abeli</i>
14P	jun/14	<i>H. regani</i>	V7V8	14Pc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
15B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	15Bc3	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
16P	jun/14	<i>H. regani</i>	GAPDH/ V7V8	16Pc1/ 16Pc5	<i>T. abeli</i>
17R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	GAPDH	17Rc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
17R	jun/14	<i>H. albopunctatus</i>	V7V8	17Rc1	<i>T. abeli</i>
18B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	18Pc2	<i>T. abeli</i>
19P	jun/14	<i>H. regani</i>	V7V8	19Pc1 19Pc3	<i>T. abeli</i> Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
20B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	GAPDH	20Bc2	<i>T. abeli</i>
20B	jun/14	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	20Bc3	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
22P	fev/15	<i>H. regani</i>	GAPDH/ V7V8	22Pc2/ 22Pc1 e 22Pc2	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
23P	fev/15	<i>H. regani</i>	GAPDH	23Pc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
23P	fev/15	<i>H. regani</i>	V7V8	23Pc1 23Pc2	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02 <i>T. abeli</i>
26R	fev/15	<i>H. albopunctatus</i>	V7V8	26Rc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
27R	fev/15	<i>H. albopunctatus</i>	V7V8	27Rc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
28P	fev/15	<i>H. regani</i>	V7V8	28Pc1 e 28Pc2	<i>T. abeli</i>
29P	fev/15	<i>H. regani</i>	V7V8	29Pc1	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
33R	fev/15	<i>H. albopunctatus</i>	V7V8	33Rc1 e 33Rc5	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
34B	fev/15	<i>H. strigaticeps</i>	V7V8	34Bc1 34Bc2	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02 Tripanossomas de <i>Pimelodus</i> sp. <i>Hypostomus</i> sp.
5ss	jun/14	Hirudíneos de <i>H. regani</i>	GAPDH/ COI/V7V8	5SSPc1/ 5SSPc1 e 5SSPc2	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
7ss	jun/14	Hirudíneos de <i>H. albopunctatus</i>	GAPDH	7SSRc2	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02
7ss	jun/14	Hirudíneos de <i>H. albopunctatus</i>	V7V8	7SSRc1 7SSRc5	Tripanossomas de Loricariidae/Hirudinea 02 <i>T. abeli</i>
8ss	jun/14	Hirudíneos de <i>H. albopunctatus</i>	GAPDH	8SSRc2	<i>T. abeli</i>

Além de fornecer alinhamentos altamente consistentes, as sequências do gene gGAPDH são muito mais polimórficas que as sequências obtidas de SSU rRNA para a maioria dos clados de tripanossomas, resultando em filogenias com considerável melhora na sua resolução e explicação (Hamilton et al, 2004; Viola et al, 2009a; Lima et al, 2012; Fermino et al, 2013; Lima et al, 2013). As inferências filogenéticas baseadas nas sequências de gGAPDH estão apresentadas na **Figura 23**.

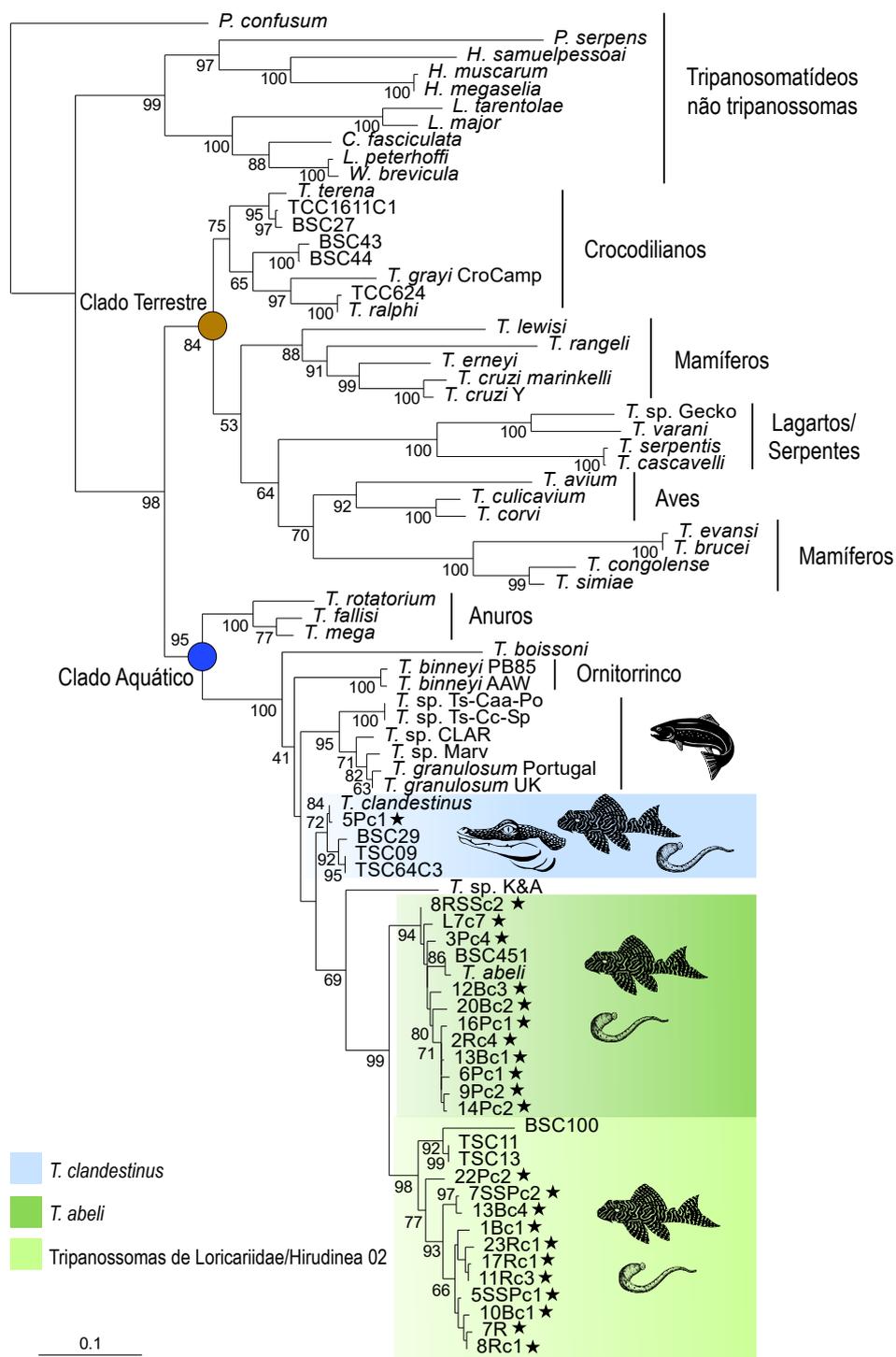


Figura 23: Árvore filogenética de tripanossomas de peixes e sanguessugas desses peixes com o posicionamento dos isolados encontrados, os isolados encontrados no presente estudo estão representado por (★). Árvore filogenética feita em análise de máxima verossimilhança de sequências de gGAPDH de tripanossomas de loricariídeos brasileiros desse estudo, sequências de *T. abeli* também de cascudos brasileiros, incluindo sequências de tripanossomas de peixes da Europa, África e Ásia, assim como sequências de tripanossomas de tartarugas e ornitorrinco também colocados no clado aquático. Sequências de outros tripanossomas e tripanosomatídeos não tripanossomas foram utilizados como outgroup nessa árvore filogenética. Números dos ramos representam

suporte de bootstrap (>50) estimadas com 500 pseudoreplicadas in RaxML, utilizando GTRGAMMA.

Nas inferências e análises filogenéticas do marcador gGAPDH é possível observar pela árvore que o isolado (5PC1) aparece irmão do recentemente descrito *Trypanosoma clandestinus* (Fermino et al, 2015), parasita de jacaré. Esse achado corrobora que mesmo hospedeiros vertebrados distantes compartilham o mesmo parasita ou parasitas geneticamente semelhantes com divergência genética não relevante. A relação provável para o achado estaria relacionado ao possível vetor comum para tripanossomas nesses hospedeiros. No continente americano, os jacarés e crocodilos encontram oportunidades de troca de tripanossomas na natureza, isso por estarem sempre em contato com áreas de pântano que moldam as presentes bacias hidrográficas (Fermino et al, 2013). Tripanossomas de sapos e serpentes são transmitidos por sanguessugas em ambientes aquáticos e por insetos em nichos terrestres (Ferreira et al, 2008; Viola et al, 2008 a, b), com isso é possível que insetos e sanguessugas possam transmitir *Trypanosoma* para os jacarés semiaquáticos *Caiman* sp. embora até o momento, o ciclo descrito somente por sanguessugas foi relatado (Fermino et al, 2015). Adaptação ecológica a um hospedeiro descreve um processo onde organismos são capazes de colonizar novos hospedeiros como resultado de traço já existentes. O processo de adequação de hospedeiros resultante de adaptações biológicas de tripanossomas, no lugar da co- especiação, parece ter grande importância na evolução dos tripanossomas. A restrição da maioria dos tripanossomas à alguns hospedeiros sugere que a infecção de hospedeiros relacionados é mais frequente de que com hospedeiros distantes. A associação entre clados de tripanossomas e certos hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados permitem uma previsão da transmissão natural com base na sua posição filogenética, sugerindo possíveis candidatos a hospedeiros em infecções experimentais (Hamilton et al, 2007). Dentro do mesmo clado ficaram os isolados (TSC09, BSC97 e BSC100) encontrados em sanguessugas que foram coletadas de cascudos do pantanal (Fermino et al, 2015).

Ainda nas análises do marcador gGAPDH é observada a formação de um clado, aqui denominado clado Tripanossomas de loricariidae/ Hirudinea 02 (será abreviado no texto como "clado 02"), com diversas sequências (22PC2, 7SSPC2, 13BC4, 5SSPC1, 1BC1, 23RC1, 17RC1, 11RC3, 10BC1, 7R e 8RC1) e esse clado apresenta similaridade com um grupo de tripanossomas de sanguessugas coletadas em cascudos do pantanal (TSC11, TSC13) (Lemos et al, 2015). Apesar da proximidade dos hospedeiros vertebrados, no caso mesma família, é difícil relacionar o compartilhamento ou a proximidade genética dos parasitas encontradas em sanguessugas do pantanal e nos peixes e sanguessugas do presente estudo coletadas em outras espécies de peixes e outra bacia. Outro isolado que agrupou junto no "clado 02" foi BSC100 sequência retirada de cascudos do Pantanal também mostrado por Fermino et al (2015) e Lemos et al (2015). O achado mostra que o clado continua sendo apenas de isolados encontrados em cascudos e em sanguessugas retiradas desses peixes, porém também com isolados de outras bacias, como o pantanal.

Os outros genótipos apresentados nesse estudo agruparam como irmão do descrito *Trypanosoma abeli*, parasitas de *Hypostomus luetkeni* e *Hypostomus affinis*, coletados do Rio Pomba, afluente da bacia do Paraíba do Sul, Cidade de Guarani em Minas Gerais (Lemos et al, 2015). Os genótipos aqui descritos (8RSSC2, 3PC4, 12BC3, 20BC2, 13BC1, 2RC4, 6PC1, 9PC2, 14PC2, 2RC) compartilham apenas o gênero do hospedeiro vertebrado com *T. abeli*, porém foram coletados em bacias diferentes, novamente a relação aparentemente estaria no vetor.

As análises de divergência, utilizando o marcador gGAPDH, intra-específica (intraclados) observamos uma baixíssima divergência para o clado clandestinus de 0,10% sugerindo provavelmente sequências genéticas quase idênticas para os isolados desse grupo. Quando analisado o "clado abeli" foi observado também uma divergência baixa de 1,25% entre as sequências desse clado. No "clado 02" apesar da divergência ser maior, de 2,18%, ainda não é suficiente para separar em mais de uma espécie, precisamos fazer uma filogenia com mais marcadores e incluir características morfológicas e biológicas, como ciclo de vida, comportamento em cultura e formas evolutivas

no vetor biológico. As análises de gGAPDH costumam resolver melhor as filogenias dos tripanossomatídeos em geral.

Nas análises de divergência entre grupos é possível ver que existem bons valores para separar os clados. O "clado 02" apresentou uma divergência de 7,63% para o "clado clandestinus" e 5,32% para o "clado abeli", isso corrobora os resultados dos agrupamentos obtidos na filogenia e auxilia no entendimento da posição desses isolados. A divergência observada entre o "clado 02" e os isolados descritos para peixes da Europa, África e Ásia foi de 8,04%, suportando a monofilia dos tripanossomas de peixes brasileiros.

Os dados apresentados na filogenia suportam fortemente, com valores altos, com suporte de 99 para o "clado abeli" e 98 para o "clado 02", o posicionamento dos tripanossomas encontrados em cascudos do gênero *Hypostomus* no Brasil, bem como de todo o conjunto de tripanossomas de peixes.

Todas as sequências de gGAPDH obtidas dos tripanossomas de cascudos utilizados nesse estudo, agruparam juntas nas inferências filogenéticas, suportando a existência de um clado separado exclusivo para tripanossomas de cascudos brasileiros e das sanguessugas provenientes desses peixes.

O clado de tripanossomas de cascudos brasileiros ficou dentro do "clado aquático" composto por tripanossomas de sapos, peixes, tartarugas, jacarés e ornitorrinco e sanguessugas aquáticas (Stevens et al, 2001; Hamilton et al, 2004; Gibson et al, 2005; Hamilton et al, 2007). De acordo com estudos filogenéticos anteriores, todos os tripanossomas de peixes se agrupam em um único clado que também abriga tripanossomas de tartarugas e ornitorrincos, esse padrão de ramificação complexa necessita da inclusão de mais tripanossomas para melhorar a resolução do grupo (Lemos et al, 2015)

Nosso estudo mostra a existência de um grande repertório de espécies de tripanossomas e/ou genótipos infectando peixes brasileiros, em especial cascudos, e suas sanguessugas. Existem também divergências relevantes

distinguindo tripanossomas encontrados em espécies simpátricas de *Hypostomus* e em espécimes da mesma espécie de peixe.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade da caracterização molecular utilizando abordagens sensíveis na tentativa de avaliar o repertório de espécies antes de conseguir se certificar e comprovar as possíveis associações parasita-vetor entre as espécies de tripanossomas de peixe.

Nas inferências e análises filogenéticas do fragmento V7V8 rDNA, (Figura 24) apenas visualizando a árvore é possível afirmar que as sequências são mais heterogêneas, foram obtidos uma maior diversidade de genótipos. Foi formado um clado (Tripanossomas de *Pimelodus* sp./*Hypostomus* sp.) (será abreviado no texto como "clado 01"), onde uma sequência encontrada em *Hypostomus* do presente estudo (34BC2) agrupou com dois isolados (BSC97, BSC98) retirados de bagres (*Pimelodus* sp.) do Pantanal (Fermino et al, 2015). Esses achados sugerem que espécies idênticas, ou muito similares de tripanossomas infectam diferentes espécies de peixes ao longo das bacias hidrográficas da América do Sul. Outros estudos se tornam necessários para averiguar se a especificidade de tripanossomas está relacionada a espécies próximas de peixes ou podem explorar diferentes famílias de uma região geográfica (Poulin et al, 2011, Fermino et al, 2015).

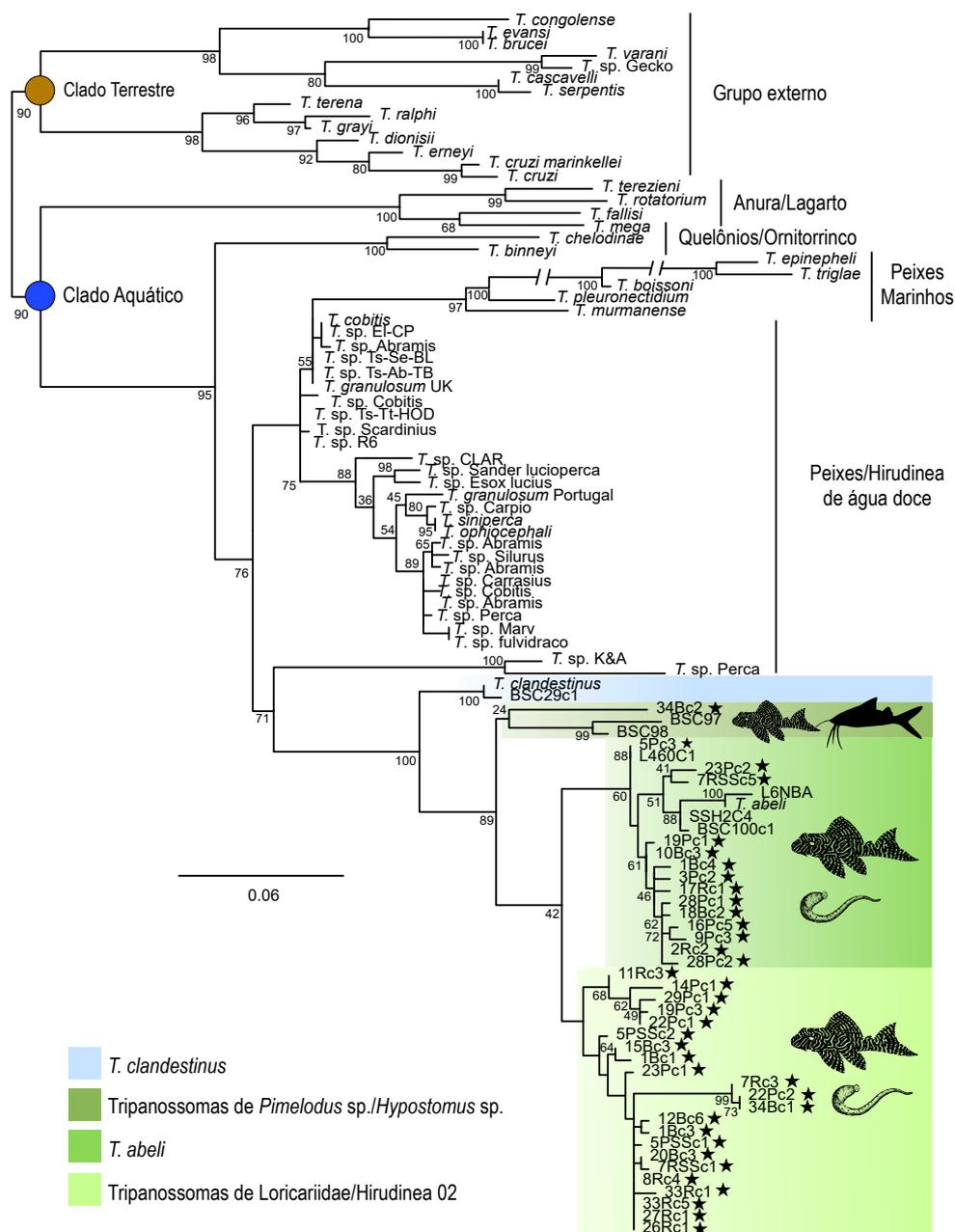


Figura 24: Árvore filogenética de tripanossomas de peixes e sanguessugas desses peixes com o posicionamento dos isolados encontrados, os isolados encontrados no presente estudo estão representado por (★). Árvore filogenética feita em análise de máxima verossimilhança de sequências de V7V8 de tripanossomas de loricariídeos brasileiros desse estudo, sequências de *T. abeli* também de cascudos brasileiros, incluindo sequências de

triplanossomas de peixes da Europa, África e Ásia, assim como sequências de tripanossomas de tartarugas e ornitorrincos também colocados no clado aquático. Sequências de outros tripanossomas e tripanossomatídeos não tripanossomas foram utilizados como outgroup nessa árvore filogenética. Números dos ramos representam suporte de bootstrap (>50) estimadas com 500 pseudoreplicadas in RaxML, utilizando GTRGAMMA.

Diversos isolados do estudo ficaram agrupados com o chamado "clado abeli", onde se encontra o recém descrito *T. abeli*, ou seja estes isolados dividem sequências idênticas ou muito similares com isolados de loricariídeos de outra bacia. Lemos et al (2015) relataram a espécie de hirudínea vetor de *T. abeli*, (*Haementeria brasiliensis*), o que ajuda a explicar a possível relação existente entre os tripanossomas dessas espécies de peixes, que dividem o mesmo gênero de hospedeiro e o mesmo gênero de vetor.

Nas análises do fragmento V7V8 também ocorreu a formação de um grupo exclusivo formado por isolados do presente estudo, na análise Tripanossomas de Loricariidae/ Hirudinea 02 (será chamado de "clado 02"), estão inseridos nesse clado isolados das três espécies de cascudos e das sanguessugas coletadas desses peixes.

No estudo realizado observamos uma divergência intra-específica (intraclados) nos clados propostos. O chamado "clado 01" apresentou uma divergência de 3,42%, ou seja uma diversidade razoável entre as sequências dentro do clado. Existe um consenso no estudo de tripanossomas em geral que divergências maiores que 3% são suficientes para separar espécies (Hamilton et al, 2004, 2007). Esse achado ajuda a confirmar a heterogenicidade entre essas sequências. No chamado "clado abeli" a divergência foi bem menor (1%) sugerindo que alguns dos isolados do presente estudo possam ser geneticamente iguais a *T. abeli*. No chamado "clado 02" onde estão inseridos somente isolados do presente estudo observamos uma diversidade ainda menor (0,70%).

Quando analisadas as divergências entreclados observamos que o "clado 02" apresenta valores de divergência de 3,48% para o "clado 01" e 1,67% para o "clado abeli", mostrando uma similaridade maior no segundo caso, provavelmente relacionada a proximidade da região geográfica onde foram encontrados bem como a maior proximidade do hospedeiro vertebrado. A diversidade encontrada entre o clado exclusivo do presente estudo e o

"clado clandestinus" foi de 2,80%, corroborando os resultados obtidos com o marcador gGAPDH que esses hospedeiros podem compartilhar os vetores desses tripanossomas. Analisando essa divergência para o clado de peixes marinhos essa divergência aumenta consideravelmente para 6,19% confirmando uma separação para os peixes de água doce brasileiros bem como a monofilia destes.

Lemos et al (2015) encontraram nas análises do V7V8, sequências de peixes brasileiros e sanguessugas que agruparam em um clado com pequena heterogenicidade (media de ~0,8%), no entanto, observaram também sequências relevantemente divergentes (> que 3,8%) que separaram seus resultados de sequências disponíveis de tripanossomas de peixes da Europa, Ásia e África.

Concomitantemente a isso as análises filogenéticas utilizando as sequências de V7V8 e gGAPDH, suportam a identificação de um clado de novas espécies de tripanossomas de loricariídeos brasileiros diferindo dos outros tripanossomas de peixes caracterizados por metodologia molecular, incluindo os encontrados em outra espécie de cascudos. Esse clado pode estar associado com a história evolutiva dos loricariídeos serem restritos as Américas do Sul e Central. Em contraste, estudos filogenéticos de tripanossomas de peixes da Europa, África e Ásia não suportam estruturas geográficas, restrição de hospedeiros por espécies, gênero ou família (Gibson et al, 2005; Grybchuck-Ieremenko et al, 2014; Hayes et al, 2014). Entretanto é possível que esses resultados sejam devido aos estudos terem utilizado somente o gene ribossômico como marcador filogenético, e pelo fato de serem poucos isolados descritos (seis isolados de peixes e dois isolados de sanguessuga) o que acaba por fornecer uma quantidade pequena de informação (Fermino et al, 2015).

A proximidade maior relativa aos tripanossomas de peixes brasileiros foi T. sp K&A encontrado em uma sanguessuga *Piscicola geometra* de água doce da Europa (Stevens et al, 1998). A divergência observada entre os isolados do estudo foi >7% para ambos os marcadores apresentados o que mostra uma divergência alta entre esses tripanossomas. Sequências de tripanossomas de diversos peixes de outras ordens e ou famílias, incluindo cascudos de outras partes do mundo, não agruparam com os encontrados

nos loricariídeos brasileiros ou com as sanguessugas encontradas aderidas nesses peixes. Outros estudos são necessários para verificar se os tripanossomas de outras famílias de peixes neotropicais também se agrupam nesse clado.

Assim como o observado por Lemos et al, 2015, no presente estudo foi encontrado polimorfismo nas sequências entre diferentes amostras da mesma espécie de peixe, mas também diferenças entre amostras retiradas dos peixes e suas sanguessugas e ainda entre amostras de diferentes espécimes dentro da mesma espécie de peixe. Amostras de sangue frequentemente abrigam diferentes sequências, indicando infecções mistas de tripanossomas, em contraste com os isolados de cultura que em geral, apenas uma sequência é recuperada, provavelmente devido a seleção pela cultura.

No presente estudo não houve correspondência total de sequências de tripanossomas encontradas em sanguessugas e as encontradas em sangue dos peixes parasitados por essa sanguessuga.

O presente estudo é o trabalho com maior número de genótipos já apresentado para tripanossomas de peixe e possibilitou inclusão de uma diversidade de representantes na filogenia do grupo, contribuindo muito para o entendimento de toda a filogenia do grupo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As análises podem sugerir a presença de polimorfismo morfológico nos tripanossomas encontrados em *Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus regani* e *Hypostomus strigaticeps*;
- Análises filogenéticas revelaram diversos genótipos novos para tripanossomas de peixes, que contribuíram para estudo da diversidade do grupo;
- Os estudos moleculares e morfológicos corroboram a existência de pelo menos uma espécie nova de tripanossoma em cascudos brasileiros;
- As análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH apoiaram a monofilia dos tripanossomas de peixe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; LANE, C.E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; GALL, L.L.; LYNN, D.H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E.A.D.; MOZLEY-STANRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F.W. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**. 59(5):429-493.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F. 1999. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo, SP: Edusp, 374-400.

AHMED, M.S.; AHMED, K.S.; KHAN, W.A.; ALI, H.; OLLEVIER, F.; RAY, D.L. 2014. Simple and rapid cultivation of *Trypanosoma danilewskyi* strain FCC-1 in monophasic liquid culture. **The Journal of animal & Plant Sciences**. 24 (1):149-153.

AUSTEN, J.M.; JEFFERIES, R.; FRIEND, J.A.; RYAN, U.; ADAMS, P.; REID, S.A. 2009. Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n. Sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gibert's potoroo (*Potorus gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*). **Parasitology**. 136: 783-792.

BAKER, JR. 1963. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. **Experimental Parasitology**. 13:219-233.

BAKER, J.R. 1994. The origins of parasitism in the protists. **International Journal of Parasitology**. 24: 1131-1137.

BECKER, C.D. 1977. Flagellate Parasites of fish /N KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa. vol1.- Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagellates of Fish** – New York: Academic Press, p. 358-412.

BERMINGHAM, E.; MARTIN, A.P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**. 7: 499-517.

BOLGER, T.; CONNOLLY, P.L. 1989. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**. 34 (2), 171-182.

BORGHEGAN, T.C.; FERREIRA, R.C.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; BORDA, C.C.; PAIVA, F.; MILDNER, R.V.; TEIXEIRA, M.M.G.; CAMARGO, E.P. 2013. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. **Protist**. 164: 129-152.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. 2003. **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, 278 p.

- BRITTO, S. G. C. (coord); 2003. **Peixes do Rio Paranapanema**. São Paulo. Edição Horizonte Geográfico. 112p.
- BRYANT, C. 1982. Biochemistry: In **Modern Parasitology**, (ed. F. E. G. Cox), pp. 84. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- BUCK, S.; SAZIMA, I. 1995. An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil: distribution, activity, and feeding. **Ichthyology Explorer Freshwaters**. 6: 325–332.
- 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**. 93 (6):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**. 83(4): 575-583.
- CASATTI, L.; ROCHA, F. C.; PEREIRA, D. C. 2005. Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in Southeastern Brazilian streams. **Biota Neotropica**. 5(2): 1-9.
- CHIACHIO, M.C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA BURGOS, J.I. 2008. Molecular Systematic and Historical biogeography of the armored neotropical catfish Hypoptomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 49: 606-617.
- COVAIN, R.; FISH-MULLER, S. 2007. The genera of Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. **Zootaxa**. 1462: 1-40.
- DA SILVA M.; RIBEIRO E.D.; MATOSO D.A.; SOUSA L.M.; HRBEK T.; PY-DANIEL L.R. 2014 Chromosomal polymorphism in two species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. **Genetica**. 142:127–139.
- 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**. 66: 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**. 85 (2): 283-1846.
- EIRAS, J.C.; SEGNER, H.; WAHLI, T.; KAPOOR, B.G. 2008. **Fish Diseases- vol. 1** Enfield: Science Publishers, 612p.
- EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C.; LUQUE J.L. 2012

Checklist of Protozoan parasites of fishes from Brazil. **Zootaxa**.3221:1–25.

FERMINO, B.R.; VIOLA, L.B.; PAIVA, F.; GARCIA, H.A.; PAULA, C.D.; BOTERO-AIRAS, R.; TAKATA, C.S.A.; CAMPANER, M.; HAMILTON, P.B.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 2013. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. **Parasites & Vectors**. v. 6 (313).

FERMINO, B.R.; PAIVA, F.; SOARES, P.; TAVARES, L.R.; VIOLA, L.B.; FERREIRA, R.C.; BOTERO-ARIAS, R.; DE-PAULA, C.T.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; CAMARGO, E.P. 2015. Field and experimental evidence of a new Caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **International Journal for Parasitology**. DOI- 10.1016/j.ijppaw.2015.10.005

FERRARIS, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**. 1-548.

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

FERREIRA, R.C.; De SOUZA, A.A.; FREITAS, R.A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BARRETT, T.V.; SHAW, J.J.; TEIXEIRA, M.M.G. 2008. 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**. 55: 427-435.

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**. 46(5): 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): 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).

GARCIA, H.A.; RODRIGUES, A.C.; MARTINKOVIC, F.; MINERVINO, A.H.H.; CAMPANER, M.; NUNES, V.L.B.; PAIVA, F.; HAMILTON, P.B.; TEIXEIRA, M.M.G. 2011 Multilocus phylogeographical analyses of Trypanosoma

(megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **International Journal for parasitology**. 41: 1385-1396.

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): 591-598.

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

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, I.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, H.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.; ACOSTA, N. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature** 421:936–939

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

GONÇALVES, C.S.; BRAGA, F.M.S. 2008. Diversidade e ocorrência de peixes na área de influência da UHE Mogi- Guaçu e lagoas marginais, bacia do alto Rio Paraná, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**. 8 (2): 103-114.

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

GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; GONG, X. 2007(a). Redescription of *Trypanosoma siniperca* Chang 1964 from freshwater fish of China based on morphological and molecular data. **Parasitology Research**. 100: 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 os species identification. **Parasitology Research**.101: 723-730.

Gu, Z.; Wang, J.; Ke, X.; Liu, Y.; Liu, X.; Gong, X.; LI, A. 2010. Phylogenetic position of the freshwater fish trypanosome, *Trypanosma ophiocephali* (Kinetoplastida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **Parasitology Research**. 106:1039–42.

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

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal

RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 44: 15-25.

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

HERNANDEZ, R.; RIOS, P.; VALDES, A.M.; PINERO, D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 41:207-212.

HENZE, K., BADR, A., WETTERN, M., CERFF, R., MARTIN, W. 1995. A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences Journal**. USA. 92:9122–9126.

HOARE, C.A. 1972 *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell, Oxford

HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature** 212:1385–1386

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

ISLAM, A.K.M.N.; WOO, P.T.K. 1991(b). Anorexia in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 11: 8-45.

JOHNSON, R.A.; WICHERN D.W. 2007. Applied multivariate statistical analysis. 6th ed. Upper Saddle River. Prentice Hall.

JONES, S.R.M.; WOO, P.T.K. 1991. Development and infectivity of *Trypanosoma phaleri* in leech and fish hosts. **Canadian Journal Zoology**. 68: 1951–1955.

JONES, S.R.; WOO, P.T.K. 1992. Vector specificity of *Trypanosoma catostomi* and its infectivity to freshwater fishes. **Journal of Parasitology**. 78:87–92.

KARLSBAKK, E.; NYLUND, A. 2006. Trypanosomes infecting cod *Gadus morhua* L. In the North Atlantic: A resurrection of *Trypanosoma pleuronectidium* Robertson, 1906 and delimitation of *T. murmanense* Nikitin, 1927 (emend.), with a review of other trypanosomes from North Atlantic and Mediterranean teleosts. **Systematic Parasitology**. 65: 175-203.

KHAN, R.A. 1978. A redescription of *Trypanosoma cotti* Brumpt and Lebailly, 1904 and its development in the leech, *Calliobdella punctata*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**. 53:461–6.

KHAN, R.A. 1976. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin.

Canadian Journal of Zoology. 54: 1840–1849.

KHAN, R.A. 1977. Susceptibility of marine fish to trypanosomes. **Canadian Journal of Zoology**. 55: 1235-1241.

KHAN, R.A. 1982. Biology of the marine piscicolid leech *Johanssonia arctica* (Johansson) from Newfoundland. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. 49: 266-278.

KNOLL, L.B.; MCINTYRE, P.B.; VANNI, M.J.; FLECKER, A.S. 2009. Feedbacks of consumer nutrient recycling on producer biomass and stoichiometry: separating direct and indirect effects. **Oikos**. 118:1732–1742.

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

LANGGANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S.; CASSATI, L. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: Composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**. 7(3): 181-197.

LARSEN, J.; SVENSMARK, B.; NILSSON, J.R. 1988. Variation in the growth medium during the culture cycle of *Tetrahymena* with special reference to ammonia (NH₃), ammonium (NH₄⁺) and pH. **Journal of Protozoology**. 35: 541-546.

LEMONS, M.; FERMINO, B.R.; SIMAS-RODRIGUES, C.; HOFFMAN, L.; SILVA, R.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G.; SOUTO-PADRÓN, T. 2015. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. **Parasites & Vectors**. 8:573 DOI 10.1186/s13071-015-1193-7

LETCHE, C.A. 1979 Host restriction, morphology and isoenzymes among trypanosomes of some British freshwater fishes. **Parasitology**. 79: 107-117.

LETCHE, C.A. 1980. The life-cycle of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow 1883. **Parasitology**. 80, p: 163-169.

LI, S.; WOO, P.T.K. 1991. Anorexia reduces the severity of cryptobiosis in *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Parasitology** 77: 467–471.

LIMA, L.; SILVA, F.M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON P.B.; TEIXEIRA, M.M.G. 2012. 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**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.003>.

LIMA, L.; ESPINOSA-ALVAREZ, O.; HAMILTON, P.B.; NEVES, L.; TAKATA,

C.S.; CAMPANER M.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 2013 . *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites and Vectors**. doi:10.1186/1756-3305-6-221.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. 1992. Protozoan parasites of fish. **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**. v26. Elsevier. Amsterdam.

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**. 64: 83-88.

LOPES, R.A.; RIBEIRO, R.D.; SATAKE, T.; NUTI-SOBRINHO, A.; GARCIA, T.A.R. 1990. Trypanosomes of Brazilian fishes. II. *Trypanosoma barrettoi* 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.

LOWE-McCONNELL, R.H. 1999. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo.

LUCENA, AL.M.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C.; MATEUS, R.P.; ZAWADZKI, C.H. 2012. Genetic differentiation among ten populations of the genus *Neoplecostomus* (Telestei: Loricariidae) from the upper Paraná River Basin. **Biochemical Systematic and Ecology**. 44: 325-332.

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

MARTIN, D.S.; DESSER, S.S. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. **Parasitology Research**. 77:18-26.

MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **Journal of Parasitology**. 88:566-571.

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

MASLOV, D.A.; YURCHENKO, V.Y.; JIRKŮ, M.; LUKEŠ, J. 2010. Two new species of trypanosomatids parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. **Journal Eukaryot Microbiology** .57:177-88.

MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNADES, M.N. 1998. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia e the facultative air- breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. 120: 311-315.

MERZLYAK, E.; YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A.A.; ALEXANDROV, K.; PODLI- PAEV, S.; MASLOV, D.A. 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA Genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **Journal Eukaryotic Microbiological**. 48: 161–169.

MILANI, E.P.; MELO, J.H.G.; SOUZA, P.A.; FERNANDES, L.A.; FRANÇA, A.B. 2007. Bacia do Paraná. **Boletim Geociências Petrobrás**. 15(2): 265-287.

MOLINA, J.P.; MADI, R.R.; SOLFERINI, V.N.; CECCARELLI, P.S.; PINHEIRO, H.P.; UETA, M.T. 2016. Trypanosomatids (Protozoa: Kinetoplastida) in three species of Armored Catfish from Mogi-Guaçu river, Pirassununga, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. 25(2): 131-141.

MONTOYA-BURGOS, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology** 12: 1855–1867.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; RODRIGUEZ-VALERA, F. 2001. New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate, and a new environmental sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.51:2211–2219.

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

MOSER, W.E.; KLEMM, D.J.; RICHARDSON, D.J.; WHEELER, B.A.; TRAUTH, S.E.; DANIELS, B.A. 2006. Leeches (Annelida: Hirudinida) of Northern Arkansas. **Journal of the Arkansas Academy of Science**. 60: 84-95.

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

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

POULIN, R., KRASNOV, B.R., MOUILLOT, D. 2011. Host specificity in phylogenetic and geographic space. **Trends in Parasitology**. 27: 355-361.

QIAN, Q.; KEELING, P.J. 2001. Diplonemid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfer. **Protist**.152: 193–201.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M. 2000. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borelli* (Osteichthyes, Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná River, Porto Rico region, Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum**. 22 (2): 515–521.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARRIS, C.J. 2003. Checklist of the Freshwater Fishes of South America. **Edipucrs**, Porto Alegre, Brazil.

REIS, R.E.; PEREIRA, E.H.L.; ARMBRUSTER, J.W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. **Zoological Journal of Linnean Society**. 147: 277–299.

RIBEIRO, R.D.; LOPES, R.A.; SATAKE, T.; NUTI SOBRINHO, A.; BRITSKI, H.A. 1990 Trypanosomes of brazilian fishes. IX. *Trypanosoma pinto* sp. n. from armored catfish *Hypostomus* sp. (Pisces, Loricariidae), from Mogi-Guaçu river, municipality of Pitangueiras, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**. 50(3): 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.; 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 9.3. Institute Incorporation. 2012. **SAS User's Guide: Statistics**. Release 12.1 North Caroline, Cory. 1098 p.

SCHOLZ, T.; CHOUGHURY, A. 2014. Parasites of freshwater fishes in North America: Why so neglected. **Journal Parasitology**. 100(1): 26-45.

SILVA, G.S.; ROXO, F.F.; BRITZKE, R.; OLIVEIRA, C. 2014. New species of the *Pseudancistrus barbatus* group (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its biogeography and dispersal routes. **Zookeys**. doi:10.3897/zookeys.406.7011.

SIMPSON, A.G.; ROGER, A.J. 2004. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Molecular Phylogenetics Evolution**. 30:201–212.

SIMPSON, A.G.B.; GILL, E.E.; CALLAHAN, H.A.; LITAKER, R.W.; ROGER, A.J. 2004. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. **Protist**. 155: 407-422.

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

STAMATAKIS, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**. 22(21): 2688– 2690.

STEVENS, JR.; GIBSON, W.C. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**. 15:432-437.

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

STEVENS, J.; NOYES, H.A.; SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, T.J. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**. 48: 1–54.

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

SU, Y.; FENG, J.; JIANG, J.; GUO, Z.; LIU, G.; XU, L. 2014. *Trypanosoma epinepheli* n. sp. (Kinetoplastida) from a farmed marine fish in China, the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). **Parasitology Research**. 113:11–8.

SVOBODOVÁ, M.; ZIDKOVÁ, L.; ČĚPICĚKA, I.; OBORNIK, M.; LUKES, J.; VOTÝPKA, J. 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal Systematic Evolution Microbiology**. 57:423–432.

SWOFFORD, D. L. 2002. **PAUP**: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0 beta. Sunderland: Sinauer.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**. 28(10): 2731-2739.

TEIXEIRA, M.M.G.; BORGHESAN, T.C.; FERREIRA, R.C.; SANTOS, M.A.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; NUNES, V.L.; MILDRE, R.V.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E.P. 2011 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**. 162:503–524.

TIBAYRENC, M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology*. 36:47-115.

THATCHER, V.E. 2006. **Amazon Fish Parasites**. Segunda edição. Sofia-Moscow: Pensoft, vol.1, 508p.

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

TORRES, J.L.R.; PEREIRA, M.G. 2008. Dinâmica de potássio nos resíduos vegetais de plantas de cobertura do cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. 32: 1609-1618.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. 2004. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de Peixes Neotropicais. **UEPG Ciência e Biologia e Saúde**. 10 (2): 27-37.

VANNI, M.J.; FLECKER, A.S.; HOOD, J.M.; HEADWORTH, J.L. 2002. Stoichiometry of nutrient recycling by vertebrates in a tropical stream: linking species identity and ecosystem processes. **Ecology Letters**. 5: 285–293.

VAZZOLER, A.E.A.; DE, M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá, 196 pp.

VICKERMAN, K. 1976. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. *In*: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. **Biology of the Kinetoplastida**. New York: Academic Press. p. 1-34.

VICKERMAN, K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal of Parasitology**. 24: 1317–1331.

VIOLA, L.B.; ALMEIDA, R.; FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.A.; RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 2008a. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman

(Caiman yacare) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and GAPDH genes. **Parasitology** 136, 55-75.

VIOLA, L.B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.A.; FERREIRA, R.C.; RODRIGUES, A.C.; FREITAS, R.A.; DUARTE, M.R.; GREGO, K.F.; BARRETT, T.V.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 2008b. 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** 135: 595-605.

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

VIOLA, L.B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. 2009b. 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 Eukariotic Microbiology**. 56: 594-602.

YURCHENKO, V.Y.; LUKES, J.; JIRKU, M.; MASLOV, D.A. 2009. Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**. 59:893–909.

YURCHENKO, V.Y.; LUKES, J.; TESAROVÁ, M.; JIRKU, M.; MASLOV, D.A. 2008. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. **Protist**. 159:99–114.

WIEMER, E.A.; HANNAERT, V.; VAN DEN, I.P.R.; VAN ROY, J.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. 1995. Molecular analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in kinetoplastida. **Journal of Molecular Evolution**. 40: 443–454.

WOO, P.T.K. 1995. **Fish Diseases and Disorders – Vol.1. Protozoan and Metazoan Infections**. Cambridge: CAB International. 808p.

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

ZINTL, A.; POOLE, W.R.; VOORHEIS, H.P.; HOLLAND, C.V. 1997. Naturally occurring *Trypanosoma granulorum* infections in the European eel, *Anguilla*

anguilla L. from County Mayo, Western Ireland. **Journal of Fish diseases.**
20: 333-341.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE TRIPANOSSOMAS EM INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE PEIXES E HIRUDÍNEOS (protocolo CEUA/UNICAMP nº 2786-1-1), de responsabilidade da Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta e Julia Pereira Molina, teve o título alterado para Análise de *Trypanosoma* spp em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi Guaçu, SP: estudo morfológico, molecular e análise filogenética, por sugestão dos membros da banca de mestrado.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com os certificados emitidos originalmente pela CEUA/UNICAMP, sendo emitido em 09/08/2012.

Campinas, 19 de dezembro de 2016.

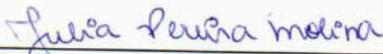
Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Análise de Trypanosoma spp. em infecção de cascudos e hirudíneos do rio Mogi-Guaçu, SP: estudo morfológico, molecular e análise filogenética"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de novembro de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Julia Pereira Molina**
RG n.º 447842985

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Marlene Tiduko Ueta**
RG n.º 26927548