



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**NAYARA MENDES LOUZEIRO**

**PESQUISA DE PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* EM PEIXES  
PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS DE SÃO BENTO E BACURITUBA DA  
BAIXADA MARANHENSE**

**SÃO LUÍS  
2018**

NAYARA MENDES LOUZEIRO

**PESQUISA DE PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* EM PEIXES  
PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS DE SÃO BENTO E BACURITUBA DA  
BAIXADA MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Andréa Pereira da Costa

**SÃO LUÍS**

**2018**

Louzeiro, Nayara Mendes.

Pesquisa de parasitas do gênero *Trypanosoma* em peixes provenientes de municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense / Nayara Mendes Louzeiro. – São Luís, 2018.  
60 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa.

1. Filogenia. 2. Baixada Maranhense. 3. *Trypanosoma*. I. Título.

CDU 616.993:597.2/.5(812.1)

**NAYARA MENDES LOUZEIRO**

**PESQUISA DE PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma* EM PEIXES  
PROVENIENTES DE MUNICÍPIOS DE SÃO BENTO E BACURITUBA DA  
BAIXADA MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão  
– UEMA como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ pela banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andréa Pereira da Costa  
(Orientadora)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira  
(1º membro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marcia Aparecida Sperança  
(2º membro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra  
(3º membro)

**Dedico este trabalho aos meus pais, Fábio Louzeiro Filho e Rosangela Silva Mendes Louzeiro, ao meu irmão Fábio Pedro Mendes Louzeiro, ao meu avô Raimundo Silva Mendes - “Didi”, aos meus avô e avó paternos, Fábio Louzeiro e Martinha Rabelo Louzeiro (In Memoriam) e a minha avó materna, Nizete Silva Mendes (In Memoriam).**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, primeiramente, pela minha vida, saúde e sabedoria para enfrentar todos os obstáculos que aparecem no meu caminho.

Aos meus pais, Fábio Louzeiro Filho e Rosangela Silva Mendes Louzeiro, por todo o apoio incondicional, conselhos, amizade, amor e companheirismo.

Ao meu irmão, Fábio Pedro Mendes Louzeiro, pela ajuda e companhia.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andréa Pereira da Costa pela orientação, por ter me dado a oportunidade de fazer um estágio importante na Universidade Federal do ABC - UFABC, localizada em São Bernardo do Campo em São Paulo e principalmente pela confiança em me orientar dispondo apenas de um ano para conclusão do curso de Mestrado em Ciência Animal.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos pela orientação no primeiro ano de mestrado.

Ao Prof. Dr. Francisco Borges Costa pela ajuda na coleta dos peixes e pelos conselhos.

A Prof<sup>ª</sup> Dra. Márcia Aparecida Sperança e Dra. Aline Diniz Cabral por todos os ensinamentos passados, pela hospitalidade e pelo carinho recebidos no estágio realizado na Universidade Federal do ABC – UFABC, em São Bernardo do Campo – São Paulo.

A minha turma de mestrado “MLK” que tornou essa jornada árdua mais leve, em especial a Fabiana Borralho, Lyssandra Ferreira (pela ajuda direta no trabalho), Samira Brito, Dennis Leite, Paulo Vitor Carvalho, Jayanna Maia, Ana Karoline Simas e Cristian Aquino.

Aos colegas do laboratório de Agentes Patogênicos da Universidade Federal do ABC - UFABC, Campus São Bernardo do Campo – São Paulo, Felipe Baena e Gabriel Lopes, pela hospitalidade, ajuda, parceria, alegrias, conhecimentos trocados, e principalmente a Letícia Andrade, por tudo isto e ainda mais pela ajuda direta na etapa do trabalho realizado no laboratório.

Ao laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pela disponibilização dos equipamentos.

Ao amigo, Luis Gustavo Matias, pelo companheirismo e ajuda direta no trabalho.

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciência Animal que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

A Francisca Silva Araujo - “Fran”, que sempre esteve disposta a ajudar em todos momentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA pela bolsa concedida.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Barcoding e relações filogenéticas de tripanossomas de peixes.	19
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico da Tripanossomíase em peixes.	21
<b>Figura 3</b> - - Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNA precursores de tripanossomatídeos.	23
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática dos genes de GAPDH.	25
<b>Figura 5</b> - Mapa do Estado do Maranhão demonstrando a localização da Baixada Maranhense.	27
<b>Figura 6</b> – Campos inundáveis no município de São Bento – MA.	28
<b>Figura 7</b> – Campos inundáveis na Baixada Maranhense – MA.	28
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T easy. Em destaque o sítio múltiplo de clonagem.	32
<b>Figura 9</b> – <i>Trypanosoma</i> sp. em esfregaço sanguíneo de <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> (Jeju).	37
<b>Figura 10</b> - <i>Trypanosoma</i> sp. em esfregaço sanguíneo de <i>Hoplias malabaricus</i> (Traíra).	37
<b>Figura 11</b> - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo DNA genômico extraído de 47 amostras de esfregaços sanguíneos. M- Gene Ruler 1Kb Ladder (Thermo Scientific)	39
<b>Figura 12</b> - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo DNA genômico extraído de cinco amostras de sangue total. M- Gene Ruler 1Kb Ladder (Thermo Scientific)	39
<b>Figura 13</b> - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR para amplificação do fragmento de 800-900pb correspondente ao gene que codifica a região V7V8 da subunidade menor do rRNA de tripanossomatídeos. A-D. Diferentes géis de eletroforese; M-Gene Ruler 1 Kb ladder (Thermo Scientific); Tc – <i>Trypanosoma cruzi</i> ; Lc – <i>Leishmania infantum chagasi</i> ; C-: controle negativo; fragmentos submetidos à clonagem.	40
<b>Figura 14</b> - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR para amplificação do fragmento de 600-700pb correspondente ao gene que codifica o gGAPDH de tripanossomatídeos. A, B. Diferentes géis de eletroforese; M-Gene Ruler 1 Kb ladder (Thermo Scientific); Tc – <i>Trypanosoma cruzi</i> ; Lc – <i>Leishmania infantum chagasi</i> ; C-: controle negativo; A seta indica o tamanho dos fragmentos submetidos à clonagem.	41
<b>Figura 15</b> - Eletroforese em gel de agarose 1% para análise dos clones recombinantes para os genes que codificam a região V7V8 da subunidade menor do rRNA (1, 6, 9-11, 14) e o gGAPDH (2,4,5,7,15,16) dos tripanossomatídeos. M. Gene Ruler 1Kb ladder (Thermo Scientific).	42



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Frequência de <i>Trypanosoma</i> sp. em peixes dos municípios São Bento e Bacurituba – Maranhão.	36
<b>Tabela 2</b> – Hospedeiro, gene, identidade e número de acesso de tripanossomas de peixes dos municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense - Maranhão.	44

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

DNA	Ácido desoxirribonucleico
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µM	Micromolar
∞	Infinito
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<i>EcoRI</i>	Enzima isolada da <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
g	Gramas
gGAPDH	Gene que codifica a enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica
H <sub>2</sub> O	Água
LB	Luria Bertani
LSU	Subunidade maior
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOAc	Acetato de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SSU	Subunidade menor
SSU rRNA	Subunidade menor do RNA ribossômico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris HCl	Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico
xg	Força centrífuga

LOUZEIRO, N. M. **Pesquisa de parasitas do gênero *Trypanosoma* em peixes provenientes de municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense.** 2018. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2018.

## RESUMO

Os tripanossomas já foram reportados em diversas espécies de peixes de água salgada e doce, sendo a maioria das espécies descritas com base nas características morfológicas. Tripanossomas parasitas de peixes são heteroxenos e são transmitidos por hirudíneos. O presente trabalho teve por objetivo conhecer a diversidade de *Trypanosoma* em peixes capturados, provenientes de municípios de São Bento e Bacurituba na Baixada Maranhense, por meio de parâmetros moleculares. Foram realizadas duas coletas totalizando 103 amostras envolvendo quatro espécies, *Hoplias malabaricus* (traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju), *Pygocentrus nattereri* (piranha vermelha) e *Tilapia* sp (tilápia). O sangue foi coletado por punção cardíaca para a confecção de esfregaços sanguíneos, que foram fixados com metanol e corados por Giemsa para a pesquisa de tripanossomas. A frequência geral de tripanossomas foi de 51/103 (49, 51%). Com o intuito de identificar as espécies de tripanossomas por método molecular, os esfregaços sanguíneos positivos foram utilizados para extração de DNA. Este foi utilizado para amplificação por PCR de dois segmentos gênicos considerados *barcode* deste grupo de parasitas, um fragmento de 800-900pb correspondente a região variável V7 e V8 do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico, e um fragmento de 600-700pb correspondente ao gene que codifica a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosômica (gGAPDH). Das 51 amostras positivas em esfregaço sanguíneo, 37 foram positivas para ambos ou um dos segmentos gênicos, os quais foram submetidos a clonagem em plasmídeo pGEM-T. Desta forma foram obtidos clones de 17 amostras, sendo 6 para a região V7V8 e 11 para gGAPDH. Nos seqüenciamentos foram encontradas 7 sequências de tripanossomas das espécies *Hoplias malabaricus* (Traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jeju) e *Pygocentrus nattereri* (Piranha Vermelha). Deste modo, foi demonstrado que os peixes apresentaram sequências de uma espécie única e foram identificados como uma espécie próxima a *Trypanosoma clandestinus* por análises através do BLAST. Este é o primeiro estudo com *Trypanosoma* em peixes do Nordeste do Brasil e os resultados do presente estudo reforçam a necessidade de caracterização molecular usando abordagens sensíveis para avaliar o repertório de espécies de tripanosoma que infectam esses hospedeiros.

Palavras-chave: Filogenia. Baixada Maranhense. *Trypanosoma*

LOUZEIRO, N. M. **Research on parasites of the genus *Trypanosoma* in fish from the municipalities of São Bento and Bacurituba da Baixada Maranhense.** 2018. 60f. Dissertation (Master in Animal Science) - State University of Maranhão, São Luís, 2018.

### ABSTRACT

Trypanosomes have been reported in several freshwater and freshwater fish species, with most species being described based on morphological characteristics. Fish parasitic trypanosomes are heteroxenes and are transmitted by hirudines. The present work had as objective to know a diversity of *Trypanosoma* in captured fishes, participation of municipalities of São Bento and Bacurituba in the Baixada Maranhense, through molecular parameters. Two collections were carried out, totaling 103 samples involving four species, *Hoplias malabaricus* (traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju), *Pygocentrus nattereri* (red piranha) and *Tilapia* sp (tilapia). Blood was collected by cardiac puncture for the preparation of blood smears, which were fixed with methanol and stained by Giemsa for trypanosomes. The general frequency of trypanosomes was 51/103 (49, 51%). In order to identify as trypanosome species by molecular method, positive blood smears are used for DNA extraction. This was used for PCR amplification of two gene segments, such as bar code, parasite group, an 800-900pb fragment corresponding to the V7 and V8 variable region of the gene encoding a minor subunit of ribosomal RNA, a 600- 700 bp corresponding to the gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate glycosidic dehydrogenase (gGAPDH). Of the 51 blood smear positive specimens, 37 were positive for both or the gene segments, which were cloned into plasmid pGEM-T. In this way clones of 17 samples were obtained, being 6 for the region V7V8 and 11 for gGAPDH. In the sequencing, 7 sequences of trypanosomes of the species *Hoplias malabaricus* (Traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jeju) and *Pygocentrus nattereri* (Red Piranha) were found. Thus, the fish were shown to have sequences of a single species and as identified as a species close to *Trypanosoma clandestinus* by BLAST analyzes. This is the first study with *Trypanosoma* in fish from Northeast Brazil and the results of the present study reinforce the need for molecular characterization using sensitive approaches to evaluate the repertoire of trypanosome species that infect these hosts.

Keywords: Phylogeny. Baixada Maranhense. *Trypanosoma*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos .....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
3.1	<i>Trypanosoma</i> .....	17
3.2	Clado aquático .....	19
3.3	Tripanossomas em peixes .....	20
3.4	Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomas: SSU rRNA e gGAPDH.....	23
3.4.1	Gene que codifica a subunidade menor do RNA Ribossômico (SSU rRNA) .....	24
3.4.2	Gene codificador da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH).....	25
3.5	Baixada Maranhense .....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1	Comitê de Ética.....	28
4.2	Área de estudo .....	28
4.3	Obtenção das amostras.....	30
4.4	Coleta de sangue .....	30
4.5	Esfregaço sanguíneo .....	30
4.6	Isolamento de tripanossomatídeos .....	30
4.7	Extração de DNA genômico .....	30
4.8	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	31
4.9	Purificação e sequenciamento de nucleotídeos.....	32
4.10	Clonagem .....	32
4.11	Extração dos plasmídeos.....	34
4.12	Análise de restrição dos plasmídeos recombinantes.....	34
4.13	Sequenciamento de nucleotídeos .....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
6	CONCLUSÃO .....	46
	REFERÊNCIAS .....	47
	ANEXOS.....	58

## 1 INTRODUÇÃO

A procura mundial por peixes e derivados tem sofrido um significativo aumento nas últimas décadas, devido principalmente ao crescimento populacional e a demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis (FAO, 2016). Neste contexto, faz-se necessária a pesquisa de agentes patogênicos nestes animais, visando a segurança alimentar. Os peixes, como qualquer outro vertebrado, apresentam uma fauna parasitária particular, que inclui inúmeras espécies e cuja relação de equilíbrio parasito/hospedeiro estão vinculadas às condições abióticas como temperatura, a intensidade e a periodicidade de luz, a composição química da água (pH, alcalinidade, condutividade), a disponibilidade de espaço, além de localização geográfica, fauna presente no habitat e estação do ano. Um desequilíbrio nessa relação influencia no aparecimento de enfermidades (NIKOLSKY, 1963; DOGIEL, 1970; LUQUE, 2004).

Os parasitos geralmente respondem às mudanças ambientais mais rapidamente do que seus hospedeiros, assim, o conhecimento da fauna parasitária fornece um meio de avaliar os níveis de estresse ambiental e pode influenciar nas restrições quanto a exploração do meio ambiente, como a descarga de efluentes, pois se acredita que a frequência de parasitos pode ter ligação com o aumento de nível de poluição da água, ou diminuição da qualidade do ambiente. Aliado a este fato, admite-se que o peixe, sob estresse, é mais suscetível ao parasitismo e menos eficiente para sobreviver no ambiente natural (SILVA-SOUZA et al., 2006).

Dentre os parasitas que infectam peixes, diversas espécies de *Trypanosoma* têm sido descritas, tanto em peixes de água doce quanto naqueles de água salgada. Os estudos de tripanossomas de peixe podem ajudar a encontrar soluções a problemas importantes que são comuns aos estudos da patogenicidade causada por esses parasitas em mamíferos. Entretanto, a grande variedade de hospedeiros e a ampla distribuição geográfica dos parasitas representam problemas para a descrições de novas espécies de tripanossomas de peixe. Além disso, a identificação taxonômica de espécies de tripanosomas de peixes é em grande parte das vezes realizada através da taxonomia tradicional, que é baseada em diferenças nas características morfológicas de formas tripomastigotas na corrente sanguínea e na morfometria, o que dificulta a identificação de novas espécies porque uma mesma espécie de *Trypanosoma* pode exibir um grande polimorfismo (MOLINA et al., 2016).

Assim, como ferramenta para auxiliar a taxonomia tradicional das espécies de *Trypanosoma*, as técnicas moleculares têm se mostrado eficazes quando aplicadas às

determinações taxonômicas para identificação de tripanossomas, contribuindo para o posicionamento filogenético do grupo (FIGUEROA et al., 1999; KARLSBAKK; NYLUND, 2006; GU et al., 2007a, b).

Na Baixada Maranhense, a pesca artesanal é realizada como forma de subsistência pelas famílias (SILVA et al., 2016). São Bento e Bacurituba foram os municípios selecionados para estudo por apresentarem a pesca artesanal como principal atividade de sustento e geração de emprego, sendo a principal fonte de subsistência.

As espécies *Hoplias malabaricus* (Traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jeju), *Pygocentrus nattereri* (Piranha Vermelha) e *Tilapia* sp (Tilápia) apresentam grande importância comercial e a sua abundância em áreas dulciaquícolas faz com que sejam utilizados como complemento alimentar. Além disso, essas espécies são encontradas em ampla distribuição na Baixada Maranhense, principalmente em São Bento e Bacurituba onde são pescadas e comercializadas nos municípios de São Vicente de Férrer, Cajapió, Palmeirândia, São João Batista, municípios circunvizinhos, da Baixada Maranhense e também na capital de São Luís, MA.

A ocorrência de *Trypanosoma* em peixes sob condições naturais pode ser inofensivo e não causar alterações patogênicas. Contudo, a complexidade ecológica nos campos da Baixada Maranhense em conformidade com a estação do ano, aliadas a interferência humana, pode afetar a saúde dos peixes e predispor-los às infecções parasitárias, que dependendo do grau, pode levá-los a morte e conseqüentemente reduzir a fonte de complemento alimentar e financeiro das comunidades, que praticam a pesca com fins comerciais e de subsistência, dessa forma, é importante conhecer os principais tripanossomas que infectam peixes, para o entendimento e prevenção das formas de contaminação do pescado e o efeito causado pela ação parasitária.

Dessa forma, tendo em vista a importância social e econômica do peixe de água doce para a microrregião da Baixada Maranhense, o presente estudo tem por objetivo pesquisar *Trypanosoma* em peixes capturados, provenientes de municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense, contribuindo com as pesquisas da cadeia produtiva da pesca extrativa na região servindo de subsídio aos serviços de inspeções estadual e municipal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Pesquisar *Trypanosoma* em peixes capturados, provenientes de municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense.

### **2.2 Específicos**

- Identificar a presença de *Trypanosoma* sp. nos peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (Traíra), *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Jeju), *Pygocentrus nattereri* (Piranha Vermelha) e *Tilapia* sp (Tilápia), provenientes dos municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense;
- Caracterizar através de parâmetros moleculares os tripanossomas identificados dos peixes provenientes da Baixada Maranhense.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Trypanosoma*

O filo Euglenozoa é conhecido por ser um dos maiores grupos de eucariotos incluindo organismos unicelulares flagelados de vida-livre e parasitas de todas as classes de vertebrados, invertebrados e plantas, pertencendo a três ordens principais: Euglenoidea, Diplonemea e Kinetoplastida (CAVALIER-SMITH, 1981; MOREIRA et al., 2001; BUSSE; PREISFELD, 2003; BREGLIA et al., 2007).

A ordem Kinetoplastida possui como principal característica a presença do cinetoplasto, constituído de DNA localizado na base do flagelo, onde encontra-se o Ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial (kDNA). Segundo parâmetros taxonômicos tradicionais, que diz respeito às características morfológicas e ciclos de vida, os cinetoplastídeos foram classificados em duas subordens: Bodonina, que apresentam dois flagelos localizados em lados opostos, e inclui espécies de vida livre e parasitária (ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos); e Trypanosomatina, que apresenta apenas a família Trypanosomatidae, compreendendo protozoários uniflagelados, endoparasitas obrigatórios (HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; STUART; FEAGIN, 1992; DOLEZEL et al., 2000; MOREIRA et al., 2004; SIMPSON et al., 2006; CAVALIER-SMITH, 2004, 2010).

A família Trypanosomatidae engloba parasitas de plantas, invertebrados e todas as ordens de vertebrados, incluindo agentes causadores de várias enfermidades tanto humana quanto animal (SIMPSON; ROGER, 2004), os quais se encontram divididos em 14 gêneros, definidos de acordo com a utilização de parâmetros clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e filogenéticos (monofilia): Parasitas monoxênicos de insetos (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Kentomonas*, *Bleptomonas*, *Sergeia*); gênero *Phytomonas* contém parasitas heteroxênicos de insetos e plantas e gêneros que albergam espécies heteroxênicas que circulam entre hospedeiros invertebrados (vetores) e vertebrados: *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma* (HOARE, 1972; BRANDÃO et al., 2001; PODLIPAEV et al., 2004; SVOBODOVÁ et al., 2007; SANTOS et al., 2007; MAIA DA SILVA et al., 2010; VOTYPKA et al., 2012;).

A primeira descrição do gênero *Trypanosoma*, foi em 1843, por Gruby, para classificar um hemoflagelado de rã que foi nomeado *Trypanosoma sanguinis*, porém como esse parasito apresentava uma estrutura semelhante à do protozoário *Amoeba*

*rotatória*, essa espécie passou, portanto, a ser conhecida como *Trypanosoma rotatorium* (SATO, 2015).

O gênero *Trypanosoma* é constituído por espécies de parasitas que infectam hospedeiros vertebrados de todas as classes (mamíferos, peixes, anfíbios, répteis e aves), são heteroxênicos com ciclos de vida que alternam entre invertebrados e vertebrados, sendo que a maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos pertencentes a diversas ordens e famílias. Estudos de inferências filogenéticas revelaram que os tripanossomas estão agrupados em clados. Inicialmente, apenas três clados do gênero *Trypanosoma*, foram formados, sendo o clado *T. cruzi*, *T. brucei* e o clado aquático. Posteriormente, com o auxílio de análise filogenéticas mais profundas, um grande número de táxons propiciou constituir novos clados (STEVENS et al., 1998; 1999; 2001; HAMILTON et al., 2004; 2007).

Dessa forma, estão estabelecidos nove clados principais: 1) clado aquático que é formado predominantemente por tripanossomas de anuros, peixes e outros vertebrados aquáticos, incluindo um isolado de ornitorrinco e um isolado de tartaruga e isolados de jacarés (FERREIRA et al., 2007; FERMINO et al., 2015); 2) clado de tripanossomas de crocodilianos (FERREIRA et al., 2007); 3) clado *T. theileri* associado a tripanossomas isolados de mamíferos da ordem Artiodactyla e que apresentam significativa especificidade pelo hospedeiro vertebrado, onde os tabanídeos são os principais vetores (RODRIGUES et al., 2006); 4) clado de tripanossomas de lagartos e cobras (FERREIRA et al., 2007; HAMILTON et al., 2007; VIOLA et al., 2008a,b); 5) clado *T. brucei*, tripanossomas de mamíferos de origem africana transmitidos por tsé-tsé (STEVENS et al., 1999; 2001); 6) Clados *T. avium* e *T. corvi*: formado por tripanossomas de aves e artrópodes de vários grupos, aparentemente, sem restrição a espécie do hospedeiro (SEHGAL et al., 2001); 7) clado *T. lewisi* de tripanossomas, principalmente, que parasitam as ordens Rodentia, Lagomorpha e Insetívora. Os organismos desse grupo são transmitidos por pulgas e apresentam especificidade pelo hospedeiro vertebrado (HAMILTON et al., 2005); 8) clado *T. rangeli*; 9) clado *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e *T. cruzi*-like) (HAMILTON et al., 2004, 2005a, b; RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2009 a, b).

No que se refere aos peixes, há mais de cem anos, a ocorrência de *Trypanossoma* vem sendo documentada, entretanto, a quantidade de trabalhos ainda é pequena se comparado com os de outras espécies que acometem mamíferos (SALGADO et al., 2016).

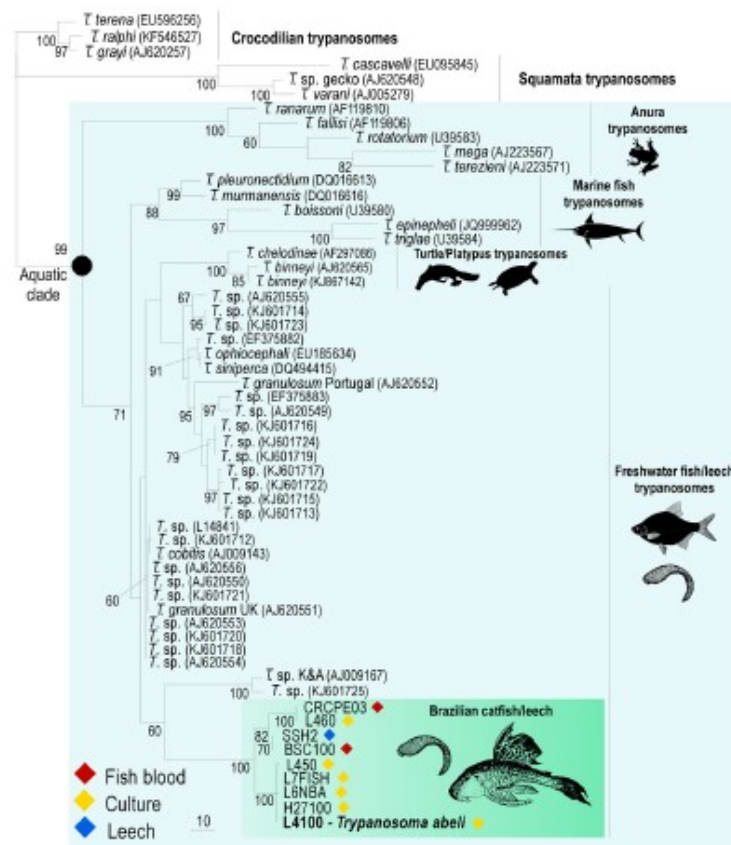
### 3.2 Clado aquático

Tradicionalmente, as filogenias de *Trypanosoma* spp. são baseadas na sequência dos genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) e da enzima gGAPDH, as quais permitem a segregação das espécies em diferentes clados que exibem associações com hospedeiros e origem geográfica (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004; MARCILI et al., 2013). O Clado aquático é formado por espécies de tripanosomas isoladas de peixes, anfíbios, tartarugas e ornitorrinco, sendo agrupados em dois subclados, um formado pelos tripanossomas de anuros, aparentemente transmitidos por flebotomíneos e o outro constituído por tripanossomas de peixes, ornitorrinco e tartarugas, sendo provavelmente transmitidos por sanguessugas (Figura 1) (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004; SIMPSON et al., 2006; FERREIRA et al., 2007, 2008, 2015).

O número de estudos filogenéticos de tripanosomas de peixe têm aumentado nos últimos anos, e esses estudos concentraram-se nos continentes europeu (GIBSON et al., 2005; KARLSBAKK et al., 2006; GRYBCHUK-IEREMENKO, 2014), africano (DAVIES et al., 2005; HAYES et al., 2014) e asiático (GU et al., 2007; 2010; SU et al., 2014) em peixes marinhos e de água doce, sendo justificado esta ocorrência pelo fato de que nesses continentes a principal fonte de alimentação é o peixe, uma vez que segundo a Fao (2016) dos 140,8 milhões de toneladas disponíveis para consumo humano em 2013, a Ásia foi responsável por mais de dois terços partes do total, com 99 milhões de toneladas (23,0 kg per capita), tendo crescido o consumo consideravelmente na Ásia Oriental (10,8 kg em 1961 para 39,2 kg em 2013), sudeste da Ásia (de 13,1 kg a 33,6 kg) e norte da África (de 2,8 kg a 16,4 kg), sendo assim amplamente estudado por ter importância na saúde pública. Esses tripanosomas segregam, em geral, em dois grupos dentro de um clado principal, um para peixes de água doce e um para peixes marinhos (GIBSON et al., 2005; DAVIES et al., 2005; KARLSBAKK et al., 2006, GU et al., 2007b; 2010; SU et al., 2014; HAYES et al., 2014; GRYBCHUK-IEREMENKO, 2014).

No Brasil é necessária uma revisão molecular das espécies de tripanossomas de peixe, pois poucos estudos têm sido incluídos em análise filogenética molecular, tornando escasso o conhecimento acerca desses parasitos.

**Figura 1** - Barcoding e relações filogenéticas de tripanossomas de peixe.



Fonte: Lemos (2015).

### 3.3 Tripanossomas em peixes

A primeira descoberta de *Trypanosoma* de peixe ocorreu em 1841, por Valentin, no sangue de truta (*Salmo fario*). A partir disso, foram identificadas mais de 200 espécies de tripanossomas (LEMONS et al., 2015).

Os conhecimentos de tripanossomas infectando peixes de água doce na África, antes de 1960, foram limitados a aproximadamente treze publicações que descrevem estas espécies, sendo estes registros de peixes da África Ocidental Francesa, Congo, Sudão, Uganda e Moçambique (BAKER, 1960; 1961). Desde 1961, novas espécies de tripanossomas de peixes de água doce foram descritas na África do Sul e Egito (NEGM-ELDIN, 1997; 1998).

Na Europa, Letch (1979), descobriu infecções por tripanossomas em populações britânicas de seis espécies de peixes de diferentes gêneros, porém com uso de critérios morfológicos, estes tripanossomas apresentavam-se morfológicamente indistinguíveis.

No Brasil, há mais de 60 espécies de tripanossomas descritas infectando peixes de água salgada e doce, como *Trypanosoma hypostomi*, *Trypanosoma chagasi*, *Trypanosoma guaibensis* e *Trypanosoma lopesi*, sendo que as famílias de peixes afetadas pelo parasito são diversas, como: Loricariidae (Cascudo), Pimelodidae (Bagre), Doradidae (Peixe-gato), Erythrinidae (Traíra), Synbranchidae (Mussum), Serrasalmididae (Tambaqui), Anostomidae (Piau), Prochilodontidae (Curimatá), Mugilidae (Tainha) e Serranidae (Garoupa) (RIBEIRO et al., 1993; FIGUEROA et al., 1999; SMIT et al., 2004; GU et al., 2007a; KONAS et al., 2010; LEMOS et al., 2015).

Apesar de já existirem no mínimo 200 espécies descritas de tripanossomas que infectam peixes de água doce e marinhos, algumas dessas espécies podem ser sinônimas por serem identificadas com base no hospedeiro de origem em vez da morfologia dos tripomastigotas sanguíneos ou outros métodos moleculares, levando a uma ausência de característica morfométrica e de informação molecular deste grupo de hospedeiros (KARLSBAKK; NYLUND, 2006; GU et al., 2007b; GUPTA; GUPTA, 2012).

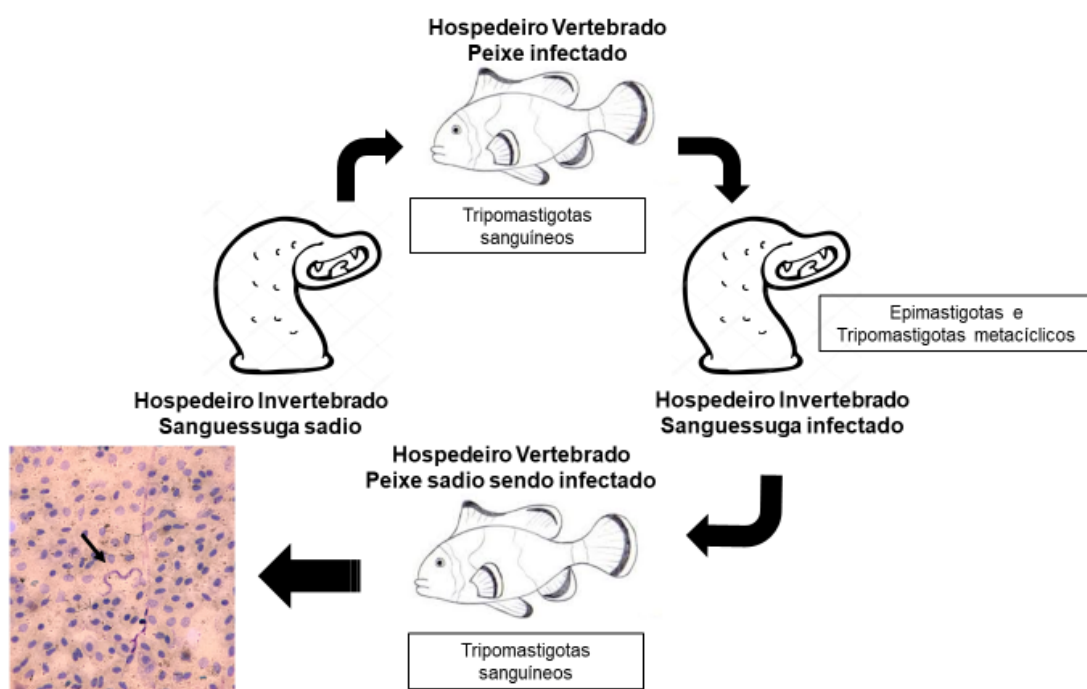
Os tripanossomas isolados de peixes apresentam um ciclo heteroxeno envolvendo um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. A transmissão destes hemoflagelados entre os peixes têm sido atribuída a diferentes espécies de sanguessugas aquática (vetor), onde o parasita se multiplica e sofre transformações morfológicas. O local de predileção destas sanguessugas são as nadadeiras, pele, mucosas e brânquias de peixes de diferentes espécies, onde se encontram fixadas. Apesar de pouco se conhecer sobre as relações parasito-hospedeiro, sabe-se que a infecção do peixe pelo tripanossoma ocorre durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado, não existindo evidências de infecções do peixe pela ingestão de uma sanguessuga infectada (MOLINA et al., 2016).

O vetor se infecta ao ingerir os tripanossomas presentes no sangue dos peixes. Os hemoflagelados, assim que ingeridos, sofrem um processo de excessiva divisão no estômago dos hirudíneos. De início, os parasitas exibem um tamanho reduzido e um pequeno flagelo, se comparado com o comprimento do corpo, após isto, ocorrem razoáveis “alongamentos” até surgirem as formas bem longas. A partir disto, os tripanossomas começam a se mover, para a região anterior dos hirudíneos, atingem a forma tripomastigota metacíclico - forma infectante- e migra para o aparelho bucal do animal, processo este que pode ter duração de três a dezenove dias (KHAN, 1976; MOLINA et al., 2016). A sequência de formas é diretamente associada com a quantidade e com o nível de digestão do sangue ingerido, uma vez que, dos casos em

geral, a forma tripomastigota aparece somente quando o sangue foi digerido em sua totalidade (MOLINA et al., 2016).

Logo após o repasto do hirudíneo, se inicia o desenvolvimento do parasita no hospedeiro vertebrado. Na fase inicial, chamada de pré-patente, os tripanossomas encontram-se ausentes no sangue periférico, não obtendo assim, conhecimento do local onde os parasitas se encontram. A fase patente caracteriza-se pelo aparecimento dos parasitas no sangue periférico, ocorrendo um aumento no número de parasitas, atingindo valores máximos, podendo até a alcançar níveis elevados (Figura 2) (MOLINA et al., 2016). No ambiente natural, a taxa de prevalência destes parasitas sanguíneos é frequentemente alta (SMIT et al., 2004; KONAS et al., 2010). As condições de estresse (alimentação, nutrição, temperatura da água, e competição) induzem o curso da parasitemia em peixes (BARROW, 1958) sendo altamente patogênicos, em alguns casos, levando a graves alterações no sangue, como aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média, aumento na porcentagem de linfócitos, aumento do hematócrito e eritrócitos, diminuição das proteínas plasmáticas totais, entre outras alterações, e pode ocasionar até mesmo a morte do peixe hospedeiro. Apesar disso, ainda não são bem compreendidos, os efeitos destes parasitas na fisiologia do peixe hospedeiro (ISLAM; WOO, 1991; AHMED et al., 2011; FUJIMOTO et al., 2013; LEMOS et al., 2015; MAQBOOL; AHMED, 2016).

**Figura 2** – Ciclo biológico da Tripanossomíase em peixes.



Em relação à patogênese das tripanossomíases de peixes, ainda não há muito conhecimento. Quando com baixos níveis de parasitemia, os parasitas vivem em equilíbrio relativo com seus hospedeiros, todavia, já foram observadas mudanças nos parâmetros hematológicos dos peixes. No caso de parasitemias alta, a infecção pode ser grave, tendo como principais sinais clínicos anemia, leucocitose, hipoglicemia e esplenomegalia, apesar de em sua grande maioria, ser assintomática em peixes infectados (LEMOS et al., 2015; MOLINA et al., 2016).

As relações filogenéticas entre esses hemoflagelados ainda não estão bem definidas, assim como o ciclo de vida dos tripanossomas. Isto ocorre pelo fato de que há poucos estudos para estes parasitas e, deste modo, poucos dados de sequência de DNA para oferecer informações sobre as designações de espécies (LEMOS et al., 2015). Sendo assim, o conhecimento mais aprofundado destes hematozoários permanece limitado.

Pelo fato de os tripanossomas possuírem polimorfismos, a identificação de novas espécies se torna difícil. Um grande entrave que também influencia em novas identificações é a grande variedade de hospedeiros e sua ampla distribuição geográfica. A taxonomia tradicional não é um método confiável para a determinação de novas espécies de *Trypanosoma*, contudo técnicas moleculares demonstraram-se mais eficientes (MOLINA et al., 2016).

Em relação às análises filogenéticas moleculares de tripanossomas de peixes brasileiros, ainda há muito que ser feito, uma vez que esta prática vem sendo utilizada como uma técnica de eleição para a descrição de espécies de tripanossomas (LEMOS et al., 2015).

### **3.4 Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomas: SSU rRNA e gGAPDH**

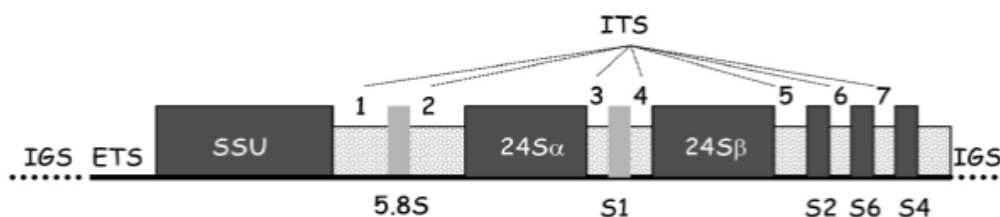
Com a ausência de critérios taxonômicos confiáveis, inúmeros erros de classificação dos tripanossomatídeos em geral tem ocorrido, tendo assim incompatibilidade com evidências demonstradas por dados moleculares. Mesmo que nos dias atuais haja um consenso a respeito de que os critérios devem ter como base a filogenia molecular, esta visão tem sido pouco adotada ou utilizada de forma incorreta. Desde as primeiras análises filogenéticas baseadas em sequências de genes ribossômicos, o uso das sequências gênicas tem sido valioso na reconstrução da história evolutiva desses organismos (SOGIN et al., 1986; FERNANDES et al., 1993).

Diversos grupos têm utilizado os marcadores moleculares, todavia os resultados não são facilmente comparáveis. Inferências de árvores filogenéticas bem resolvidas, até recentemente, foram impedidas pela análise de um número limitado de espécies, concentrados em poucos grupos de tripanossomas. Nos dias atuais, vários genes sequências e marcadores vem sendo utilizados para análise de polimorfismo genético e inferências filogenéticas, sendo os mais utilizados os genes ribossômicos (SSU rRNA), gGAPDH, “spliced leader”, genes mitocondriais e genes codificadores de Catepsina L-like, mais recentemente (LIMA, 2011).

### 3.4.1 Gene que codifica a subunidade menor do RNA Ribossômico (SSU rRNA)

As sequências do gene ribossômico têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre espécies do filo Euglenozoa. Os tripanossomatídeos possuem um dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. Os genes de RNA ribossômico (rRNA) consistem de unidades de repetição compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e são intercalados por um espaçador intergênico (IGS), que se repete em “tandem” em mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição conhecida como pré-rRNA. Após algumas etapas de processamento o pré-rRNA dá origem a três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior), que nestes organismos é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular, 24S $\alpha$  e 24S $\beta$  e quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular (S1, S2, S4 e S6). As subunidades SSU e LSU são constituídas por sequências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores intermediários ITS (ITS 1 e 2, espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) que são flanqueados pelo espaçador intergênico (IGS), que apresenta sequências altamente variáveis (SOGIN et al., 1986; HERNÁNDEZ et al., 1990) (Figura 3).

**Figura 3** - Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNA precursors de tripanossomatídeos.



Fonte: Lima (2011).



Análises da ITS rDNA revelaram variabilidade de *T. cruzi* (FERNANDES et al., 1999; MENDONÇA et al., 2002; MARCILI et al., 2009 a, b, c) e *T. rangeli* (MAIA DA SILVA et al., 2004 a,b; BELTRAME-BOTELHO et al., 2005), espécies de tripanossomas africanos (DESQUENES et al., 2001; NJIRU et al., 2005; CORTEZ et al., 2006). *T. lewisi* (MAIA DA SILVA et al., 2010) e *T. theileri* (subgênero Megatrypanum) (RODRIGUES et al., 2006; GARCIA et al., 2011 a, b).

Esses genes são utilizados para inferências de relacionamentos filogenéticos porque ocorrem e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos e apresentam domínios com diferentes taxas de evolução (SOGIN et al., 1986; HERNÁNDEZ et al., 1990). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de taxas de evolução, faz desses genes excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos (SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 1998; BRISSE et al., 2001; STEVENS et al., 2001; MAIA DA SILVA et al., 2004 b; HAMILTON et al., 2004, 2007; RODRIGUES et al., 2006; CORTEZ et al., 2006; FERREIRA et al., 2007, 2008; VIOLA et al., 2008a, 2009 a,b).

As sequências do gene SSU rRNA são as mais utilizadas devido as seguintes características: pequeno tamanho que permite fácil obtenção por amplificação através do Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos muito confiáveis, com oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (HERNÁNDEZ et al., 1990). Além do mais, existem muitas sequências de SSU rRNA de diferentes espécies e isolados do gênero *Trypanosoma* depositadas em bancos de dados públicos, permitindo assim identificação de novas espécies e a inferência do relacionamento de novas espécies, linhagens e isolados (LIMA, 2011).

#### 3.4.2 Gene codificador da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH)

As espécies da família Trypanosomatidae apresentam uma organela denominada glicossoma que possui enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e glicerol (via glicolítica), sendo essa compartimentalização de enzimas da via glicolítica diferente de outros eucariotos cujas enzimas são citosólicas. A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelos estágios dos tripanossomas no sangue dos mamíferos (HANNAERT et al., 1992). Nos tripanossomas, foram encontrados dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH), semelhante à dos eucariotos em geral, e um gene que codifica

uma enzima citosólica (cGAPDH), mais relacionada com genes bacterianos (MICHELS et al., 1986; KENDALL et al., 1990). Divergências nas sequências desses genes permitiram o desenho de primers para a amplificação específica de gGAPDH (HAMILTON et al., 2005 a,b; 2007) (Figura 4).

**Figura 4** - Representação esquemática dos genes de GAPDH.



Fonte: Lima (2011).

Os genes codificadores de gGAPDH apresentam duas cópias praticamente idênticas e por codificarem proteínas, estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e taxas de evolução se comparados aos genes ribossômicos. Os genes que codificam gGAPDH são excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes (HAMILTON et al., 2004, 2005 a,b, 2007; STEVENS, 2008).

Estudos filogenéticos utilizando sequências de gGAPDH e da região variável V7 e V8 correspondentes a SSU rRNA de um grande número de espécies de tripanossomatídeos geraram topologias congruentes e análises independentes e combinadas desses genes tem sido recomendada na descrição de gêneros, subgêneros e espécies de tripanossomatídeos (HAMILTON et al., 2004, 2005 a, 2009; VIOLA et al., 2009b; MASLOV et al., 2010).

### 3.5 Baixada Maranhense

Com uma área de 1.775.035,6 hectares de extensão, a Baixada Maranhense, é conhecida por corresponder ao nome a umas das sete regiões ecológicas do Estado do Maranhão e constitui também uma Área de Proteção Ambiental – APA (Decreto nº 11.900 de 11 de julho de 1991).

É composta por um ecocomplexo, de rios, lagos, estuários, agroecossistemas, e também de campos naturais, que é definido com um grande sistema de áreas inundáveis, exclusivo desta região do Estado do Maranhão. Possui como principais rios o Turiaçu, Pericumã, Pindaré e Mearim, no qual formam bacias hidrográficas que inundam as planícies baixas regionais, que extravasam anualmente (SOUZA et al., 2007).

Há uma complexidade ecológica nos campos da Baixada Maranhense, que são áreas inundáveis, composta por sistemas de estrutura e funcionamento com diferenciação, constituídos por lagos rasos temporários ocupando os campos abertos quando extravasam dos rios, há também lagoas marginais e sistemas lacustres permanentes (PINHEIRO, 2003).

A dinâmica anual ocorrida nos campos da Baixada Maranhense, é relacionada a topografia, precipitação pluviométrica, escoamento das águas e acúmulo de sedimentos e matéria orgânica (LAFONTAINE et al., 2009).

Na Baixada Maranhense há uma dinâmica com dois ciclos de troca de energia que engloba dois períodos diferentes, em conformidade com a estação do ano. Durante os meses de janeiro a junho, que é conhecido como período chuvoso na região, os lagos perenes e rios extravasam, enchendo assim os campos e modificando-os em extensos lagos com pouca profundidade. Já nos meses de julho a dezembro, conhecido como período de estiagem, os campos se tornam secos facilitando o aparecimento da vegetação (COSTA NETO, 1990).

Há uma abundância de peixes no momento em que o nível do rio começa a baixar, pelo fato do grande acúmulo de água e matéria orgânica no fundo dos lagos. Os cardumes de peixes, que ficaram presos por não terem conseguido retornar ao rio, ficam localizados nas poções, que são as áreas mais profundas dos lagos. Com isso, estes peixes acabam por se tornar alvos fáceis para os predadores e pescadores locais (LAFONTAINE et al., 2009).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

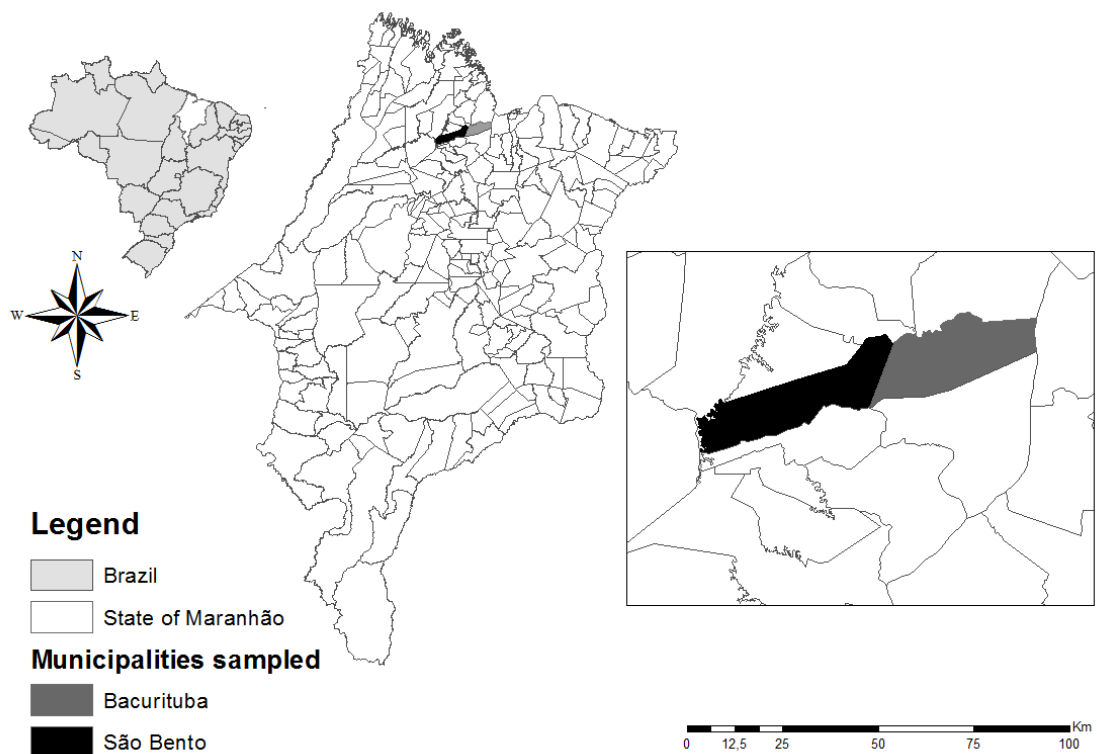
### 4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, processo número 24/2017.

### 4.2 Área de estudo

A microrregião da Baixada Maranhense está localizada na Amazônia Legal Maranhense; uma zona de transição entre os biomas Amazônia e Cerrado, com influência dos ambientes costeiros e marinhos, representando o maior conjunto de bacias lacustres do Nordeste, composta por 32 municípios (BRASIL, 2010). O trabalho foi desenvolvido nos municípios de São Bento (Latitude: 02° 41' 45" S e Longitude: 44° 49' 17" W) e Bacurituba (Latitude: 2° 42' 22" S e Longitude: 44° 44' 18" W). (Figura 5)

**Figura 5**– Mapa do Estado do Maranhão demonstrando a localização da Baixada Maranhense.



Esses municípios apresentam como fonte principal de alimentação os peixes que são obtidos de forma artesanal dos rios. Estes rios transbordam as planícies da região durante o período chuvoso (Figuras 6 e 7). A Baixada Maranhense é caracterizada por relevo plano suavemente ondulado contendo extensas áreas rebaixadas que são alagadas durante o período chuvoso, dando origem a extensos lagos interligado por um sistema de drenagem com canais divagantes, associados aos baixos cursos dos rios Mearim, Grajaú, Pindaré e Pericumã e outros menores. A região fica seis meses seca e seis meses alagada (FREIRE et al., 2014).

**Figura 6-** Campos inundáveis no município de São Bento-MA.



Fonte: Reentrâncias (2010).

**Figura 7-** Campos inundáveis na Baixada Maranhense-MA



Fonte: Mendes (2013).

### **4.3 Obtenção das amostras**

Foram realizadas duas coletas, agosto de 2016 e fevereiro de 2017, de exemplares de peixes de rios e lagos nos municípios de São Bento e Bacurituba. A captura foi realizada através de pesca por rede. Em seguida, os peixes eram encaminhados, ainda vivos, para o Laboratório da Fazenda Escola (FESB)/UEMA.

### **4.4 Coleta de sangue**

Após a insensibilização por hipotermia com duração de 5 minutos, os peixes foram numerados, examinados para a verificação da presença de hirudíneos na superfície do corpo e na boca com auxílio de uma lupa e foram realizadas coletas de sangue, individualmente, com auxílio de uma seringa de 1ml através da punção cardíaca.

### **4.5 Esfregaço sanguíneo**

O sangue obtido foi utilizado para a confecção de cinco lâminas de esfregaços sanguíneos, por amostra, em camada delgada. Os esfregaços sanguíneos foram fixados com metanol, corados com Giemsa (2:30 por 15 minutos) em laboratório e analisados no microscópio óptico no aumento de 1000x. As lâminas de esfregaço foram percorridas por completo em busca de formas tripomastigotas do parasito.

### **4.6 Isolamento de tripanossomatídeos**

Para o isolamento das espécies de tripanossomas as amostras de sangue coletadas foram semeadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood ágar base com 15% sangue de carneiro desfibrinado) e fase líquida de meio BHI (Brain Heart Infusion) acrescidos de soro fetal bovino 10% e antibióticos. O material semeado foi analisado por microscopia óptica comum com objetiva de 40X durante 30 dias uma vez por semana.

### **4.7 Extração de DNA genômico**

O DNA foi extraído através de raspagens de lâminas de esfregaços sanguíneos de peixes identificados positivos para a presença de *Trypanosoma* sp, após avaliação das lâminas por microscopia óptica.

A raspagem das lâminas foi realizada, com auxílio de lâmina de bisturi, em um fluxo laminar. Cada lâmina foi raspada, “lavada” com 200 µl de tampão de digestão e o

material armazenado em tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. O tampão de digestão era composto por 200 mM Tris HCl pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% de Dodecil Sulfato de Sódio e 400ug de Proteinase K por ml. Em seguida, todos os tubos foram colocados na incubadora a 56 °C “overnight” (16 horas).

As amostras foram purificadas segundo o protocolo do GeneJet PCR Purification Kit da Thermo scientific. Para verificação da qualidade e quantificação do DNA, 5ul do material eluído da coluna cromatográfica foi adicionado a 2ul de tampão de corrida (10mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA pH 8.0; 65% de sacarose e 0,1% corante laranja G) contendo GelRed diluído na proporção de 1:500, para análise por eletroforese em Gel de Agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (TBE 1X contém 89mM Tris-base; 89mM de ácido bórico e 20mM de EDTA pH 8.0) O DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

#### **4.8 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

A caracterização molecular foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos descritos na literatura para amplificação de fragmentos dos genes que codificam a região V7V8 da subunidade menor do rRNA; (ULIANA et al., 1991; MAIA DA SILVA et al., 2004b; 2007; RODRIGUES et al., 2006; MARCILI et al., 2009a,b,c) e do gene que codifica o gGAPDH de tripanosomatídeos (HAMILTON et al., 2004, 2007, 2009). O tamanho esperado para cada um dos fragmentos de PCR é de 800-900pb para a região V7V8 da subunidade menor do rRNA e de 600-700pb para o gene que codifica o gGAPDH (LE MOS et al., 2015).

Com volume final de 50 µl foram utilizados os seguintes componentes para a amplificação da região V7V8 SSU rDNA: 31, 8 µl de H<sub>2</sub>O; 5 µl de 10x PCR Buffer + MgCl<sub>2</sub>; 5 µl de dNTPs a2Mm (10x); 0,2 µl (1 unidade) de Taq Polimerase (Hot Start); 2 µl do oligonucleotídeo 609F a 10 µM; 2 µl do oligonucleotídeo 706R a 10 µM e 4 µl de DNA genômico (até 100ng). Em relação a região gGAPDH foram utilizados também 50 µl como volume final, os mesmos componentes utilizados na reação descrita acima, modificando-se os oligonucleotídeos que GAP3F e GAP5R.

A sequência dos oligonucleotídeos utilizados e as condições da reação de PCR estão descritas abaixo:

Forward: 609F 5' – CAC CCG CGG TAA TTC CAG C – 3'

Reverse: 706R 5' - TCT GAG ACT GTA ACC TCA A – 3'

Forward: GAP3F 5' – GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3'

Reverse: GAP5R 5' – CCG AGG ATG YCC TTC ATG – 3'

As condições para amplificação do gene V7V8 SSU rDNA foram:

- 1 ciclo 94°C por 3 minutos;
- 35 ciclos: 94°C por 2 minutos; 48°C por 2 minutos; 72°C por 2 minutos;
- 1 ciclo 72°C por 7 minutos
- 4°C ∞

Como controle de especificidade do produto amplificado, foram realizadas reações de PCR com dois controles positivos (*T. cruzi* e *Leishmania infantum chagasi*) e um negativo com ausência de DNA (H<sub>2</sub>O).

As condições para amplificação do gene gGAPDH foram:

- 1 ciclo 94°C por 3 minutos;
- 40 ciclos 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto;
- 1 ciclo 72°C por 7 minutos;
- 4°C ∞

Como controle de especificidade do produto amplificado, foram realizadas reações de PCR com dois controles positivos (*T. cruzi* e *Leishmania infantum chagasi*) e um negativo sem DNA (H<sub>2</sub>O).

10ul dos produtos amplificados por PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, após adição de tampão de corrida contendo Gel Red, e posteriormente, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

#### **4.9 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos**

Os produtos da PCR foram purificados segundo o protocolo do GeneJet PCR Purification Kit da Thermo scientific.

Para verificação da qualidade e quantificação dos produtos de PCR purificados, cinco uL foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, após adição do tampão de corrida contendo Gel Red. Os fragmentos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados.

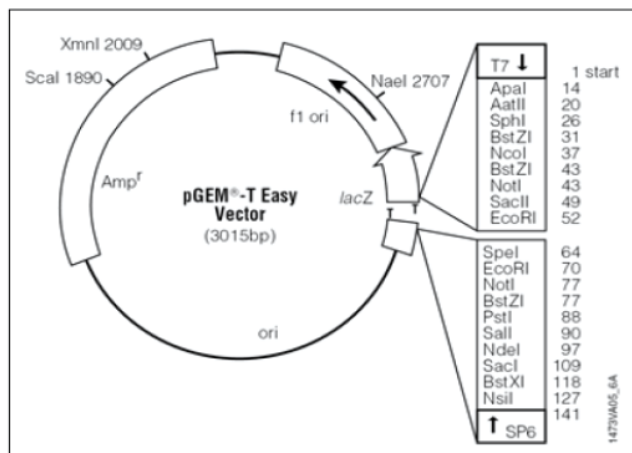
#### **4.10 Clonagem**

Para a etapa de clonagem foi utilizado o kit pGEM-T Easy (Promega) conforme o fabricante, que é definido como um vetor de clonagem linearizado que contém uma timina em ambas extremidades 3'. Com essa característica no sítio de inserção, a eficiência da ligação dos produtos de PCR aumenta, evitando assim a re-circularização do vetor. Além



do mais, acaba por proporcionar uma extremidade compatível com os produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis. (Figura 8)

**Figura 8** - Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T easy. Em destaque o sítio múltiplo de clonagem.



Fonte: Siqueira (2013).

As sequências codificantes dos genes de interesse, amplificadas e adeniladas, foram inseridas no vetor pGEM-T easy através de uma reação de ligação, seguindo o protocolo do fabricante.

Os produtos de ligação foram utilizados na etapa de transformação por método de cloreto de cálcio de bactérias MachT1 (Thermo Scientific/Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. As células foram preparadas para transformação conforme descrito por Inoue et al. (1990) e estocadas em nitrogênio líquido. Foram realizados plaqueamentos em placas de Petri contendo 20mL de meio seletivo LB/AGAR sólido (LB: 8g e AGAR: 6g) suplementado com antibiótico de seleção ampicilina a 50 µg/ml, X-gal a 20 µg/ml e IPTG a 100 µM e incubadas a 37°C “overnight” em estufa.

Após o período de incubação, dez colônias brancas resistentes foram selecionadas e transferidas para um tubo de 1,5ml contendo 50 µl de LB com 50 µg/ml de ampicilina, e deixadas em temperatura ambiente “overnight” para o crescimento dos clones. Para verificar a presença e o tamanho do inserto de cada clone, 2ul da cultura de bactérias foram utilizados para PCR com oligonucleotídeos flanqueadores da região de clonagem, M13F e M13R. As reações de PCR foram feitas em volume final 20 µl e utilizando os seguintes componentes: 12, 3 µl de H<sub>2</sub>O; 2 µl de 10x PCR Buffer + MgCl<sub>2</sub>; 2 µl de dNTPs

– 2mM (10x); 0,1 µl (0,5 unidades) de Taq Polimerase (Hot Start); 0,8 µl de M13F; 0,8 µl de M13R e 2 µl da cultura de bactérias.

Abaixo, segue a sequência de nucleotídeos dos iniciadores M13F e M13R:

Forward: M13F 5' – CCC AgT CAC gAC gTTg TAAAA - 3'

Reverse: M13R 5' – AgC ggA TAA CAA TTT CACACA<sub>gg</sub> – 3'

As condições para amplificação do M13 foram:

- 1 ciclo 94°C por 3 minutos;
- 40 ciclos 94°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto;
- 1 ciclo 72°C por 7 minutos;
- 4°C ∞

Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1% após adição de tampão de corrida e GelRed, sendo posteriormente fotografados em transiluminador de luz ultravioleta. Os clones que apresentaram amplificação de fragmento de PCR com tamanho esperado para os genes que codificam a região V7V8 da fração menor do rRNA de tripanossomatídeos e gGAPDH, foram selecionados e 10 µl da cultura das bactérias correspondentes foram cultivadas em 3ml de meio LB contendo ampicilina.

#### **4.11 Extração dos plasmídeos**

As culturas de bactérias recombinantes tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do Kit GeneJet Plasmid Miniprep da Thermo Scientific, conforme o fabricante. Posteriormente a solução contendo plasmídeos foi devidamente acondicionada para análises destes DNAs com enzimas de restrição e sequenciamento pelo método de Sanger.

#### **4.12 Análise de restrição dos plasmídeos recombinantes**

Para confirmação dos clones recombinantes foi realizada a digestão dos plasmídeos com a enzima *EcoRI*. Foi utilizado 5 µl da solução contendo os plasmídeos, 1 µl de 10x Buffer da enzima *EcoRI*, 3,5 µl de H<sub>2</sub>O e 0,5 µl da enzima *EcoRI*. A reação foi homogeneizada por centrifugação e incubada por 1 hora a 37°C na estufa. Os produtos da digestão foram resolvidos em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, após adição de 2 µl do tampão de corrida contendo Gel Red e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta.

#### **4.13 Sequenciamento de nucleotídeos**

Após confirmação por digestão com enzima de restrição, os clones recombinantes foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit de sequenciamento da

Applied Biosystems, BigDye terminator 3.1. A reação de sequenciamento foi constituída por 3 µl de 5x sequencing buffer (400mM Tris-HCl pH 9.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl de primer M13F ou M13R a 100 mM, 2 µl de Big Dye e 9 µl (aproximadamente 200ng) de plasmídeo.

As condições para a reação de sequenciamento foram:

- 1 ciclo 96°C por 2 minutos;
- 39 ciclos de 96°C por 15 segundos; 50°C por 15 segundos; 60°C por 4 minutos;
- 4°C ∞

Após o sequenciamento, foi realizada a precipitação dos fragmentos produzidos, no qual foram utilizados os seguintes componentes: 1,5 µl de 3M de NaOAc pH 5,2; 1,5 µl de Glicogênio (1 mg/ml) e 36 µl de etanol absoluto. Foram então misturados todos os componentes por inversão e incubados 15 minutos na geladeira. Posteriormente, a solução de precipitação foi centrifugada a 13.400 rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol a 70%. Após centrifugação por 15min a 13.400 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a amostra de DNA foi incubada por 20 minutos a 37°C para secagem. As amostras assim preparadas foram enviadas para separação em sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems), no serviço de sequenciamento do Instituto de Química da USP-SP. As sequências foram analisadas no programa Seqman do pacote de programas DNASTar (NICHOLAS et al., 1997). As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências depositadas no GeneBank.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 103 exemplares de quatro espécies de peixes, pescados de forma artesanal. Destes, 21 foram traíras, 22 jejus, 30 tilápias e 30 piranhas vermelhas.

No momento da inspeção dos peixes, não foi encontrado a presença de hirudíneos, embora tenha sido relatado a identificação destes parasitas nos peixes destas espécies pelos ribeirinhos, em outras ocasiões.

Apesar disto, as sanguessugas são apontadas como vetor de transmissão de *trypanosoma* sp. em peixes, uma vez que o ambiente de água doce em que se encontram é propício para a sua sobrevivência e reprodução. As sanguessugas tem sido sugerida como o mais importante vetor de hemoflagelado para peixes (CORRÊA et al., 2016). Diversas pesquisas, realizadas no Brasil e no mundo tem relatado a presença de hirudíneos parasitando peixes, como na pesquisa realizada por Molina (2010) em São Paulo, onde foram encontrados hirudíneos aderidos na boca, nadadeiras e nas brânquias de 22,9% dos 256 peixes coletados no rio Mogi-Guaçu, localizado no município de Pirassunga, SP. Lemos et al. (2015) também encontraram hirudíneos em seus estudos realizados na cidade de Guarani, no Estado de Minas Gerais, Brasil, onde foram removidos 29 hirudíneos encontrados na pele, boca e barbatanas dos peixes analisados. Em Tapajós no estado do Pará, Corrêa et al. (2016) encontraram hirudíneas nas espécies de *Hypostomus* spp., apresentando frequência de 55,3% de 47 peixes avaliados e no Sul da África. Hayes et al. (2014) encontraram também presença de hirudíneos em sua pesquisa, com frequência de 16% de 92 peixes avaliados.

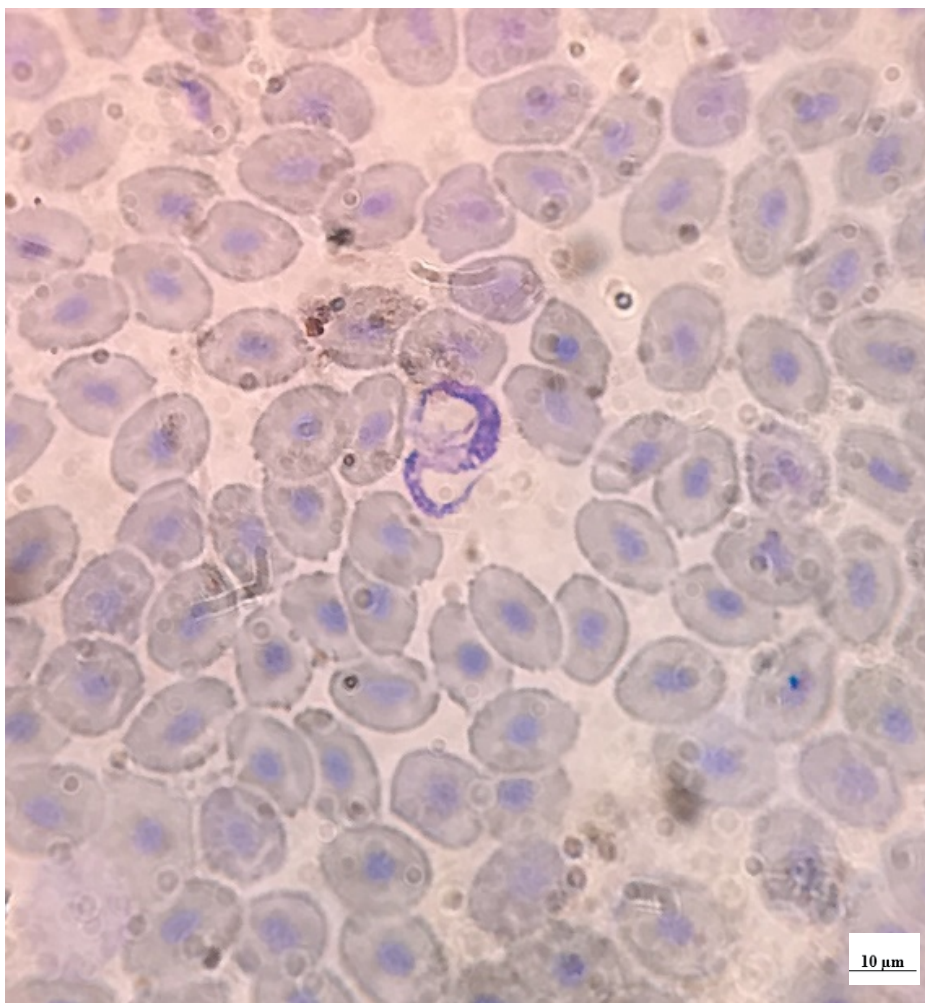
Com relação aos esfregaços sanguíneos, foram observadas formas compatíveis com *Trypanosoma* sp., demonstradas nas figuras 9 e 10, em 51 peixes no total, resultando em uma frequência de 49,51%, sendo 5/21 (23,8%) da espécie *Hoplias malabaricus* (Traíra), 11/22 (50%) de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jeu), 18/30 (60%) de *Pygocentrus nattereri* (Piranha Vermelha) e 17/30 (56,6%) de *Tilapia* sp (Tilápia) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Frequência de *Trypanosoma* sp. em peixes dos municípios São Bento e Bacurituba – Maranhão.

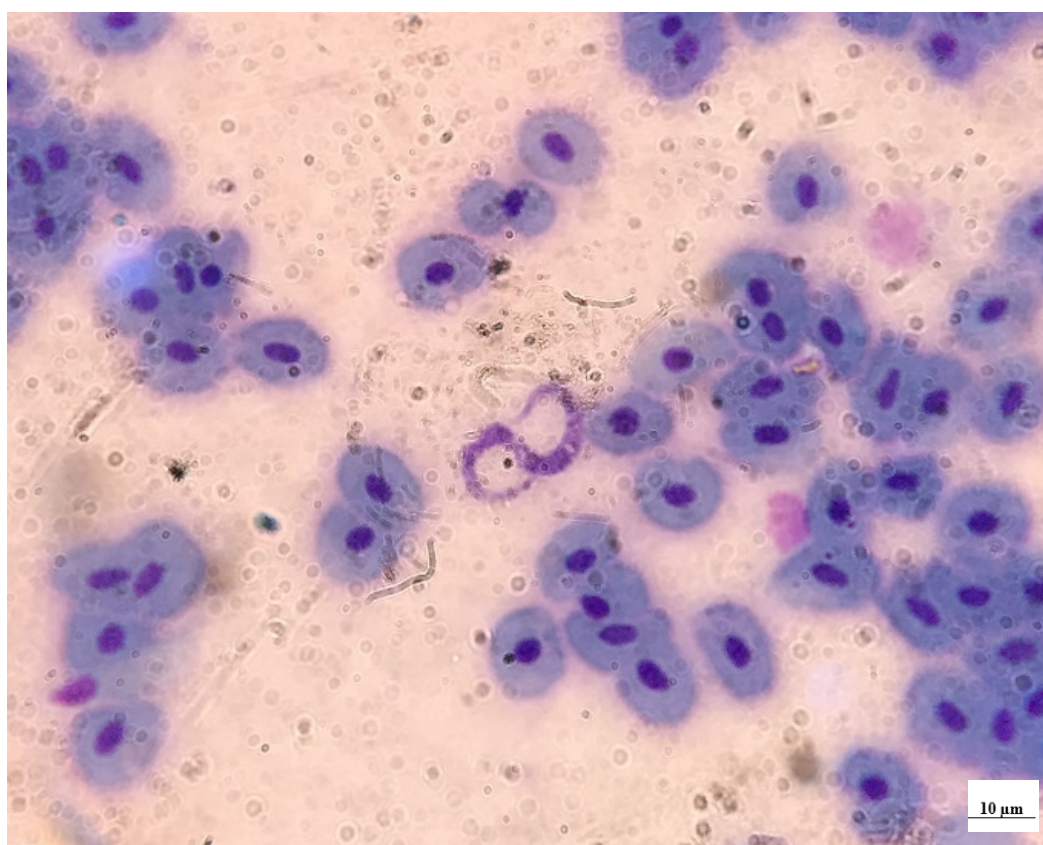
<b>Espécies</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Pygocentrus nattereri</i> (piranha vermelha)	18/30 (60,00%)
<i>Tilapia</i> sp (tilápia)	17/30 (56,60%)
<i>Hoplerthrinus unitaeniatus</i> (jeju)	11/22 (50,00%)
<i>Hoplias malabaricus</i> (traíra)	5/21 (23,80%)
<b>Total</b>	51/103 (49,51%)

Estes resultados corroboram com os trabalhos de Molina et al. (2016), que avaliaram 256 peixes, oriundos do Rio Mogi Guaçu, localizado na cidade de Pirassununga, no estado de São Paulo, Brasil, em que obtiveram em suas pesquisas com os peixes *Hypostomus albopunctatus*, *Hypostomus regani*, e *Hypostomus strigaticeps*, uma prevalência de 47,6% de positividade para *Trypanosoma* sp. Ferreira et al (2013) também encontraram uma prevalência em seu estudo na Província de Limpopo na África do Sul, com 34% de positividade para *Trypanosoma* sp. de 186 peixes avaliados. Pádua et al (2011) encontraram resultado parecido com 30% de prevalência de *Trypanosoma* sp. em seu estudo realizado em peixes coletados no Rio Paraguay, localizado no Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. No estudo de Su et al (2014) foi encontrado a prevalência de 80% de *Trypanosoma* sp. em peixes coletados na China.

**Figura 9** - *Trypanosoma* sp. em esfregaço sanguíneo de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Jezu).



**Figura 10** - *Trypanosoma* sp. em esfregaço sanguíneo de *Hoplias malabaricus* (Traíra).



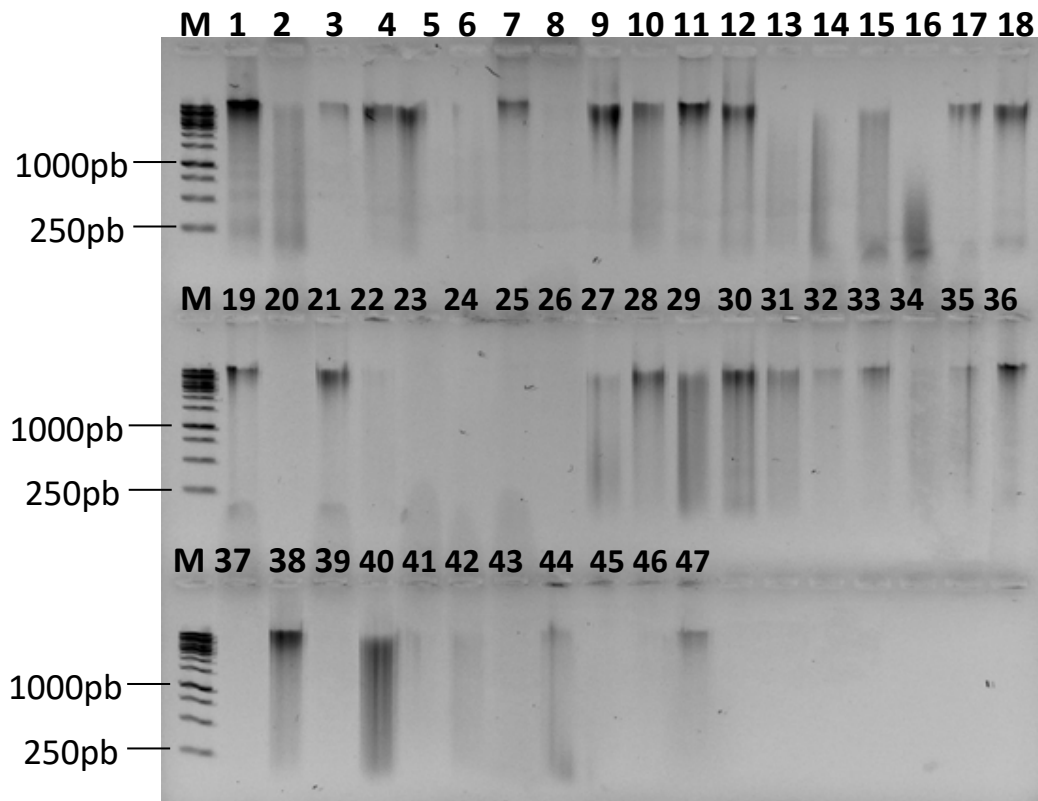
Com relação ao isolamento, nenhuma cultura foi estabelecida, entretanto, dos 103 frascos de cultura utilizados, em 14,56% (15/103) ocorreu contaminação por bactérias e fungos. Para Lemos et al. (2014) vários fatores podem afetar o crescimento da cultura em meios, dentre eles fatores intrínsecos como a não adaptação do parasita ao meio, a ocorrência de cultura mista, ou extrínseco como a contaminação.

Lemos et al. (2014), conseguiram realizar o isolamento, obtendo isolados que foram mantidos por seis meses sob cultura, oriundos de peixes capturados do rio Pomba, cidade de Guarani, estado de Minas Gerais, Brasil, isto aconteceu em função de terem sido testados vários meios líquidos até chegar ao que tivesse bom resultado. Kovacevic et al. (2015) também obtiveram êxito ao tentar isolar *Trypanosoma carassii*, uma vez que utilizaram protocolo diferente como NMGFL-15 contendo 100 U/mL de penicilina/100 mg/ml de estreptomicina, em peixes oriundos de importações aquáticas de Alberga, Canadá.

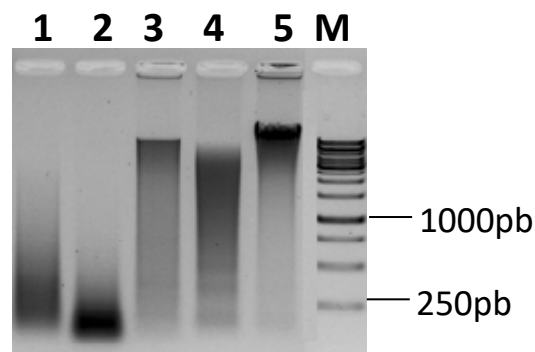
Na ausência de culturas, novas espécies de tripanosomas de peixe foram descritas com base na combinação de dados morfológicos e filogenéticos moleculares de flagelados de sangue (GU et al., 2007b; 2010; SU et al., 2014, HAYES et al., 2014). Entretanto, essa abordagem exige uma avaliação cuidadosa para excluir a possibilidade de infecções mistas, que impedem a associação clara entre sequências de tripanosoma e morfotipos de parasitas encontrados no sangue de peixe, como relatado por Lemos et al. (2015).

Com o intuito de verificar a especificidade dos tripanossomas encontrados por microscopia óptica, o DNA das células do sangue coletado e dos esfregaços sanguíneos de peixes foi extraído. A qualidade e quantidade do DNA obtida foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (figuras 11 e 12). A presença de bandas de alto peso molecular demonstra a boa qualidade do DNA.

**Figura 11** - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo DNA genômico extraído de 47 amostras de esfregaços sanguíneos. M- Gene Ruler 1Kb Ladder (Thermo Scientific)



**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo DNA genômico extraído de cinco amostras de sangue total. M- Gene Ruler 1Kb Ladder (Thermo Scientific)

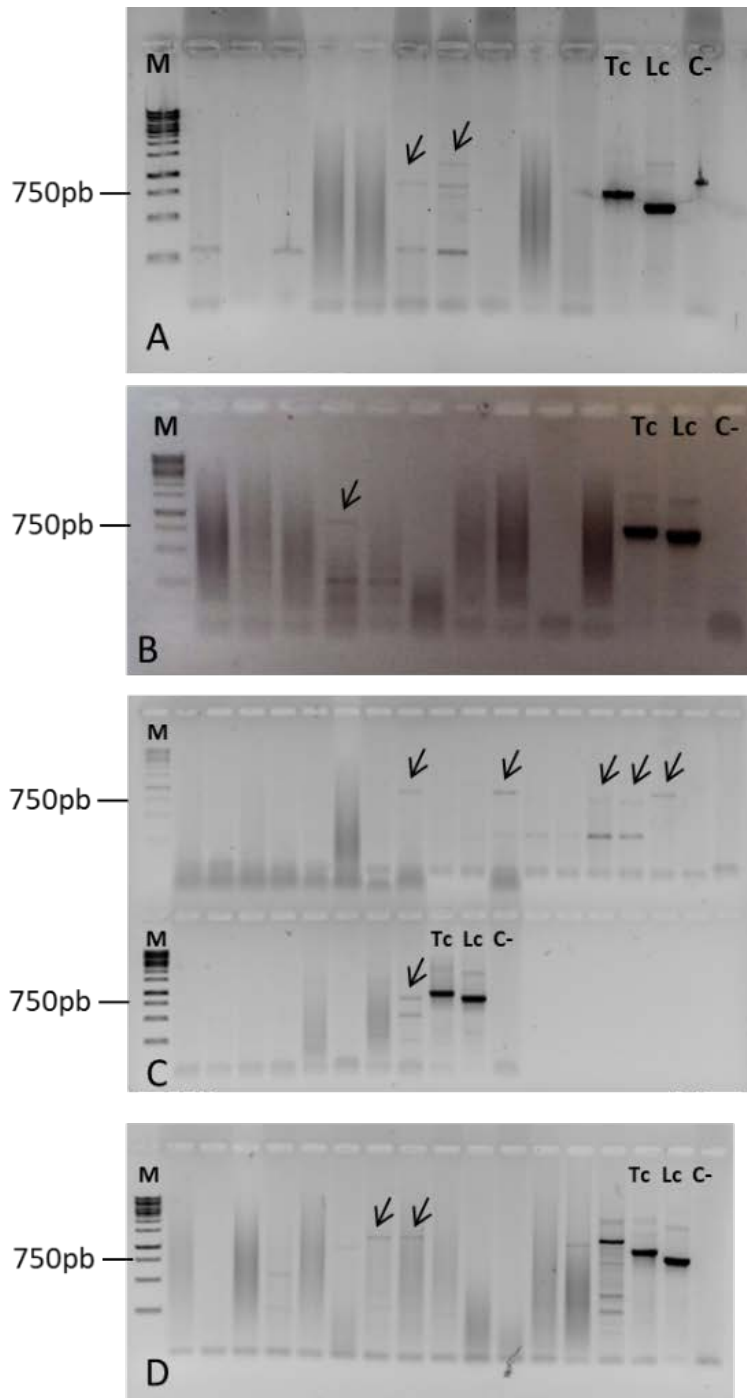


As amostras de DNA foram utilizadas para detecção por PCR do gene que codifica a região variável V7V8 da subunidade menor do rRNA dos tripanossomatídeos, bem como do gene que codifica o gGAPDH do mesmo grupo de organismos. Após PCR com os oligos que amplificam a região V7V8 da subunidade menor do rRNA de



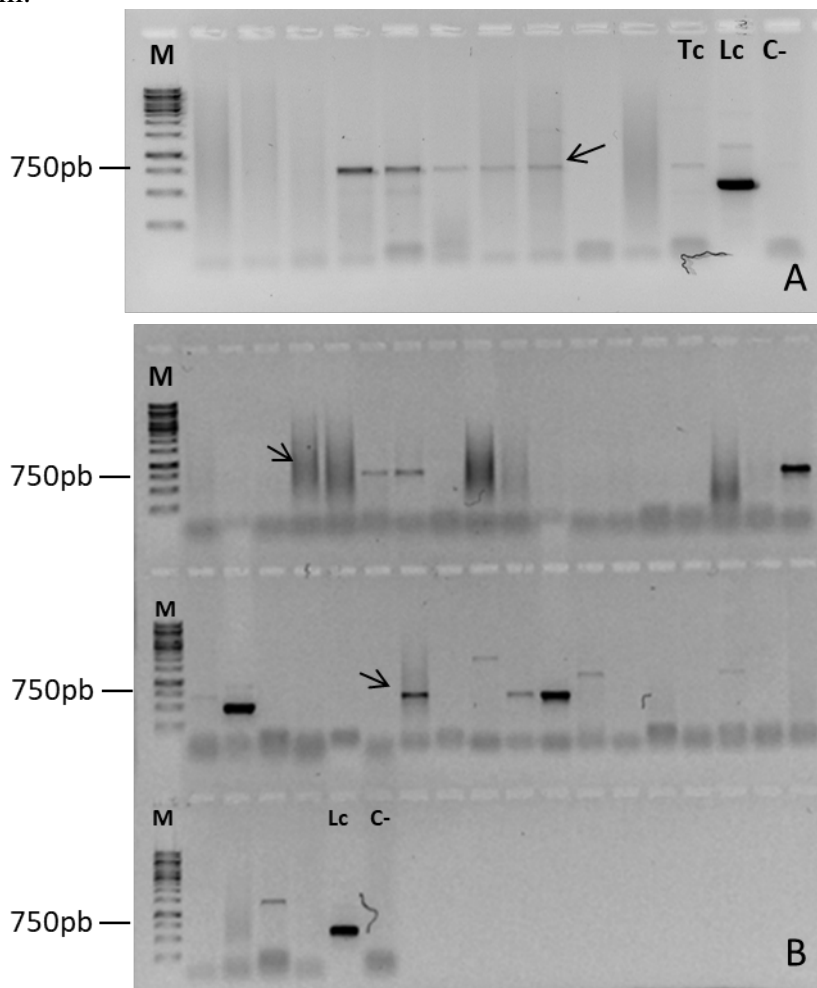
tripanossomatídeos, 15 amostras apresentaram o fragmento de DNA de 800-900pb, conforme apresentado na figura 13.

**Figura 13** - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR para amplificação do fragmento de 800-900pb correspondente ao gene que codifica a região V7V8 da subunidade menor do rRNA de tripanossomatídeos. **A-D**. Diferentes géis de eletroforese; **M**-Gene Ruler 1 Kb ladder (Thermo Scientific); **Tc** – *Trypanosoma cruzi*; **Lc** – *Leishmania infantum chagasi*; **C-**: controle negativo; fragmentos submetidos à clonagem.



Já na amplificação do gene gGAPDH, 22 amostras foram positivas conforme exemplificado na figura 14.

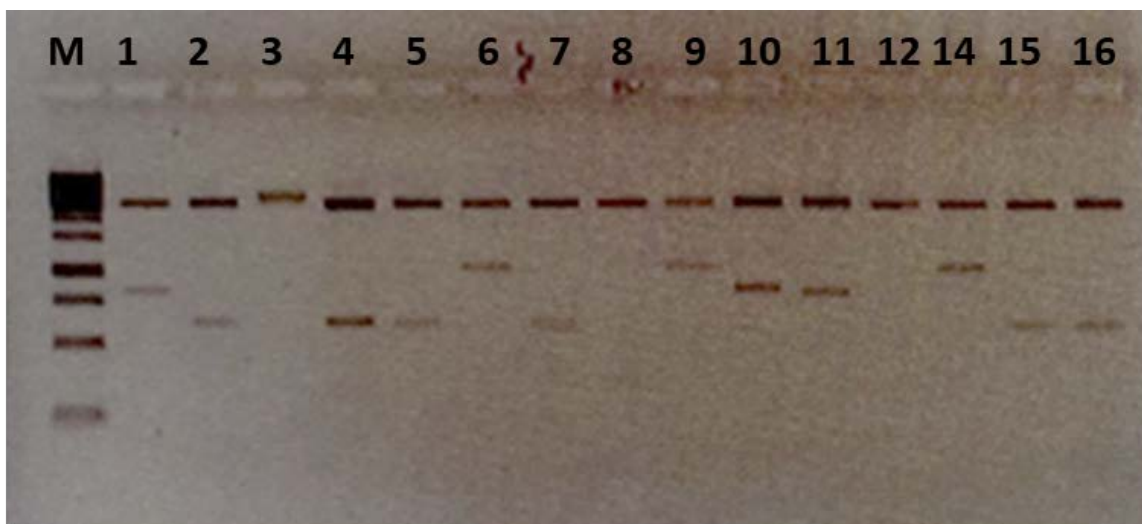
**Figura 14** - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de PCR para amplificação do fragmento de 600-700pb correspondente ao gene que codifica o gGAPDH de tripanossomatídeos. **A, B.** Diferentes géis de eletroforese; **M**-Gene Ruler 1 Kb ladder (Thermo Scientific); **Tc** – *Trypanosoma cruzi*; **Lc** – *Leishmania infantum chagasi*; **C-**: controle negativo; A seta indica o tamanho dos fragmentos submetidos à clonagem.



Os fragmentos de PCR que apresentaram tamanho esperado de aproximadamente 800-900pb e 600-700pb para os genes que codificam a região V7V8 da subunidade menor do rRNA e o gGAPDH, respectivamente, foram purificados e submetidos à clonagem em vetor pGEM-T. No total foram 37 amostras positivas na PCR, obtendo-se clones de 17 amostras, sendo 6 para a região V7V8 e 11 para gGAPDH. O tamanho dos fragmentos clonados pode ser observado na figura 15, após digestão dos clones recombinantes com a enzima de restrição *EcoRI*. Gu et al. (2010) em sua pesquisa com peixes oriundos da Província de Hubei, China, também utilizaram como metodologia a clonagem com a

finalidade de obter um sequenciamento de suas amostras mais fidedigno possível, uma vez que com a clonagem, se consegue aumentar o número de cópias de um único segmento gênico, tornando o resultado do sequenciamento se torna mais preciso.

**Figura 15** - Eletroforese em gel de agarose 1% para análise dos clones recombinantes para os genes que codificam a região V7V8 da subunidade menor do rRNA (1, 6, 9-11, 14) e o gGAPDH (2,4,5,7,15,16) dos tripanossomatídeos. M. Gene Ruler, 1Kb ladder (Thermo Scientific).



Nos resultados obtidos nos sequenciamentos foram encontradas sete sequências de tripanossomas, de três espécies pesquisadas (*Hoplias malabaricus*, *Hoplerhythrinus unitaeniatus*, *Pygocentrus nattereri*). O hospedeiro, gene, localização, identidade e número de acesso encontram-se na tabela 2.

As análises das sequências de tripanossoma de V7V8 SSU rRNA e gGAPDH obtida a partir de amostras de sangue ou esfregaço sanguíneo de 17 peixes revelou que os peixes apresentaram sequências de uma espécie única e foram identificados como uma espécie próxima a *Trypanosoma clandestinus* por análises através do BLAST.

Segundo Fermio et al. (2015), *T. clandestinus* é uma espécie descrita em Jacarés e sanguessugas, filogeneticamente mais relacionada aos tripanossomas de peixes, mais especificamente para tripanossomas de peixes de água doce brasileiros que para qualquer outro tripanossoma do clado aquático ou terrestre. Se tivesse sido encontrado a presença das mesmas espécies de tripanossoma em peixes e jacarés e sanguessugas dos municípios de São Bento e Bacurituba, isto indicaria que haviam ciclos de transmissão entre estas espécies evidenciando uma exposição ao mesmo vetor. Entretanto, embora uma única sequência tenha sido obtida de cada peixe positivo, elas não combinaram completamente

com qualquer sequência no GenBank. A sequência de *Trypanosoma* de peixe determinado neste estudo teve uma divergência entre 3 a 7% da sequência relativa mais próxima, sugerindo que podem representar uma espécie de tripanossoma de peixe que ainda não possuem um DNA barcode, ou seja, uma nova espécie.

Estudos futuros com isolamento, morfometria e análises filogenéticas usando sequências V7V8 SSU rRNA e gGAPDH são necessários para confirmar a presença de novas espécies de tripanossomas de peixes dentro do clado aquático.

Este é o primeiro estudo com *Trypanosoma* em peixes do Nordeste do Brasil e os resultados do presente estudo reforçam a necessidade de caracterização molecular usando abordagens sensíveis para avaliar o repertório de espécies de tripanossoma que infectam esses hospedeiros.

**Tabela 2** – Hospedeiro, gene, identidade e número de acesso de tripanossomas de peixes dos municípios de São Bento e Bacurituba da Baixada Maranhense - Maranhão.

Número do Clone	Hospedeiro	Gene	Descrição	Identidade	Acesso
1	T20_4.5	V7V8	<i>Trypanosoma clandestinus</i> isolate TSC03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	KP768287.1
3	T20_4.9	V7V8	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate TSC62 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	KP768289.1
5	J41_5.3	V7V8	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate BSC388 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	KP768286.1
32	J41_28.7	GAPDH	<i>Trypanosoma clandestinus</i> isolate BSC388 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	97%	KP768262.1
34	J43_30.1	GAPDH	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate BSC97 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	96%	KR107955.1
35	J43_30.4	GAPDH	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate BSC97 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	97%	KR107955.1
39	PV35_31.8	GAPDH	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate BSC97 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	96%	KR107955.1

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

- Os peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (traíra), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju), *Pygocentrus nattereri* (piranha vermelha) e *Tilapia* sp (tilápia), provenientes dos municípios de São Bento e Bacurituba estudados são infectados por parasitos do gênero *Trypanosoma*;
- Os parasitos do gênero *Trypanosoma* obtidos dos peixes provenientes dos municípios de São Bento e Bacurituba foram caracterizados através de parâmetros moleculares com uma espécie próxima a *Trypanosoma clandestinus*, sugerindo que podem representar uma nova espécie de tripanossoma de peixe.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, M. S.; SHAFIQ, K.; ALI, H.; OLLEVIER, F. Pathogenic effects associated with *Trypanosoma danilewskyi* strain FCC 1 infection in juvenile common carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Animals and Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 800-806, 2011.
- BAKER, J. R. Trypanosomes and dactylosomes from the blood of fresh-water fish in East Africa. **Parasitology**, v. 50, p. 515–526, 1960.
- BAKER, J. R. Trypanosomes of African fresh-water fish: an addendum. **Parasitology**, v. 51, p. 263, 1961.
- BARROW, J. H. The biology of *Trypanosoma diemyctyli* Tobey III. Factors influencing the cycle of *Trypanosoma diemyctyli* in the vertebrate host *Triturus v. viridescens*. **Journal of Protozoology**, v. 5, p. 161-170, 1958.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Cadastro Nacional de Unidades de Conservação - CNUC (2010)**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastro-nacional-de-ucs>>. Acesso em 20 setembro 2017.
- BELTRAME-BOTELHO, I.T.; GASPAR-SILVA, D.; STEINDEL, M.; DAVILA, A.M.; GRISARD, E.C. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 5, n. 1, p.17-28, 2005.
- BRANDÃO, A.A; MIRANDA, A.; DEGRAVE, W. M.; SOUSA, M. A. The heterogeneity of choanomastigotes hapred trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. **Parasitology Research**, v. 86, n.10, p. 809-12, 2001.
- BREGLIA, S. A.; SLAMOVITS, C. H; LEANDER, B. S. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 86-92, 2007.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1218-26, 2001.
- BUSSE, I; PREISFELD, A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 617-24, 2003.
- CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine?. **Biosystems**, v. 14, p. 461-81, 1981.
- CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B.**, v. 271, p. 1251-162, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.

CORRÊA, L. L.; OLIVEIRA, M. S. B.; TAVARES-DIAS, M. CECCARELLI, P. S. Infections of *Hypostomus* spp. by *Trypanosoma* spp. and leeches: a study of hematology and record of these hirudineans as potential vectors of these hemoflagellates. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 299-305, 2016.

CORTEZ, A.P.; VENTURA, R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; ANEZ, N.; et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, p. 159-69, 2006.

COSTA NETO, J.P. Bases limnológicas para manejo de tanques de cultivo de peixes – São Carlos. São Paulo-SP, 1990. 240p. 2 v. Tese (**Doutorado**) - Universidade de São Paulo.

DAVIES, A.; GIBSON, W.; FERRIS, V.; BASSON, L.; SMIT, N. Two genotypic groups of morphologically similar fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 66, p. 215–20, 2005.

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DAVILA, A.M. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 610-4, 2001.

DOGIEL, V.A. **Ecology of the parasites of freshwater fishes**. In: V.A. Dogiel, G.K. Petrushevski & Y.I. Polyansky (eds), Parasitology of fishes. Olivier & Boyd, London, p.1-47, 1970.

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

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 pp.

FERMINO, B.R.; PAIVA, F.; SOARES, P.; TAVARES, L.E.R.; VIOLA, L.B.; FERREIRA, R.C.; BOTERO-ARIAS, R.; DE-PAULA, C.D.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; CAMARGO, E.P. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 368-378, 2015.

FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. **Parasitology**, v. 107, p. 219-24, 1993.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.; JUNQUEIRA, A.; JANSEN, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.; et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi*



isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl 1, p. 195-7, 1999.

FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L.B.; TAKATA, C.S.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, p. 1623-38, 2007.

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

FERREIRA, M. L.; AVENANT- OLDEWAGE, A Notes on the occurrence of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in freshwater fishes from South Africa, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 4, 2013.

FERREIRA, J.I.G.S. Diversidade, isolamento e filogenia de parasitas do gênero *Trypanosoma* em vertebrados silvestres da ilha pluvial e Estação Ecológica de Pirapitinga, Minas Gerais. 2015. 67 f. Dissertação (**Mestrado**) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

FIGUEROA, F.; MAYER, W. E.; LOM, J.; DYKOVÁ, I.; WELLER, M.; PECKOVÁ, H.; KLEIN, J. Fish trypanosomes: their position in kinetoplastid phylogeny and variability as determined from 12S rRNA kinetoplast sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 473-481, 1999.

FREIRE, A.T.G.; MENDES, J.J.; BRITO, F.S.; SILVA JUNIOR, C.H.L.; NETO, R.N.L. O ambiente geológico-pedológico das planícies inundáveis do Maranhão e sua fragilidade às ações antrópicas. **XIV Safety, Health and Environment Word Congress**, 2014, Cubatão, Brasil.

FUJIMOTO, R.Y.; NEVES, M.S.; SANTOS, R.F.B.; SOUZA, N.C.; DO COUTO, M. V.S.; LOPES, J. N.S.; DINIZ, D.G.; EIRAS, J. C. Morphological and hematological studies of *Trypanosoma* spp. infecting ornamental armored catfish from Guamá River-PA, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1149-1156, 2013.

GARCIA, H.A.; KAMYINGKIRD, K.; RODRIGUES, A.C.; JITTAPALAPONG, S.; TEIXEIRA, M.M.; DESQUESNES, M. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 363-7, 2011 a.

GARCIA, H.A.; RODRIGUES, A.C.; MARTINKOVIC, F.; MINERVINO, A.H.; CAMPANER, M.; NUNES, V.L.; et al. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships

with genotypes found in other ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 13-14, p. 1385- 96, 2011 b.

GIBSON, W.C.; LOM, J.; PECKOVÁ, H.; FERRIS, V.R.; HAMILTON, P.B.; Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. **Parasitology**, v. 130, p. 405–12, 2005.

GUPTA, N.; GUPTA, D. K. Erythropenia in piscine trypanosomiasis. **Trends Parasitology Research**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2012.

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

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

GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; GONG, X. Redescription of *Trypanosoma siniperca* Chang 1964 from freshwater fish of China based on morphological and molecular data. **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 395-400, 2007a.

GU, Z.; WANG, J.; LI, M.; ZHANG, J.; KE, X.; GONG, X. Morphological and genetic differences of *Trypanosoma* in some Chinese freshwater fishes: difficulties of species identification. **Parasitology Research**, v. 101, p. 723–730, 2007b.

GU, WANG, J.; KE, X.; YANG, L.; LIU, X.; GONG, X.; LI, A. Phylogenetic position of the freshwater fish trypanosome, *Trypanosoma ophiocephali* (Kinetoplastida) inferred from the complete small subunit ribosomal RNA gene sequence. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1039-1042, 2010.

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

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

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; COOKE, B.; BOAG, B.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3167-76, 2005 b.

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

coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, P.B.; ADAMS, E.R.; NJIOKOU, F.; GIBSON, W.C.; CUNY, G.; HERDER, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81-6, 2009.

HANNAERT, V.; BLAAUW, M.; KOHL, L.; ALLERT, S.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1-2, p. 115-26, 1992.

HAYES, P. M.; LAWTON, S. P.; SMIT, N. J.; GIBSON, W. C.; DAVIES, A. J. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 50, p. 1-11, 2014.

HERNÁNDEZ, R.; RIOS, P.; VALDÉS, A.M.; PIÑERO, D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 207-12, 1990.

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

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-8, 1990.

ISLAM, A. K. M. N.; WOO, P. T. K. Anemia and its mechanism in goldfish, *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. **Disease of Aquatic Organisms Journal**; v. 11, n. 1, p. 37-43, 1991.

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

KENDALL, G.; WILDERSPIN, A.F.; ASHALL, F.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. **EMBO Journal**, v.9, p. 2751-8, 1990.

KHAN, R. A. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, p. 1840-9, 1976.

KONAS, E.; GENÇ, E.; KAYA, G.; EROL, C. Occurrence of *Trypanosoma* sp. in wild African sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) from River Asi (north-eastern Mediterranean), Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, v. 34, n. 2, p. 271-273, 2010.

KOVACEVIC, N.; HAGEN, M.O.; XIE, J.; BELOSEVIC, M. The analysis of the acute phase response during the course of *Trypanosoma carassii* infection in the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 53, p. 112-122, 2015.

LAFONTAINE, L.C.; LAFONTAINE, T. C. Campos inundáveis do rio pericumã no entorno da cidade de pinheiro: uma beleza ameaçada pela dinâmica das comunidades rurais. **IV Jornada Internacional de Políticas Públicas**. São Luís – MA. 2009.

LEMOS, M.; SOUTO-PADRÓN, T. Isolation and In Vitro Maintenance of Trypanosomes from Naturally Infected and Commercially Important Brazilian Fish. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 5, p. 687–691, 2014.

LEMOS, M.; FERMINO, B. R.; SIMAS-RODRIGUES, C.; HOFFMANN, L.; SILVA, R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.; SOUTO-PADRÓN, T. 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**, v. 8, n. 573, p. 1-17, 2015.

LETCH, C. A. Host restriction, morphology and isoenzymes among trypanosomes of some British freshwater fishes. **Parasitology**, v. 79, p. 107–117, 1979.

LIMA, L. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África). 2011. 73 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – SP.

LUQUE, J.L. **Parasitologia de peixes marinhos da América do Sul: estado atual e perspectivas**. In: RANZANIPAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. Sanidade de organismos aquáticos. Editora Varela, São Paulo, Brasil, 199-215p. 2004.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v. 128, Pt 3, p. 283-94, 2004 a.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-61, 2004b.

MAIA DA SILVA, F., JUNQUEIRA, A. C., CAMPANER, M., RODRIGUES, A. C., CRISANTE, G., RAMIREZ, L. E., CABALLERO, Z.C., MONTEIRO, F. A., COURA, J. R., AÑEZ, N. and TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3361-73, 2007.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; ORTIZ, P.A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAO-DIAS, J.L.; et al. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *lewisii* from domestic rats to primates. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 522-9, 2010.

MAQBOOL A.; AHMED, I. Haematological response of snow barbell, *Schizothorax plagiostomus* Heckel, naturally infected with a new *Trypanosoma* species. **Journal of Parasitic Disease**; p. 1-10, 2016.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A.C.; VELUDO, H.H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V.L.; TEIXEIRA, M.M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641-55, 2009 a.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; BATISTA, J.S.; JUNQUEIRA, A.C.; SOUZA, A.I.; DA ROSA, J.A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 6, p. 1265-74, 2009 b.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.; DA SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, M.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 615-23, 2009 c.

MARCILI, A.; DA COSTA, A.P.; SOARES, H.S.; ACOSTA, I.C.L.; DE LIMA, J.T.R.; MINERVINO, A.H.H.; GENNARI, S.M. First Report of *Trypanosoma* sp. in Spectacled Caiman (*Caiman crocodilus*): Morphological and Phylogenetic Relationships. **ISRN Parasitology**, 2013. doi: 10.5402/2013/328794.

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

MASLOV, D.A.; YURCHENKO, V.Y.; JIRKŮ, M.; LUKEŠ, J. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 177–188, 2010.

MENDES, J. **Em nome da Baixada Maranhense....**2013. Disponível em: < <http://jailsonmendes.com.br/em-nome-da-baixada-maranhense/>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

MENDONCA, M.B.; NEHME, N.S.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are

defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v. 124, Pt 2, p.177-84, 2002.

MICHELS, P.A.; POLISZCZAK, A.; OSINGA, K.A.; MISSET, O.; VAN BEEUMEN, J.; WIERENGA, R.K.; BORST, P.; OPPERDOES, F.R. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, v. 5, n. 5, p. 1049-56, 1986.

MOLINA, J.P. Caracterização da infecção por tripanossomatídeos (Protozoa: Kinetoplastida) presentes em três espécies de cascudo (Pisces: Loricariidae) do Rio Mogi-Guaçu, SP. 2010. 52 f. Dissertação (**mestrado**) – Universidade Estadual de Campinas – SP.

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

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. 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**, v. 51, p. 2211-9, 2001.

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

NEGM-ELDIN, M. M. *Trypanosoma mukasai* (Hoare, 1932) in its biological vector *Batracobdelloides tricarinata* (Blanchard, 1897) and their life cycles. **Deutsche Tierärztl. Wochenschr**, v. 104, p. 215–219, 1997.

NEGM-ELDIN, M. M. Further studies on *Trypanosoma mukasai* Hoare, 1932 and its biological vector *Batracobdelloides tricarinata* (Blanchard, 1897). **Deutsche Tierärztl. Wochenschr**, v. 105, p. 175–181, 1998.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.Jr. **GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments**. Distributed by the author (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>), 1997.

NJIRU, Z.K.; CONSTANTINE, C.C.; GUYA, S.; CROWTHER, J.; KIRAGU, J.M.; THOMPSON, R.C.; et al. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. **Parasitology research**, v. 95, n. 3, p. 186-92, 2005.

NIKOLSKY, G.V. **The ecology of fishes**. London: Academic Press, 352p. 1963.

PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M.; SATAKE, F.; JERÔNIMO, J.T.; PILARSKI, F. First record of *trypanosoma* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) in tuvira (*Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*) in Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 85-87, 2011.

PINHEIRO, C.U.B. **Uso do conhecimento tradicional na caracterização e monitoramento de mudanças ecológicas no Maranhão - Incorporação de Bases Etnocientíficas na Pesquisa e Ensino de Graduação e Pós-Graduação na UFMA**, Bolsa de Desenvolvimento Científico Regional. 2003.

PODLIPAEV, S.; VOTÝPKA, J.; JIRKŮ, M.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 342-7, 2004.

REENTRÂNCIAS. **O Governo Estadual e as Reentrâncias**. Disponível em: <<http://reentrancias-ma.blogspot.com.br/2010/03/>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; TEIXEIRA, M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215-24, 2006.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A. A.; SATAKE, T.; SALA, M. A.; COSTA, J. R. V. 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, 1993.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572–1574, 2003.

SALGADO, F. O.; RIBEIRO, J. A. B. *Ocorrência e prevalência de hemoparasitas do gênero Trypanosoma (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) em cascudos Liposarcus anisitsi (Siluriformes: Loricariidae)*. **Anais – VIII Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia**, v. 15, n. 6, 2016.

SANTOS, A. L.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ELIAS, C. G.; Vermelho, A. B.; Branquinha, M. H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v. 9, n.8, p. 915-921, 2007.

SATO, L.H. Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomos de anuros da família Leptodactylidae. 2015. 38 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciência Biomédicas.

SILVA, A. S.; GALENO, L. S.; BASTOS, L. S.; JÚNIOR, F. G.; COSTA, F. N. Caracterização da pesca artesanal em municípios da Baixada Maranhense - BRASIL. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 2016-253, 2016.

SILVA-SOUZA, A.T.; SHIBATTA, O.A.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J.G.; DUPAS, F.A. Parasitas de peixes como indicadores de estresse ambiental e Eutrofização. In: Tundisi JG, Matsumura-Tundisi, T, Galli CS, editors. **Eutrofização**

**na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias para gerenciamento e controle.** 1st ed. São Carlos: Instituto Internacional de Ecologia; 2006. p. 373-386.

SIMPSON, A.G.; ROGER, A.J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 201-12, 2004.

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

SMIT, N. J.; VAN AS, J.G.; DAVIES, A.J. Fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. **Folia Parasitologica**, v. 51, n. 4, p. 299-303, 2004.

SIQUEIRA, F.F. Caracterização molecular clonagem e expressão de isoformas da toxina alfa de *Clostridium perfringens* e sua aplicação na imunização de animais. 2013. 104 f. Tese (**Doutorado**) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

SOGIN, M.L.; ELWOOD, H.J.; GUNDERSON, J.H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 5, p. 1383-87, 1986.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MECEDO, A.M.; CAMPBELL, D.; ZINGALES, B. DNA marker define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141-52, 1996.

SOUZA, M.O.; PINHEIRO, C.U.B. Composição de espécies e estado de conservação das matas ciliares do lago cajari, penalva-baixada maranhense-brasil. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu – MG. setembro. 2007.

STAMATAKIS, A. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2688–2690, 2006.

STEVENS, B., COTTON, W. R.; FEINGOLD, G., and MOENG, C.-H. Large-eddy simulations of strongly precipitating, shallow, stratocumulus-topped boundary layers. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 55, p. 3616–3638, 1998.

STEVENS, J.; NOYES, H.; GIBSON, W.C. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 669-76, 1998.

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

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

STEVENS, J.R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226-32, 2008.



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

SU, Y.; FENG, J.; JIANG, J.; GUO, Z.; LIU, G.; XU, L. *Trypanosoma epinepheli* n. sp. (Kinetoplastida) from farmed marine fish in China, the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). **Parasitology Research**, v. 113, p. 11-18, 2014.

SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKES, J.; VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 423-32, 2007.

ULIANA, S.R.B.; AFFONSO, M.H.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER, L.M. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 157-63, 1991.

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

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

VIOLA, L.B.; ALMEIDA, R.S.; FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, MM. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, p.1-11. Epub ahead of print, Nov 4, 2008b.

VIOLA, L.B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 594-602, 2009 a.

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

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

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, p. 105-12, 1998.

ANEXOS



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias  
Curso de Medicina Veterinária  
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)  
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT  
Processo 01200.002200/2015-06 (449) – Emissão 19/06/2015

---

#### DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado "**Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em peixes nativos provenientes de municípios da Baixada Maranhense**" foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 24/2017 aprovado em 03/03/2018, para o período de execução da pesquisa até 2018 pela equipe coordenada pela Profa. Ora. Andréa Pereira da Costa, o membro executor Nayara Mendes Louzeiro e os colaboradores Ora Rita de Maria Seabra Nogueira, Dr. Francisco Borges Costa, Dr. Arlei Marcili, Ora Mareia Aparecida Sperança e Ora. Aline Diniz por atender as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

**São Luís, 05 de março de 2018**

*Alana*

---

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa  
Presidente do CEENCMV/UEMA



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS COMISSÃO DE ÉTICA  
EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT Processo  
01200.002200/2015-06 - 19/06/2015

**PARECER DE APROVAÇÃO**

DATA DA ENTRADA DO PROTOCOLO	NÚMERO DO PROTOCOLO	DATA DA APROVAÇÃO
09/ 06/ 2017	24/2017	03/ 03/ 2018

**TÍTULO DO PROJETO**

Diversidade de parasitas do gênero *Trypanosoma* em peixes nativos provenientes de municípios da Baixada Maranhense

**LOCAL DA EXECUÇÃO (IES/Laboratório)**

Laboratório de Parasitologia

**OBJETIVO**

Conhecer a diversidade de parasitas do *Trypanosoma* em peixes capturados em diferentes épocas sazonais do ano (seca e cheia), provenientes de municípios de São Bento, Bacurituba e Pinheiro da Baixada Maranhense

**ESPÉCIE ANIMAL/RAÇA**

Peixe

**CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA AUTORIZADA**

A seleção dos animais será realizada utilizando amostragem não probabilística por conveniência

**PERÍODO DE EXECUÇÃO DA PESQUISA**

07/2017 a 07/2018

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL/EXECUTOR**

Nayara Mendes Louzeiro (Orientadora: Profa. Ora. Andréa Pereira da Costa)

**EQUIPE/COLABORADORES**

Ora Rita de Maria Seabra Nogueira, Dr. Francisco Borges Costa, Dr. Arlei Marcili, Ora Mareia Aparecida Sperança e Ora. Aline Diniz

05 / 03 / 20 18

  
Presidente da Comissão