



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

*Trypanosoma caninum*, ESTUDO COM ISOLADOS DE  
DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS: ABORDAGEM  
MOLECULAR E MORFOLÓGICA

RIO DE JANEIRO

2013

*Trypanosoma caninum*, ESTUDO COM ISOLADOS DE  
DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS: ABORDAGEM  
MOLECULAR E MORFOLÓGICA

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientado por Maria de Fatima Madeira e Helena Keiko Toma

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B277 Barros, Juliana Helena da Silva

*Trypanosoma caninum*, estudo com isolados de diferentes regiões  
brasileiras: abordagem molecular e morfológica / Juliana Helena da Silva  
Barros. – Rio de Janeiro, 2013.

xiii, 86 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 79-86

1. *Trypanosomatidae*. 2. Cão. 3. PCR. 3. Sequenciamento. 4.  
Microscopia óptica. 5. Microscopia eletrônica. I. Título.

CDD 636.08969363

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

*Trypanosoma caninum*, ESTUDO COM ISOLADOS DE  
DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS: ABORDAGEM  
MOLECULAR E MORFOLÓGICA

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica  
em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa  
Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Maria de Fatima Madeira  
Dra. Helena Keiko Toma

Banca examinadora

---

Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (Presidente) IPEC/Fiocruz

---

Dr. Otílio Machado Pereira Bastos (Componente) UFF

---

Dra. Raquel da Silva Pacheco (Componente) IOC/Fiocruz

---

Dr. Fabiano Borges Figueiredo (Componente) IPEC/Fiocruz

---

Dr. Rodrigo Caldas de Menezes (Componente) IPEC/Fiocruz

---

Dra. Fernanda Nunes Santos (Suplente) ENSP/Fiocruz

*“Bote fé” e a vida terá um sabor novo, terá uma bússola que indica a direção.  
“Bote esperança” e todos os seus dias serão iluminados e o seu  
horizonte já não será escuro, mas luminoso.  
“Bote amor” e a sua existência será como uma casa construída sobre a  
rocha, o seu caminho será alegre, porque encontrará muitos amigos que caminham  
com você.”*

*“A realidade pode mudar, o homem pode mudar. procurem ser vocês os primeiros a  
praticar o bem, a não se acostumarem ao mal e sim, vencê-lo.”*

*“Deus dá as batalhas mais difíceis aos seus melhores soldados.”*

Papa Francisco – JMJ 2013

**Dedico esta tese**

*Aos meus pais, Albano e Heloísa, que tanto amo, que cuidam de mim e me ensinam  
as coisas mais importantes da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito que agradecer... Foram quase quatro anos de muita dedicação e sem a ajuda que tive seria muito mais difícil chegar até aqui... Ninguém faz nada sozinho.

Inicialmente, agradeço a **Deus** e a **Nossa Senhora**, pelo cuidado, por me conduzir no caminho mais correto e me dar forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, **Albano e Heloísa**, por acreditar em mim, pelo apoio e confiança. À minha mãe, por todo amor que me dedica e por estar sempre do meu lado. Ao meu pai, por seu amor, pelos gestos e palavras de estímulo. Agradeço toda a dedicação a mim, vocês são os responsáveis pelo que sou. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, **Josimar**, agradeço por todo apoio, incentivo, pelos inúmeros gestos de carinho, pelo seu sorriso e por toda paciência nos momentos difíceis. Obrigada por estar sempre do meu lado.

À minha orientadora e amiga, **Fátima**, por estes 10 anos de convívio e aprendizado, tanto acadêmico como pessoal. Agradeço pelos ensinamentos desde a iniciação científica. Por me ensinar a fazer ciência com ética e respeito. Obrigada pela confiança, por acreditar na minha capacidade e crescimento profissional e pessoal. Obrigada por me ajudar a chegar até aqui. Sei o quanto foi difícil para você também, mas saiba que fiz o máximo para deixar sempre as coisas mais fáceis. Obrigada mais uma vez, pela oportunidade, por me ajudar a conquistar tantas coisas boas. Serei sua eterna aluna.

À minha “co-orientadora” **Helena**, que me ajudou num momento muito difícil. Obrigada pela sua disponibilidade e disposição. Por me esperar chegar no fim do dia ou aos domingos para fazer experimentos. Sua contribuição foi muito importante para mim.

À **Kátia, Mariana e Priscilla** por entender porque “sumi” durante esse tempo de tese e trabalho; à **Bernadina, Tatiana e Andressa** pelo companheirismo nas noites e nos fins de semana no laboratório; à **Fabiola** pelas dicas nos programas de filogenia.

Ao **Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz** por me acolher e permitir, desde a minha iniciação científica o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao pessoal do **Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/IPEC** pelo convívio, apoio e palavras de motivação.

A todos do **Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos/IOC**, pelo acolhimento, pelo apoio, pela paciência e palavras de incentivo e perseverança. Em especial a Dra. **Ana Jansen**, pelas inúmeras oportunidades que me ofereceu durante a realização desta tese. Saiba que todas foram muito importantes e bem aproveitadas. Muito obrigada pela confiança.

Ao pessoal do **Laboratório de Biologia Molecular e Hematologia/UFRJ**, especial à **Ana** e ao **Sérgio**, pelo apoio e paciência, principalmente nos fins de semana.

A **Plataforma de Sequenciamento (PDTIS/Fiocruz)** e a **Plataforma de Microscopia Eletrônica (IOC/Fiocruz)** pelo apoio na realização dos experimentos nas diferentes técnicas.

À **Fiocruz**, pelo financiamento da bolsa de estudo.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

Esta parte dos agradecimentos é muito difícil, tenho receio de ter esquecido alguém... Mas, enfim, **AGRADECO** a todos que me auxiliaram, diretamente ou indiretamente, a caminhar até aqui.

Barros, JHS. *Trypanosoma caninum*, estudo com isolados de diferentes regiões brasileiras: abordagem molecular e morfológica. Rio de Janeiro, 2013. 86 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

*Trypanosoma caninum* constitui uma nova espécie recentemente descrita na infecção de cães domésticos. Apesar de ainda pouco conhecido e estudado, inúmeros casos da infecção natural por esse agente tem sido registrado em diferentes regiões do Brasil, fato que tem despertado o interesse pelo seu estudo. Esta tese objetivou estudar amostras de *T. caninum* empregando abordagens moleculares e morfológicas. Foram realizados ensaios da PCR utilizando iniciadores para diferentes regiões do gene nuclear (18S rDNA e 24Sa rDNA) e do gene mitocondrial (citocromo b e região dos minicírculos) cujos produtos foram sequenciados e analisados por programas específicos. Empregou-se, também, testamos alvos direcionados para região ITS1 rDNA a partir da técnica de RFLP-PCR. Adicionalmente, foram empregadas análises por microscopia óptica e eletrônica (transmissão e varredura). Das análises moleculares foram obtidos os seguintes resultados: a) foi confirmada a identidade de *T. caninum* em isolados obtidos nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Rio de Janeiro; b) foi verificado que o tamanho da região dos minicírculos de kDNA de *T. caninum* é diferente de outras espécies de tripanosomas e c) Análises filogenéticas revelaram que todos os isolados de *T. caninum* aqui estudados foram agrupados no mesmo cluster, independentemente da precedência geográfica ou marcador genético utilizado. Análises por microscopia óptica mostraram características morfológicas intrigantes, as quais foram confirmadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, revelando a presença de formas epimastigotas atípicas, sem flagelo livre, nos cultivos axênicos. A identificação de novos isolados e o conhecimento da sua distribuição geográfica de *T. caninum* são dados importantes para a compreensão desse novo cenário epidemiológico que está sendo descrito em diferentes regiões do Brasil. Este estudo contribuiu com dados inéditos sobre *T. caninum*, principalmente relacionados aos aspectos morfológicos e genéticos e, representam um avanço no conhecimento biológico e genético deste novo parasito.

**Palavras-chave:** Trypanosomatidae, cão, PCR, sequenciamento, microscopia óptica, microscopia eletrônica.

Barros, JHS. *Trypanosoma caninum*, study with isolates from different Brazilian regions: molecular and morphological approach. Rio de Janeiro, 2013. 86 f. Thesis [PhD Thesis in Clinical Research in Infectious Diseases] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

*Trypanosoma caninum* is a new species recently described from infected domestic dogs. Although still little known and studied, numerous cases of natural infection by this pathogen have been reported from different regions of Brazil, a fact that aroused our interest. In this thesis, we describe the morphological and genetic characteristics of *T. caninum*. Specific regions of nuclear genes (18S rDNA and 24S $\alpha$  rDNA) and mitochondrial genes (cytochrome b and a minicircle region) were amplified using PCR, and the resulting products were sequenced and analyzed using specific programs. It was used also to test targets directed ITS1 rDNA from the RFLP-PCR. The morphology of *T. caninum* was analyzed using light and electron microscopy (scanning and transmission). The results of molecular analyses a) confirmed that the isolates from São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, and Rio de Janeiro were indeed *T. caninum*, b) it was showed that the size of the kDNA minicircle of *T. caninum* is different from that of other trypanosome species and c) phylogenetic analysis revealed that all isolates of *T. caninum* studied here belonged to the same cluster, regardless of precedence, geographic distribution, and the genetic marker used. Light microscopy analysis of axenic cultures revealed intriguing morphological features, such as atypical epimastigotes without free flagella; these findings were confirmed by scanning and transmission electron microscopy. Identification of *T. caninum* from clinical isolates and gathering data on its geographical distribution are important for understanding this new epidemiological scenario in Brazil. Our findings provide original morphological and genetic data on *T. caninum*; these data could be useful for detailed biological and genetic characterization of this newly discovered parasite, mainly related to morphological and genetic aspects, and certainly represents an advance in understanding of this new parasite.

**Keywords:** Trypanosomatidae, dog, PCR, sequencing, light microscopy, electron microscopy

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**bp** – *base pair* / pares de base

**Cyt b** – citocromo b

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucléico

**ETS** – *External transcribed spacers* / Espaçadores transcritos externos

**FCS** – *Fetal serum calf* / Soro fetal bovino

**IGS** – *Ribosomal intergenic spacers* / Espaçadores intergênicos ribossomal

**IPEC/FIOCRUZ** – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz

**IFT** – Transporte intraflagelar

**ITS** – *Internal transcribed spacers* / Espaçadores transcritos internos

**Kb** – *kilobase* / quilobase

**kDNA** – *Kinetoplast Deoxyribonucleic acid* / DNA do cinetoplasto

**LSU** - *Large ribosomal subunit* / Subunidade maior ribossomal

**LV** – Leishmaniose Visceral

**LVC** – Leishmaniose Visceral Canina

**NNN** – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal

**PCR** – *Reaction chain polymerase* / Reação em Cadeia da Polimerase

**PFR** – Haste paraflagelar

**qPCR** – PCR em tempo real

**rDNA** – *Ribosomal Deoxyribonucleic acid* / DNA ribossomal

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism* / Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição

**RT-PCR** – Reação da cadeia da polimerase com transcrição reversa

**SSU** – *Small ribosomal subunit* / Subunidade menor ribossomal

**VigiLeish** – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

## LISTA DE FIGURA E TABELAS

- Figura 1. Árvore filogenética baseada na análise das sequências de 18S rDNA, mostrando classificação dos tripanosomatídeos proposta por Moreira et al., 2004 **5**
- Figura 2: Diagrama representativo mostrando as principais organelas e estruturas encontradas nos tripanosomatídeos. Neste diagrama é mostrado a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* apresentando o reservossomo, estrutura exclusiva do subgênero *Schizotrypanum* **9**
- Figura 3: A. Representação esquemática do axonema com nove duplas de microtúbulos periféricos ao redor de um par central. B. Corte transversal do flagelo. Uma estrutura extra-axonemal, a haste paraflagelar (PFR), também é visível, bem como transporte intraflagellar (IFT) (setas) **10**
- Figura 4: Figura representativa do cistron ribossômico e das subunidades, maior e menor, e espaçadores transcritos internos e externos **16**
- Figura 5. A. Eletromicrografia da rede concatenada de kDNA. B. Rede de kDNA dissociada pela enzima topoisomerase II, mostrando os minicírculos espalhados na figura e uma molécula de maxicírculo identificado pela seta. **18**
- Figura 6: Figura representativa do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, apresentando quatro regiões variáveis de 330 bp e quatro regiões conservadas de 120 bp, dispostas a 90 graus. **18**
- Figura 7. Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com a região do citocromo b (Cyt b) em destaque **20**

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Tripanosomatídeos: conceitos biológicos e taxonômicos</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Organização estrutural dos tripanosomatídeos</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Aspectos moleculares do tripanosomatídeos</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1. Gene ribossômico</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2. DNA do cinetoplasto (kDNA)</b>	<b>16</b>
<b>1.4. <i>Trypanosoma caninum</i></b>	<b>20</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	<b>24</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Artigo 1 - Occurrence of <i>Trypanosoma caninum</i> in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Artigo 2 – Molecular study of <i>Trypanosoma caninum</i> isolates based on different genetic markers</b>	<b>32</b>
<b>3.3. Artigo 3 – Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of <i>Trypanosoma caninum</i></b>	<b>54</b>
<b>4. Discussão geral</b>	<b>71</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências</b>	<b>80</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Tripanosomatídeos: conceitos biológicos e taxonômicos

Os tripanosomatídeos constituem um grupo distinto de protozoários que possuem caracteres particulares, entre os quais se destacam a presença de um único flagelo; a existência de uma estrutura denominada cinetoplasto, contido numa mitocôndria única que se estende ao longo da célula; presença de um citoesqueleto; e a alternância de diferentes estágios evolutivos durante o seu ciclo de vida (Vickerman, 1976). Possuem ampla distribuição na natureza sendo organismos de vida livre ou parasitos de diferentes ordens. De acordo com o número de hospedeiros que participam do seu ciclo biológico são classificados em monoxênicos ou dixênicos. As espécies monoxênicas, conhecidos como “triplanosomatídeos inferiores” são aquelas cujo ciclo evolutivo completa-se em um único hospedeiro, normalmente um artrópode, e englobam os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*. Os representantes desses gêneros geralmente apresentam baixa especificidade aos seus hospedeiros. Apesar de não apresentarem patogenicidade conhecida para o homem e animais, eventualmente têm sido descritos em infecções associadas à imunodepressão, atuando como agentes oportunistas, colocando este grupo de protozoários, também, no “rol” de interesse em Saúde Pública (Pacheco et al., 1998).

Já as espécies dixênicas, alternam seu ciclo biológico entre dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, funcionando este último como vetor. Aqui estão classificados os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* que incluem parasitos de importantes doenças tanto para o homem como para outros animais (Barret et al., 2003; Ministerio da Saúde, 2006) e os gêneros *Endotrypanum* e *Phytomonas* que incluem, respectivamente, parasitos de preguiças e de plantas (Camargo et al., 1999; Franco e Grimaldi, 1999).

Apesar dos tripanosomatídeos compartilharem características celulares únicas que os diferenciam de outros protozoários, morfologicamente são muito heterogêneos. De acordo com o ciclo evolutivo, esses organismos passam por processos de diferenciação com modificações na forma e tamanho do corpo celular, variando de formas ovais a formas piriformes. Estas últimas formas são caracterizadas pela posição e emergência do flagelo em relação ao núcleo e extremidade da célula. A disposição do complexo cinetoplasto/corpo basal/bolsa flagelar e o local de emergência do flagelo desses organismos constitui um dado importante para classificação das diferentes formas evolutivas e conseqüentemente para classificação de determinados gêneros (Vickerman, 1976).

Considerando essas características, os estágios evolutivos presentes nas diferentes fases do ciclo de vida dos tripanosomatídeos são definidos como (Hoare, 1972):

- amastigota: forma oval ou arredondada, flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) que emerge da bolsa flagelar. Esta forma pode ser encontrada no interior das células de hospedeiros infectados, bem como em cultivo axênico;
- epimastigota: forma piriforme, com cinetoplasto localizado na porção anterior do corpo do parasito e próximo ao núcleo. O flagelo emerge lateralmente com a formação de uma pequena membrana ondulante que se exterioriza na região anterior;
- tripomastigota: forma piriforme, alongada com cinetoplasto localizado na porção posterior da célula, local de onde emerge o flagelo que percorre aderido lateralmente a membrana plasmática formando extensa membrana ondulante, tornando-se livre na região anterior;

- promastigota: forma alongada, cinetoplasto localizado na porção anterior do corpo e o flagelo emerge pela extremidade anterior, na porção terminal da célula;
- opistomastigota: forma alongada cujo cinetoplasto está localizado na porção posterior de onde emerge o flagelo, o qual percorre o interior da célula e se exterioriza na porção terminal;
- esferomastigota: forma arredondada cujo flagelo conserva-se parcialmente aderido à célula; constitui uma forma de transição de epimastigota para tripomastigota;
- coanomastigota: forma pequena apresentando corpo curto com extremidade anterior truncada e o flagelo emerge pela extremidade anterior do corpo.

Com exceção da forma coanomastigota e opistomastigota que abrangem parasitos de ciclos monoxenos, todas as outras formas estão presentes em parasitos que necessitam de dois diferentes hospedeiros, isto é, realizam um ciclo dixênico (Hoare, 1972).

Os tripanosomatídeos são organismos complexos, cuja classificação taxonômica sempre foi um desafio. Um fator complicador nesse contexto é a ampla diversidade morfológica, representada pelas diferentes fases evolutivas e ampla diversidade genética, característica que resulta numa considerável plasticidade inter e intra-espécies. Até os anos 60, os estudos taxonômicos baseavam-se quase que exclusivamente na análise das características biológicas e morfológicas, o que retratava caracteres extrínsecos desses organismos (Noble, 1955; Quadri, 1955). A partir dessa abordagem muitas espécies foram descritas, mas frequentemente eram mudadas de posição taxonômica, tanto porque havia imprecisão na definição dos gêneros, quanto porque outras particularidades morfológicas e/ou biológicas iam sendo conhecidas (Baker e Thompson, 1971). Apesar das características morfológicas serem importantes nos processos de identificação, não devem ser utilizadas isoladamente devido à alta

variabilidade, em função dos fatores do meio ambiente “in vitro” e “in vivo” a que esses parasitos são expostos, os quais podem ter influência nesses caracteres.

O século XX foi marcado por diversas descobertas científicas e tecnológicas nas diferentes áreas da ciência e aqui destacamos a descrição do DNA, fato que revolucionou o domínio e conceitos da biologia. Essa descoberta representou um importante passo para o estudo do genoma de diferentes organismos e, nesse contexto estão os tripanosomatídeos, especialmente os agentes causadores de doenças para o homem e para outros animais. Pelo progressivo conhecimento do DNA, inúmeras técnicas baseadas nos conceitos da biologia molecular foram estabelecidas, gerando uma gama de publicações acerca desses extraordinários parasitos. Tal conhecimento foi importante em inúmeros aspectos, sobretudo os relacionados ao campo dos estudos de identificação taxonômica e filogenéticos (Sturn et al., 1990; Briones et al., 1992; Tibayrenc et al., 1993; Souto e Zingales, 1993).

Pela classificação científica clássica, utilizada até então, ficou estabelecido que os tripanosomatídeos estão inseridos no Filo Sarcomastigophora, Classe Mastigophora, Ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Levine et al., 1980), incluindo nela diferentes gêneros. Recentemente, a partir de análises filogenéticas baseadas em comparações de sequências da subunidade 18S do gene ribossomal (18S rDNA), foi sugerido uma nova classificação para os tripanosomatídeos, que ainda é pouco conhecida e utilizada (Moreira et al., 2004). Nesse estudo, os autores relatam que os tripanosomatídeos emergiram da subordem Bodonina e sugerem a seguinte classificação: Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, que se divide em duas subclasses, a subclasse Prokinetoplastina, com a única ordem Prokinetoplastida e a subclasse Metakinetoplastina, apresentando quatro ordens: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida e Trypanosomatida, sendo nesta última inserida a família

Trypanosomatidae. Na figura abaixo (Figura 1) é apresentado a árvore filogenética baseada no estudo de Moreira et al. (2004) no qual uma nova classificação dos tripanosomatídeos é sugerida.

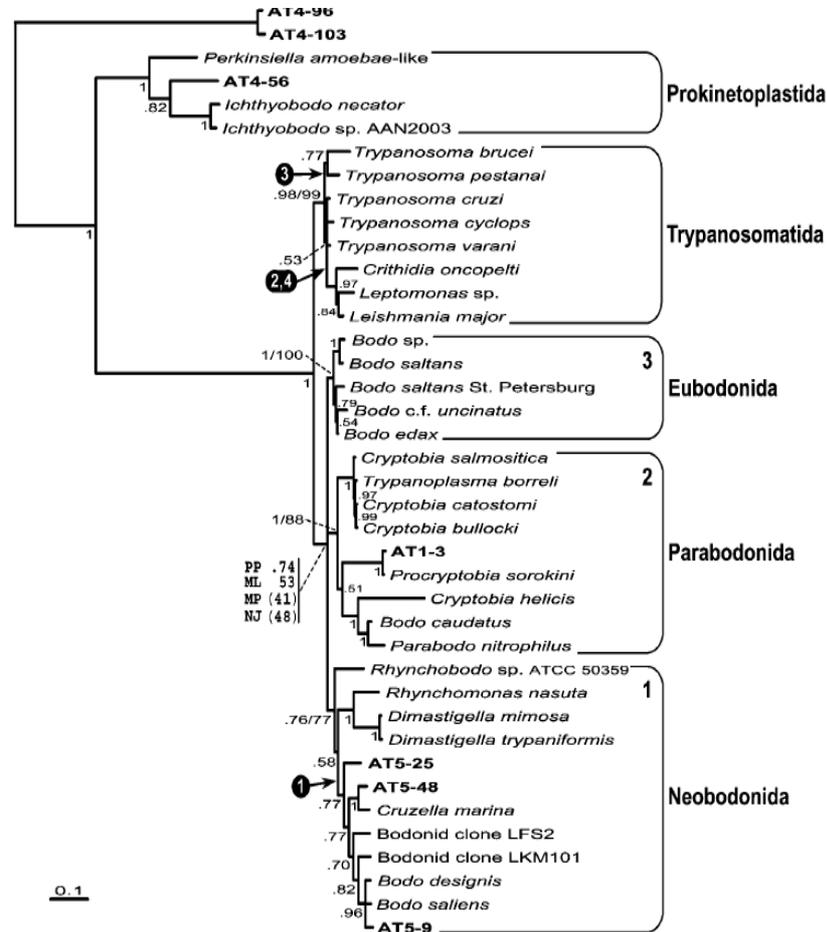


Figura 1. Árvore filogenética baseada na análise das sequências de 18S rDNA, mostrando classificação dos tripanosomatídeos proposta por Moreira et al. (2004).

Na família Trypanosomatidae, todos são parasitos e compreendem os gêneros *Phytomonas* (parasitas de plantas), *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* (parasitos de insetos), *Sauroleishmania* (parasitos encontrados em répteis) e os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum* (parasitos de mamíferos) (Hoare, 1964; Adl et al., 2012).

## 1.2 – Organização estrutural dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são organismos unicelulares que possuem estruturas e organelas que são encontradas em todas as células eucarióticas e outras, especializadas e com funções particulares, que são próprias desse grupo de protozoários. Foi a partir do aprimoramento das técnicas microscópicas, em particular a microscopia eletrônica de transmissão e varredura, que certas estruturas e funções particulares puderam ser conhecidas. A microscopia eletrônica possibilitou um vasto conhecimento nesse campo, fornecendo dados que foram fundamentais para estabelecer diferenças ou semelhanças entre as espécies ou mesmo entre os estágios evolutivos desses organismos (Meyer et al., 1958; Vickerman, 1969; Soares e Sousa, 1987). Abaixo, destacamos algumas das organelas envolvidas nas mais variadas funções da célula dos tripanosomatídeos baseado na revisão de Souza et al. (2009) (Figura 2):

- microtúbulos sub-peliculares: são as estruturas que formam o citoesqueleto celular. Essas estruturas estão presentes em todo o corpo do parasito, exceto na região da bolsa flagelar e se mantêm intactos durante o ciclo evolutivo. Funcionam como uma barreira protetora em relação à ruptura das células por meios mecânicos;
- glicosomo: organela única desses parasitos relacionada a atividade glicolítica e metabólica da célula;
- acidocalcisomo: organela envolvida no armazenamento de íons, na homeostase do pH e na osmorregulação. Atua em estreita associação com o vacúolo contrátil, sendo esta uma organela envolvida em processos de regulação osmótica;
- reservossomo: constitui uma organela exclusiva do estágio epimastigota de parasitos do subgênero *Schyzotrypanum*. Nessa organela ocorre acúmulo de

macromoléculas para endocitose (Soares e Souza, 1988). A atividade endocítica desses organismos ocorre unicamente na região onde está localizado a bolsa flagelar e o citóstoma. Por sua vez, as atividades secretoras são de responsabilidade de um conjunto de organelas, formada pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi e de um sistema de vesículas que brotam do complexo de Golgi e que migram para a bolsa flagelar onde se fundem e descarregam os seus conteúdos para exocitose;

- mitocôndria: nesses organismos essa organela é única e se estende por todo o corpo celular e possui uma região diferenciada denominada de cinetoplasto, contendo uma rede concatenada de DNA;
- cinetoplasto: originalmente, acreditava-se que essa estrutura pudesse estar envolvida com a mobilidade celular, devido a sua localização na base do flagelo. Entretanto, com o aprimoramento da microscopia eletrônica, o papel dessa importante estrutura pôde ser definido. O cinetoplasto dos tripanosomatídeos é uma estrutura altamente organizada que apresenta atividade para certas enzimas da cadeia respiratória e realiza a fosforilação oxidativa. O DNA contido nessa estrutura representa cerca de 20-25% do DNA total da célula e está organizado em uma rede com milhares de moléculas concatenada (maxicírculos e minicírculos). O nome da ordem Kinetoplastida deriva dessa estrutura (kDNA) que é basofílica, podendo ser facilmente observada ao microscópio óptico em preparações coradas por corantes hematológicos;
- flagelo: é uma estrutura altamente sofisticada nesses organismos. Estruturalmente é formado por um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Nesse complexo estão incluídas partículas eletrodensas e outros elementos associados, como a haste

paraflagelar (Figura 3). É exteriorizado da célula através de uma peculiar invaginação da membrana plasmática chamada bolsa flagelar. Diferentes funções estão relacionadas ao flagelo, entre as quais podemos citar primeiramente a mobilidade. Talvez essa função tenha sido uma das primeiras atribuídas ao flagelo, já que é uma estrutura essencial para o deslocamento do parasito, seja no ambiente dos hospedeiros, seja no meio de cultivo. Os parasitos nadam com seu flagelo por ondas que iniciam da porção distal e se propaga até a base (Walker, 1961). Outra importante função do flagelo é a sensorial. O flagelo expressa diferentes proteínas relacionadas a essa função. Antes da aderência aos tecidos do hospedeiro, o parasito precisa reconhecer um substrato ideal para se aderir e proteínas de superfície específicas são recrutadas para a membrana do flagelo para facilitar e mediar essa adesão. A separação do compartimento do flagelo do resto do corpo celular, associado à ação dinâmica do transporte intraflagelar, permite a concentração de proteínas específicas, incluindo aquelas também envolvidas na sinalização celular (Marszalek et al., 2000). O flagelo também expressa proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro ou na proteção quando exposto a ambientes hostis. Além dessas funções principais, o flagelo também possui funções na morfogênese e divisão celular, no controle do tamanho celular e no controle da formação do citoesqueleto durante o processo de divisão celular (Bastin et al., 2000; Kohl et al., 2003).

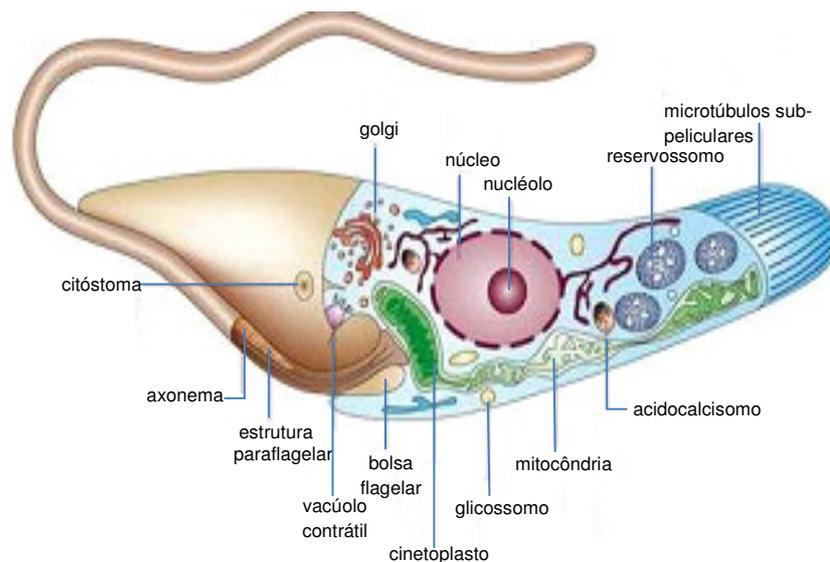


Figura 2: Diagrama representativo mostrando as principais organelas e estruturas encontradas nos tripanosomatídeos. Neste diagrama é mostrado a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* apresentando o reservossomo, estrutura exclusiva do subgênero *Schizotrypanum*. Website: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>

Problemas genéticos que levam a má formação das proteínas estruturais do flagelo podem gerar parasitos mutantes e essa condição tem despertado o interesse de pesquisadores, já que o flagelo, como mencionado acima, está relacionado a importantes atividades dos tripanosomatídeos. Kohl et al. (2003), utilizando *T. brucei* como modelo, observou uma relação direta entre tamanho do corpo do parasito e o tamanho do flagelo em situações quando a formação do flagelo foi de alguma forma perturbada. Quando a formação do flagelo foi totalmente bloqueada, as células aflageladas se apresentaram curtas e perderam sua forma original, indicando que o alongamento do flagelo também controla a formação de estruturas do citoesqueleto desses organismos. Em outro estudo, utilizando *Leishmania donovani*, foi observado que a super-expressão de uma proteína específica pode levar ao desaparecimento total do flagelo (Cuvillier et al., 2000). Embora isto não impeça a viabilidade ou crescimento da célula, os autores não

conseguiram manter essa amostra mutante no ambiente do vetor. Já Zauli et al. (2012) estudando mutantes naturais de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, não encontraram diferenças na viabilidade e infectividade de amostras mutantes para células “in vitro” e para os vetores. Esses resultados comprovam o papel do flagelo em diferentes funções nesses organismos que mostram particularidades quando expostos a diferentes ambientes.

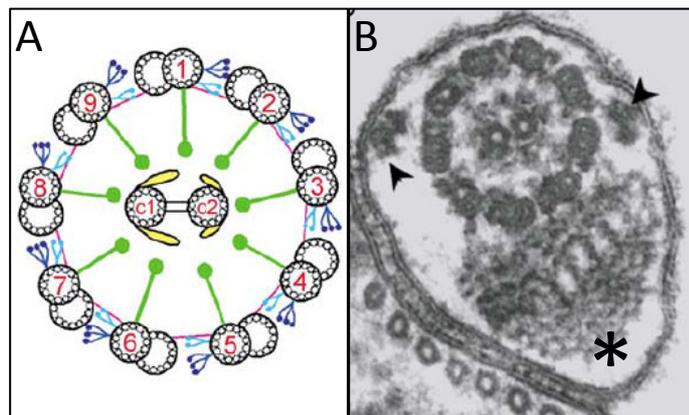


Figura 3: A. Representação esquemática do axonema, mostrando as nove duplas de microtúbulos periféricos ao redor de um par central. B. Corte transversal do flagelo. Uma estrutura extra-axonemal, a haste paraflagelar (PFR) (asterisco), também é visível, bem como transporte intraflagellar (IFT) (setas) (KOHL; BASTIN, 2005)

### 1.3. Aspectos moleculares dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos além de apresentarem processos celulares muito peculiares, como o *trans-splicing*; possuem características bioquímicas e genéticas distintas. A recombinação sexuada nesses organismos é possível, porém não muito frequente; possuem cromossomas que não condensam e, apresentam um cariótipo com grandes variações entre as espécies. Essas características exemplificam a complexidade desse grupo de protozoários (Liu et al., 2010; Routh et al., 2012).

A dificuldade de caracterização utilizando-se somente características morfológicas impulsionou o estudo genético destes organismos, já que são elementos

essenciais para a compreensão de fenômenos patológicos e epidemiológicos. O estudo desses organismos ao nível genético foram iniciados nos anos 60 e um dos primeiros focos foi o DNA do cinetoplasto (kDNA), tanto do maxicírculo quanto do minicírculo. Muitos desses estudos apresentaram como modelo espécies causadoras de doenças, como exemplo *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, agentes respectivos da tripanosomíase americana e africana. No entanto, muito desse conhecimento gerado foi importante para compreensão de aspectos de outras espécies de tripanosomatídeos (Masiga e Gibson, 1990; Masiga et al., 1992).

Paralelamente, o aprimoramento das técnicas envolvendo conceitos da biologia molecular também foi impulsionado, abrindo um leque de metodologias que foram e continuam sendo de grande utilidade para o estudo desses organismos. O advento da reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* - PCR) foi um marco nesse contexto. Essa técnica revolucionou o mundo científico, apoiando estudos com amplas aplicações em diversas áreas da ciência, tais como: diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças genéticas, clonagem de genes, dentre outras. A técnica de PCR trata de uma série de síntese enzimática *in vitro* que permite a geração exponencial de sequências gênicas (Desquesnes e Dávila, 2002). Existem muitas variações dessa técnica e aqui são destacadas algumas como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), *nested*-PCR, PCR *multiplex*, PCR e RT-PCR em tempo real (qPCR). Dentre estas, a *nested*-PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, pois emprega dois ensaios sucessivos da reação da PCR. A segunda etapa de amplificação emprega um par de primers internos e destina-se a amplificar um alvo dentro do produto obtido na primeira etapa de amplificação (Smith et al., 2008).

As análises realizadas a partir dos ensaios da PCR são baseadas no tamanho do produto amplificado, visualizado em gel de agarose, comparando com o padrão de

amostras de referência. Além da detecção e tipagem gênica, a PCR, de acordo com o alvo pesquisado, também pode ser empregado para o estudo e demonstração da diversidade genética, permitindo estabelecer relações filogenéticas entre grupos e populações (Desquesnes et al., 2002; Meissner et al., 2007; Tait et al., 2011).

Devido à importância dos tripanosomatídeos e à ampla diversidade genética desses organismos, o conhecimento de diferentes regiões do genoma foi um tema muito explorado nos últimos anos (Ramirez et al., 2013; Martinkovic et al., 2012; Cavazzana et al., 2010). A escolha do marcador a ser utilizado em estudos dessa natureza depende de vários critérios, entre eles, a praticidade e o custo-benefício da técnica e o objetivo do estudo. Ensaio utilizando alvos moleculares genéricos, como os abrangendo a família, por exemplo) são importantes para descrição de novas espécies, já que são alvos direcionados para regiões conservadas no genoma. São úteis, também, para o desenho de iniciadores (*primers*) espécies-específicos, principalmente para espécies muito estudadas.

Técnicas de sequenciamento também estão sendo aperfeiçoadas, tanto em relação aos equipamentos quanto em relação aos programas de análise (Kim et al., 2013). Atualmente é uma metodologia de fácil acesso, facilitada principalmente pelos serviços de plataformas institucionais. As sequências obtidas a partir do alvo molecular selecionado podem ser comparadas com sequências acessadas em banco de dados públicos, proporcionando análises com ampla cobertura. Um desses bancos é o GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), produzido e mantido pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Trata-se de um banco de sequências de nucleotídeos e suas traduções de proteína as quais estão disponíveis publicamente. O GenBank possui sequências de diferentes organismos produzidas nos mais variados laboratórios, sendo tais dados acessados e citados por milhares de pesquisadores no

mundo inteiro. A análise das sequências de DNA permite, entre outros objetivos, a avaliação direta de sítios polimórficos de DNA, fornecendo dados para inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações (Tibayrenc, 1998; Gibson et al., 2000; Machado et al., 2001).

Outras ferramentas, também baseadas na PCR, têm sido muito empregadas na caracterização etiológica, estudos filogenéticos ou análise de polimorfismos genético entre populações ou espécies de tripanosomatídeos. Entre essas, citamos a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) cujo princípio é simples e se baseia no reconhecimento e clivagem de sítios específicos do DNA por enzimas de restrição. É uma metodologia ainda muito utilizada no estudo do polimorfismo genético entre os tripanosomatídeos (Rodrigues et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Ramirez et al. 2013).

Diferentes segmentos de DNA evoluem em taxas diferentes e essa característica deve ser considerada para a seleção dos alvos moleculares que serão analisados. Regiões de evolução rápida são adequadas para o estudo de organismos mais relacionados, enquanto regiões de evolução mais lenta são mais apropriadas para a comparação de táxons mais divergentes (Dietrich et al., 1993; Eposti et al., 1993; Westenberger et al., 2006).

Um das primeiras pesquisas sobre a identificação de espécies de tripanosoma a partir da PCR foram publicadas por Moser et al. (1989a,b), com amostras de *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. congolense*. Segundo Myler (1993), a diversidade genética intra-espécies e as variações encontradas nos tripanosomatídeos podem ser definidas ao nível tanto da análise do genoma quanto da análise de determinados genes. Em geral, o genoma nuclear mostra considerável plasticidade inter e intra-espécies em termos de número de cromossomos e tamanho (cariótipo molecular). O kDNA também varia consideravelmente entre as espécies, especialmente em termos de tamanho e

diversidade na sequência dos minicírculos e maxicírculos. Ambas regiões, núcleo e cinetoplasto, são amplamente utilizadas no estudo dos tripanosomatídeos.

### 1.3.1 Gene ribossômico

Os genes ribossômicos têm se revelado excelentes marcadores para análises filogenéticas por três razões principais: a) estão distribuídos universalmente, b) são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos e c) apresentam regiões com distintas taxas de evolução. Por esta razão, esses marcadores são extensivamente explorados com os mais variados fins (Hernandez et al., 1990; Dietrich et al., 1993).

Tipicamente, o gene ribossômico (rDNA) é encontrado “*in tandem*”, ou seja, como unidades repetitivas sequencialmente, compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS - *ribosomal intergenic spacer*) (Figura 4). Assim, o rDNA apresenta sequências transcritas (cistrons) alternadas com sequências não transcritas (IGS) (Ramirez e Guevara, 1987; Guevara et al., 1992). Cada unidade de rDNA evolui de forma sincronizada, podendo ser tratada como um único gene (Coleman, 2003; Naegele et al., 2006).

Essas cópias passam por diversas etapas de processamento resultando em uma única unidade de transcrição, composta pelas moléculas da subunidade menor (18S ou SSU – *small subunit*) e da subunidade maior (5.8S e 24S ou LSU – *large subunit*). Nos tripanosomatídeos, a sequência da subunidade maior 24S rDNA é interrompida por um espaçador interno, gerando duas moléculas: 24S $\alpha$  e 24S $\beta$ . Adicionalmente, as regiões transcritas variáveis correspondem as regiões dos espaçadores transcritos externos (ETS - *external transcribed spacers*) e dos espaçadores transcritos internos (ITS - *internal*

*transcribed spacers*), que são divididos em ITS-1 localizada entre as subunidades 18S e 5.8S e o ITS-2, entre 5.8S e 24S (Dietrich et al., 1993).

Enquanto que as sequências das subunidades 18S, 5.8S e 24S rDNA apresentam variações evolutivas lentas, devido a pressão seletiva, em geral por inserções, deleções ou mutações, as sequências das regiões do ITS rDNA evoluem muito mais rapidamente, apresentando regiões variáveis tanto em tamanho como em sequência entre os organismos. As sequências da região do ITS rDNA são relativamente pequenas (cerca de 1-1.2 kb) e rodeadas por segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR, conhecidos como *primers*, são normalmente direcionados. O fato das sequências da região do ITS rDNA evoluírem muito mais rapidamente que as outras regiões do gene ribossômico, coloca essa região como um importante alvo para estudos que envolvem a variabilidade genética (Ferreira et al., 2007; Lima et al., 2008; Auty et al., 2012). Os alvos genéticos do gene ribossômico são amplamente utilizados no estudo molecular de diferentes tripanosomatídeos (Souto et al., 1999; Noyes et al., 1999; Stevens e Gibson, 1999; Hamilton et al., 2004; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008).

Sequências da subunidade do 18S rDNA, têm sido as mais utilizadas devido a diversas características, tais como tamanho, a facilidade de obtenção (amplificação por PCR) e a presença de regiões conservadas que permitem alinhamentos confiáveis (Hamilton e Stevens, 2010; Pinto et al., 2012). Por outro lado, as sequências de ITS-1 e ITS-2 rDNA têm sido usadas como marcadores genéticos para estudos de variabilidade nas comparações de indivíduos da mesma espécie ou entre espécies fortemente relacionadas (Pulido et al. 1996).

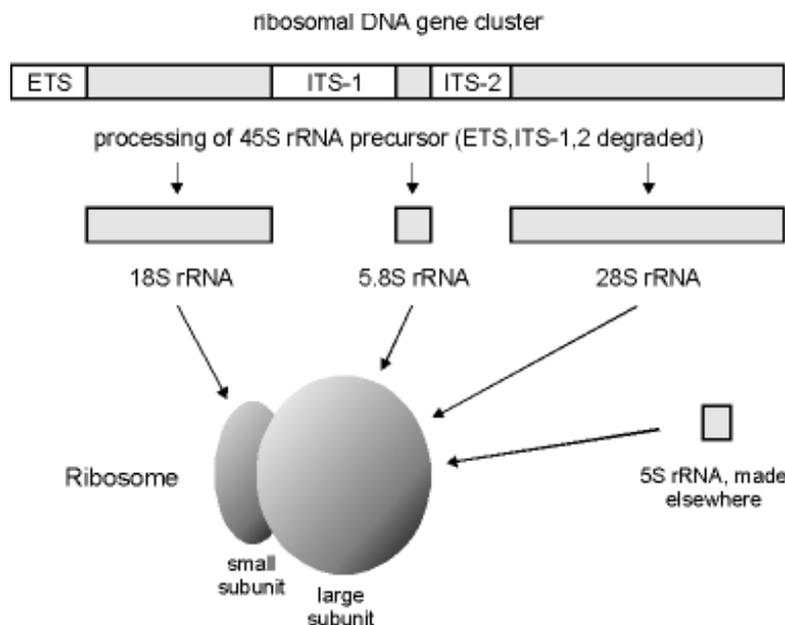


Figura 4: Figura representativa do clonagem ribossômico e das subunidades, maior e menor, e espaçadores transcritos internos e externos. Website: <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bu6/Introduction11.html>

### 1.3.2. DNA do cinetoplasto (kDNA)

Entre as diferentes regiões do genoma dos tripanosomatídeos, o DNA do cinetoplasto (kDNA) é um dos mais peculiares e estudados. Além de ser uma estrutura altamente organizada, a ausência de recombinação e elevado polimorfismo fazem do kDNA um importante alvo molecular no estudo das relações evolutivas entre os tripanosomatídeos. O kDNA representa cerca de 20-25% do total de DNA da célula e está organizado em uma rede formada pela concatenação de milhares de moléculas de DNA circulares, constituído pelos minicírculos e maxicírculos (Figura 5) (Liu et al., 2005).

Os minicírculos são pequenas moléculas que constituem aproximadamente 95% do kDNA e encontram-se com cinco a dez mil cópias na maioria das espécies dos tripanosomatídeos (Shapiro e Englund, 1995). São heterogêneos em sequência, variam em tamanho de 0.5 kb a 2.5 kb e possuem duas regiões distintas: uma conservada e

outra variável. A região conservada apresenta uma sequência nucleotídica de 120 a 200 pb compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA. Nessa região encontram-se pequenos blocos de sequências muito semelhantes entre os diferentes tripanosomatídeos e um destes, idêntico a todos os membros da família conhecido como Sequência Universal dos Minicírculos. Essa região corresponde à origem de replicação de uma das fitas de DNA. Por outro lado, a região variável apresenta alta heterogeneidade nas sequências e difere entre os diferentes minicírculos da mesma rede (Shapiro e Englund, 1995). Acredita-se que a rápida taxa evolutiva da região variável pode ter levado a uma grande diversidade de tipos de moléculas de minicírculos que foram agrupadas em classes. Cada espécie de tripanosomatídeo tem diferentes números de regiões conservadas. Somente uma região conservada foi encontrada em *Crithidia oncopelti*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania tarentole*. Já em *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma lewisi* e *Phytomonas serpens* foram descritas duas cópias da região conservada. Já em *T. cruzi* existem quatro cópias da região conservada, organizado com repetições localizadas a 90 graus (Figura 6). Tal padrão de conservação parece ser exclusivo para *T. cruzi* uma vez que *T. rangeli* apresenta o minicírculo organizado com apenas uma ou mais regiões conservadas (Simpson, 1997; Vallejo et al., 2003). A manutenção dessa organização inalterada nas diferentes linhagens de *T. cruzi*, sugere que os minicírculos possuam um papel funcional ou estrutural. Assim, sequências dos minicírculos representam um parâmetro molecular que pode funcionar como um marcador único em todas as populações de *T. cruzi*, úteis no diagnóstico, apesar do grande polimorfismo genômico observado entre as populações (Junqueira et al., 2005).

Pelo fato dos minicírculos do kDNA possuírem regiões conservadas e variáveis, *primers* puderam ser desenhados para anelar na região conservada e amplificar a região

variável, consequentemente os tornando excelentes alvos nos estudos dos tripanosomatídeos. Foi assim que diversos organismos foram estudados, entre eles *T. cruzi*, o qual apresenta uma região variável de 330bp, independentemente da linhagem (Junqueira et al., 2005). Estes *primers* também anelam nos minicírculos de *T. rangeli*, com amplificação de fragmento de 330 bp, 380 bp e/ou 760 bp , além de outros parasitos do gênero *Trypanosoma* revelando diferentes tamanhos da região variável dos minicírculos do cinetoplasto (Botero et al., 2010).

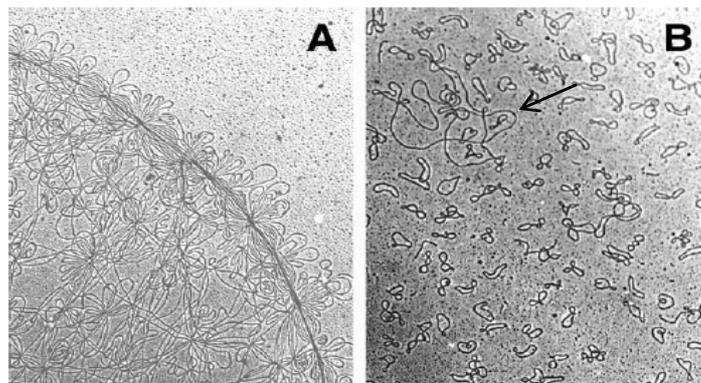


Figura 5. A. Eletromicrografia da rede concatenada de kDNA. B. Rede de kDNA dissociada pela enzima topoisomerase II, mostrando os minicírculos espalhados e uma molécula de maxicírculo identificado pela seta (Liu et al., 2005).

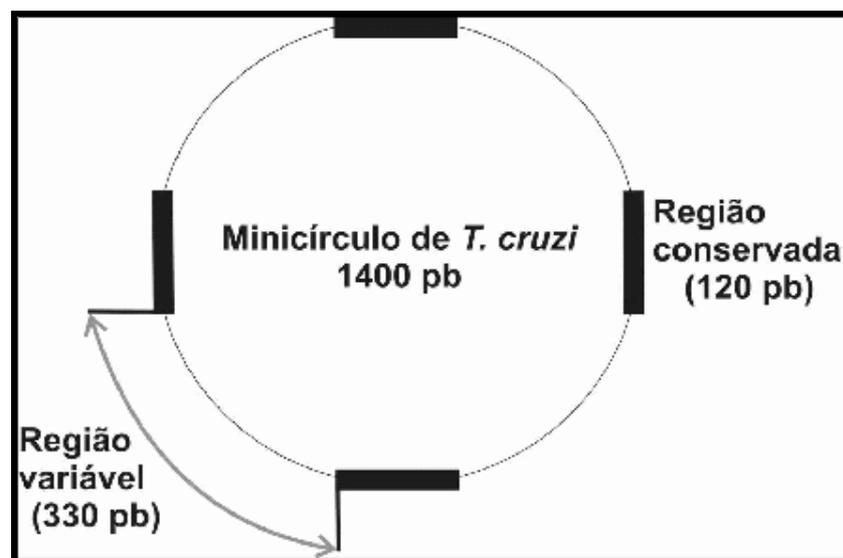


Figura 6: Figura representativa do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*, apresentando quatro regiões variáveis de 330 bp e quatro regiões conservadas de 120 bp, dispostas a 90 graus. Website: <http://dc371.4shared.com/doc/cTu9trDj/preview.html>

Os maxicírculos são moléculas minoritárias (5% do kDNA) e contam com cerca de 20 a 40 kb. São formados por sequências homogêneas e estão presentes de 20 a 50 cópias por rede, codificando os genes mitocondriais estruturais. São homólogos funcionais do DNA mitocondrial de outros eucariotos, pois codificam RNAs ribossomais e diversas proteínas da cadeia respiratória (Westenberger et al., 2006). Dentre as regiões do maxicírculo, o citocromo b (Cyt b) está presente em 10-20 cópias idênticas, sendo cada cópia localizada em um maxicírculo (Figura 7). É provavelmente o gene mitocondrial mais conhecido em relação à sua estrutura e função. O citocromo b codifica uma proteína transportadora de elétrons (ferro-protoporfirina) constituindo um importante marcador taxonômico. Tem sido usado para identificar espécies recém-descritas, assim como aprofundar a compreensão das relações evolutivas dentro das famílias e gêneros devido à sua variabilidade de sequência (Eposti et al., 1993; Westenberger et al., 2006). A partir de estudos baseados em sequências da região do citocromo b, Barnabé et al., (2003) conseguiram separar *T. rangeli* das espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*), confirmou a diferença genética entre *T. cruzi* e *T. cruzi marinkellei* e ainda conseguiu separar esse último em dois grupos.

Outras amostras do gênero *Trypanosoma* infectando morcegos na América do Sul também já foram identificadas utilizando o alvo molecular citocromo b *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* na Bolívia (Garcia et al., 2012) e diferentes espécies do subgênero *Schizotrypanum* no Brasil (Cavazzana et al., 2010).

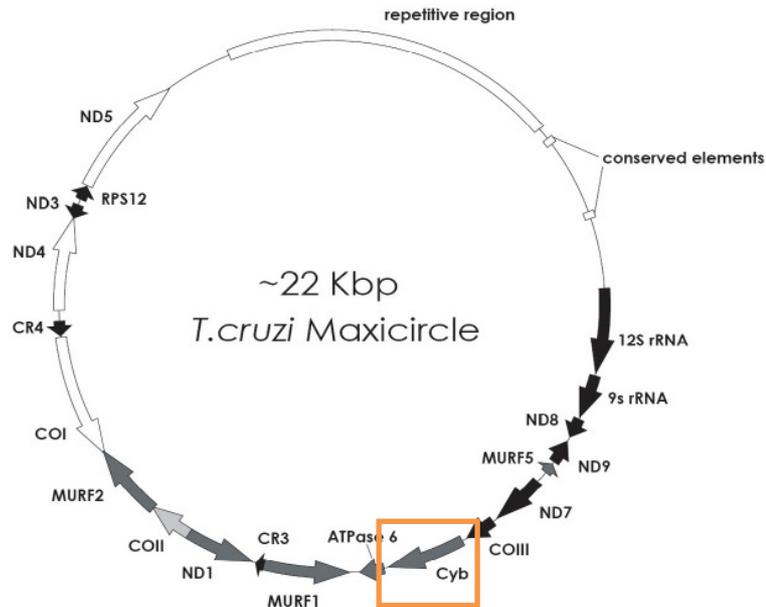


Figura 7. Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com a região do citocromo b (Cyt b) em destaque (Westenberger et al., 2006).

#### 1.4 *Trypanosoma caninum*

*Trypanosoma caninum* é um representante do gênero *Trypanosoma* descrito em 2009 no Brasil infectando cães domésticos (Madeira et al., 2009). Esse parasito foi detectado em um cão co-infectado por *Leishmania braziliensis* no município do Rio de Janeiro. Inicialmente, acreditou-se que tal achado pudesse ter sido ocasional, já que era um agente desconhecido, constituindo na ocasião o único relato. Entretanto, esse agente foi posteriormente encontrado em outros cães no mesmo município (Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011) e também em outras regiões do Brasil (Almeida et al., 2011). Esse fato levantou a hipótese da ocorrência de um ciclo natural desse protozoário entre os cães domésticos, embora aspectos epidemiológicos sejam ainda completamente desconhecidos. Até então já foram descritos 53 casos da infecção natural por *T. caninum*, demonstrando que esse agente possa estar circulando na natureza em maiores proporções daquela estimada inicialmente (Barros et al., 2012).

*T. caninum* é um parasito peculiar, pois apresenta características biológicas que o difere dos membros do gênero *Trypanosoma*. Seu isolamento tem sido feito exclusivamente a partir do cultivo da pele íntegra de cães, sendo frustrantes as tentativas de isolamento em outros espécimes clínicos, como o sangue. Esse dado sugere que *T. caninum* talvez possa habitar tecidos e vasos de circulação periférica e explica a razão desse parasita não ter sido encontrado anteriormente, já que a pele não constitui um alvo para pesquisa de parasitas do gênero *Trypanosoma*. Um dado interessante, mas que precisa ainda ser comprovado é a patogenicidade ou não de *T. caninum*, tendo sido isolado na maioria das vezes de cães saudáveis (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011).

Ferramentas para o diagnóstico da infecção por *T. caninum* ainda estão sendo avaliadas. A primeira abordagem utilizada nesse contexto foi a sorologia. Alves et al., (2012) avaliaram a resposta imune humoral da infecção por *T. caninum* e concluíram que os testes sorológicos talvez não sejam as ferramentas mais adequadas. Os animais respondem fracamente aos testes sorológicos, mesmo quando são empregados antígenos homólogos. Esse dado, se por um lado limita o uso de ferramentas para o diagnóstico de *T. caninum*, por outro, torna-se importante, já que a sorologia constitui a principal ferramenta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).

Na LVC, o diagnóstico é dado quase que exclusivamente pela sorologia e existe uma grande preocupação que *T. caninum* possa confundir esse diagnóstico, já que compartilha o mesmo hospedeiro. Esse fato, associado à importância do estudo de uma nova espécie no âmbito epidemiológico, tem estimulado estudos com diferentes abordagens. Até o momento, todos os isolados de *T. caninum* foram obtidos de regiões endêmicas de LVC.

O fato de *T. caninum* ser isolado de animais sem qualquer sinal clínico de infecção sugere uma possível adaptação a longo tempo desse parasito aos cães. Resultados preliminares também apontam que a infecção canina possa ser transitória, embora isto tenha que ser estudado em detalhes (dados em fase de publicação). Apesar de *T. caninum* ser um agente ainda pouco conhecido e estudado, algumas informações já foram consolidadas, tal como o fato de ser facilmente isolado em meio de cultura axênica a partir de fragmentos de pele. A preservação contínua da espécie isolada é um passo inicial e determinante para o estudo desses parasitos, sendo os meios de cultura desenvolvidos com esse propósito. *T. caninum* cresce muito bem nos meios bifásicos (NNN + Schneider), apresentando todas as formas evolutivas características do gênero *Trypanosoma* (Hoare, 1972). Além disso, *T. caninum* não foi capaz de infectar experimentalmente triatomíneos dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*, fato que sugere que outros artrópodes possam estar atuando como possíveis vetores.

Informações epidemiológicas ainda são escassas e estudos devem ser incentivados, principalmente para esclarecer qual é o real impacto que *T. caninum* possa estar causando em áreas onde as leishmanioses caninas ocorrem, uma vez que compartilham o mesmo hospedeiro.

Assim, considerando a carência de informações que ainda se tem sobre este novo parasito, este estudo visou analisar amostras de *T. caninum*, obtidas de diferentes regiões brasileiras, sob aspectos moleculares buscando obter informações ao nível genético, já que tais estudos são fundamentais na descrição de novas espécies. A partir do conhecimento de sequências nucleotídicas desses parasitos, será possível estabelecer de forma mais segura alvos que possam ser usados na sua classificação em nível taxonômico, frente a outras espécies desse gênero e, analisar o polimorfismo genético entre os isolados já descritos.

Dessa forma, todo o conhecimento adquirido acerca desse novo parasito que está circulando em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, compartilhando ainda os mesmos hospedeiros, será de grande importância e poderá ser considerado nos programas de controle e vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde, principalmente em cenários epidemiológicos, onde diferentes tripanosomatídeos possam ocorrer em sobreposição.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Estudar, sob aspectos moleculares e morfológicos, amostras de *Trypanosoma caninum* obtidas de diferentes regiões brasileiras.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Confirmar a identificação de novos isolados de *T. caninum* através da PCR e sequenciamento da região parcial da subunidade 18S rDNA;
2. Estudar o perfil molecular de *T. caninum* através de PCR e sequenciamento de diferentes regiões do genoma: regiões parciais dos genes nucleares (18S e 24S $\alpha$  rDNA) e dos genes mitocondriais (citocromo b e região variável dos minicírculos);
3. Verificar a existência de variabilidade genética intraespecífica de *T. caninum* a partir da PCR orientada para região espaçadora intergênica (ITS1 rDNA) por diferentes técnicas moleculares;
4. Descrever características morfológicas e ultraestruturais de *T. caninum* a partir da microscopia óptica e eletrônica.

### **3. Resultados**

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados no formato de artigos publicados ou em fase de publicação.

Nesta seção estão anexados três artigos ordenados da seguinte forma:

- **Artigo 1:** Apresenta a caracterização dos casos de *Trypanosoma caninum* descritos em diferentes regiões do Brasil.
- **Artigo 2:** Apresenta e discute a utilização de diferentes alvos e ferramentas moleculares no estudo de *T. caninum*.
- **Artigo 3:** Descreve a presença de formas epimastigotas atípicas encontradas no cultivo axênico de *T. caninum*.

### 3.1 - Artigo 1

---

**Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?**

Artigo publicado na revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 106: 419-23, 2012

---

*Trypanosoma caninum* foi descrito inicialmente no estado do Rio de Janeiro, sendo essa região a única com relatos da presença desse agente. Posteriormente, outras amostras foram isoladas de cães em distintos estados brasileiros, levantando a hipótese da ocorrência de um ciclo natural desse parasito cuja consequência é desconhecida no contexto do controle da leishmaniose visceral. O objetivo principal deste artigo foi a identificação taxonômica de novos isolados e a divulgação da distribuição geográfica de *T. caninum*. As amostras estudadas foram obtidas exclusivamente a partir do cultivo de fragmentos de pele íntegra de cães e foram caracterizados por nested-PCR e sequenciamento da região parcial da subunidade 18S do gene ribossomal. A identidade de *T. caninum* foi confirmada em 33 novas amostras obtidas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Rio de Janeiro, somando-se aos casos já descritos no Rio de Janeiro, totalizando 53 casos descritos até 2012. Todas as amostras de *T. caninum* foram oriundas de cães residentes em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, fato que representa um alerta para a vigilância epidemiológica desse agravo nessas regiões. A publicação deste artigo mostrou a distribuição geográfica de *T. caninum* no Brasil e ampliou a discussão sobre o impacto da presença desse parasito em áreas onde a leishmaniose visceral canina ocorre.

Este artigo responde integralmente ao objetivo nº 1 desta tes



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

### Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?

J.H.S. Barros<sup>a,\*</sup>, A.B.P.F. Almeida<sup>b</sup>, F.B. Figueiredo<sup>c</sup>, V.R.F. Sousa<sup>b</sup>, A. Fagundes<sup>a</sup>, A.G.S. Pinto<sup>a</sup>, C. Baptista<sup>a</sup>, M.F. Madeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, S/N, campus da UFMT, Boa Esperança, Cuiabá, MT, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 20 May 2011

Received in revised form 30 March 2012

Accepted 30 March 2012

Available online 10 May 2012

##### Keywords:

Trypanosomatidae

Dogs

18S rRNA gene

Nested-PCR

#### ABSTRACT

*Trypanosoma caninum* is a parasite of the *Trypanosoma* genus recently described in the natural infection of dogs in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Suspecting the existence of a natural cycle and the circulation of this new species, the objective of this study was the taxonomic identification of samples of *Trypanosoma* spp. isolated from dogs in different Brazilian regions. Parasites were solely obtained from skin fragments culture and characterized by nested-PCR targeting the partial sequence of 18S rRNA gene and PCR products were sequenced. Thirty-three samples, obtained in São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso and Rio de Janeiro states were analyzed. PCR and sequencing showed that the isolates were genetically identical or closely similar and confirmed *T. caninum* identity. This report broadens the geographical distribution of *T. caninum* in Brazil and discusses the impact of the presence of this parasite in areas of canine leishmaniasis occurrence.

© 2012 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The genus *Trypanosoma* includes a complex group of parasites that infect a broad range of hosts worldwide. According to the species, they may infect blood or other tissues, under the trypomastigote or amastigote forms, respectively.<sup>1</sup> Recently, a new species, *Trypanosoma caninum*, was described in domestic dogs in the state of Rio de Janeiro, Brazil, isolated into culture from intact skin fragments; attempts to isolate it from blood or other tissues from naturally infected dogs did not succeed.<sup>2,3</sup> Aspects

related to the biological forms present in the vertebrate host and its natural cycle are still unknown. However, molecular characterisation shows it is not related to *T. cruzi* or *T. rangeli*, and analysis of partial SSU ribosomal DNA sequences give *T. pestanai* and a wombat trypanosome as the closest matches.

In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) is a serious public health problem and the domestic dog is one of the targets for control actions because it is considered a major reservoir of *Leishmania (L.) chagasi* (= *L. infantum*), the VL etiologic agent.<sup>4</sup> The Brazilian leishmaniasis control program recommends diagnosis and euthanasia of sera reactive dogs as control measures for VL.<sup>5</sup> In this context, the presence of other trypanosomatids, besides *Leishmania* parasites, infecting domestic dogs in overlapping areas,

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 21 38659541.  
E-mail address: juliana.helena@ipecc.fiocruz.br (J.H.S. Barros).

may constitute a confounding factor in canine diagnosis, since surveys are based on serological tools for the identification of positive animals.

Our team has monitored *Leishmania* species and the genetic variants that may be infecting domestic dogs,<sup>6</sup> and samples of *Trypanosoma* spp. were isolated during these studies from different Brazilian endemic areas. Morphological and biological aspects of these isolates show patterns very similar to *T. caninum*, however, the correct identification of these isolates is fundamental, since they come from VL endemic areas and evaluating the impact that *T. caninum* has in those areas is still a great challenge. Thus, the objective of this study was to characterize 33 samples of *Trypanosoma* spp. isolated from dogs and report the presence of *T. caninum* in different Brazilian regions, where cases of canine VL occur.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The samples for this study were obtained during surveys of domestic dogs, the objective of which was the diagnosis of canine VL conducted in the states of Rio de Janeiro, comprising the municipalities of Rio de Janeiro, Niterói and Maricá; São Paulo (Bauru); Minas Gerais (Belo Horizonte); Mato Grosso (Cuiabá) and Goiás (Brasília). In each of these regions dogs were randomly evaluated, dogs of both sexes and aged six months or more being sampled. Only housed dogs participated in the study, and after clinical examination intact skin fragments were collected for parasite isolation in culture and molecular analysis by PCR.

### 2.2. Isolation of parasites from dogs

Three approximately 3 mm sized skin fragments were collected from each animal; two were culture processed and one was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for molecular studies. For isolation in culture the skin fragment was immersed in saline containing 100  $\mu\text{g}$  of 5'fluorocytocine, 1000 IU of penicillin and 200  $\mu\text{g}$  of streptomycin per milliliter and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 h according to the protocol described by Madeira et al.<sup>7</sup> After this period, each fragment was transferred aseptically to a biphasic culture medium NNN (Novy-Neal-Nicolle) and Schneider's *Drosophila* medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing 10% of fetal calf serum, incubated at  $26\text{--}28^{\circ}\text{C}$  and examined weekly for a maximum of 50 days. The parasites isolated were maintained in the same culture medium, weekly subcultured and expanded in Schneider's medium until reaching about  $10^9$  parasites/mL. The parasites were harvested and twice washed in PBS pH 7.2 and the pellets stored in liquid nitrogen to be used in molecular assays.

### 2.3. Molecular analysis

Genomic DNA of cultured trypanosomes was extracted using DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and for skin samples, the DNA was extracted using Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The manufacturer's instructions were followed in both

procedures. The PCR amplifications were performed in a nested-PCR that targeted a partial sequence of the 18S rRNA gene using oligonucleotides and reaction conditions as described by Smith et al.<sup>8</sup> External primers TRY927F (5' GAAACAAGAAACACGGGAG 3') and TRY927R (5' CTAAGGGCAGCTTGGA 3') were used in the first round and internal primers SSU561F (5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3') and SSU561R (5' CTGAGACTGTAACCTCAAAGC 3') were used in the second round. The PCR products were run on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. After PCR, the amplified products obtained in the second round with cultured forms or skin fragments were purified using the QIAquick Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions and the nucleotide sequences were determined with an automatic sequencer (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All nucleotide sequences obtained in this study were edited by the Bioedit program (BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.2, Ibis Therapeutics; Carlsbad, CA, USA) and analyzed by the Blast program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The similarity percents were obtained comparing the 33 isolates with the sample of *T. caninum* (stock A27) already deposited in the GenBank (Accession no. GU385824).<sup>3</sup> Using the ClustalX program,<sup>9</sup> all sequences studied were aligned and compared each other and with sequences of *T. caninum* and other trypanosomatids available in GenBank.

## 3. Results

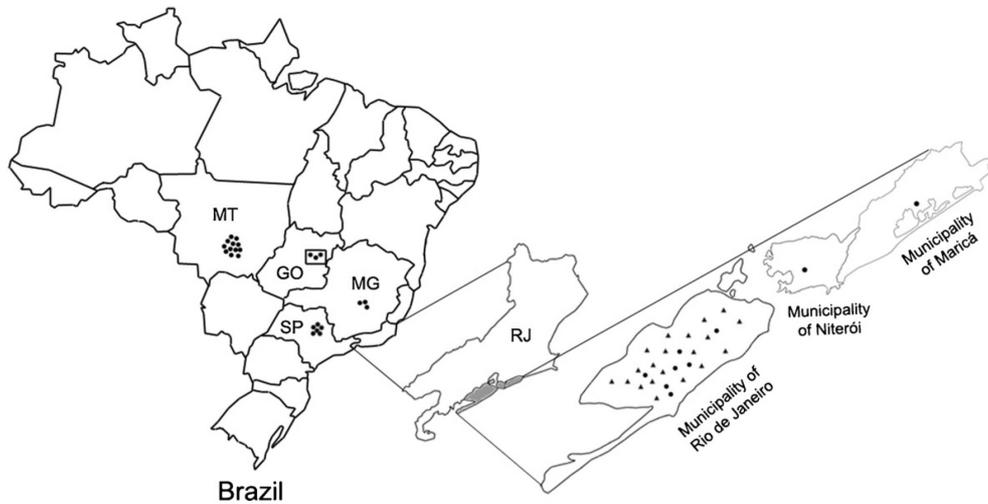
### 3.1. Samples

Thirty-three samples of *Trypanosoma* spp. were isolated from dogs in the states of São Paulo (Bauru,  $n=6$ ), Minas Gerais (Belo Horizonte,  $n=3$ ), Goiás (Brasília,  $n=3$ ), Mato Grosso (Cuiabá,  $n=12$ ) and Rio de Janeiro (Rio de Janeiro,  $n=7$ , Niterói,  $n=1$  and Maricá,  $n=1$ ) during the surveys conducted between 2005 and 2011. All samples were obtained from intact skin cultures, and the geographical location of the animals is shown in Figure 1.

All isolates showed similar morphological aspects in culture, with exuberant growth in NNN/Schneider's medium, although seven samples were lost due to secondary contamination or because of reduced growth through the subcultures of the initial isolate. For this reason, samples of the skin of the animals whose cultures were lost were processed by PCR, using the same protocol as the cultured forms.

### 3.2. PCR and data analysis

The results of PCR assays showed the same amplification pattern for all 33 samples (26 from culture and 7 from skin), with product size of approximately 900 bp for the first round and 700 bp for the second round. The sequencing of the partial 18S rDNA showed that the isolates were genetically identical or closely similar and confirmed *T. caninum* identify. The similarity percents of the isolates and the access number in GenBank are shown in Table 1.



**Figure 1.** Geographical origin of *Trypanosoma caninum* stocks described to date in Brazilian states: MT (Mato Grosso), GO (Goiás), MG (Minas Gerais), SP (São Paulo) and RJ (Rio de Janeiro). Cases described in this study (●) and cases already published by Madeira et al.<sup>2</sup> and Pinto et al.<sup>3</sup> (▲).

**Table 1**  
Data of the stocks of *Trypanosoma caninum* analyzed in this study

Sample code	Year of isolation	Localization (State/municipality)	Sample used for characterisation	Accession number GenBank	Similarity <sup>a</sup> (%)
RJ8150	2011	RJ/Maricá	Culture	JF951431	99
RJ002	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907507	99
RJ016	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907508	99
RJ058	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907509	98
RJ066	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907510	99
RJ071	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907531	97
RJ134	2008	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907523	97
RJ4814	2007	RJ/Rio de Janeiro	Culture	JF907517	97
RJ4052	2005	RJ/Niterói	Culture	JF907516	96
SP137	2008	SP/Bauru	Culture	JF907518	99
SP269	2008	SP/Bauru	Culture	JF907519	99
SP350	2008	SP/Bauru	Skin	JF907525	99
SP301	2008	SP/Bauru	Skin	JF907526	98
SP385	2008	SP/Bauru	Skin	JF907527	99
SP393	2008	SP/Bauru	Skin	JF907528	99
GO533	2008	GO/Brasília	Skin	JF907529	99
GO705	2008	GO/Brasília	Skin	JF907530	99
GO718	2008	GO/Brasília	Culture	JF907522	99
MG610	2007	MG/Belo Horizonte	Skin	JF907524	99
MG764	2007	MG/Belo Horizonte	Culture	JF907520	99
MG771	2007	MG/Belo Horizonte	Culture	JF907521	99
MT769	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907535	98
MT798	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907536	98
MT799	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907537	99
MT808	2011	MT/Cuiabá	Culture	JF907538	98
MT527	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907511	99
MT531	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907513	99
MT534	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907532	98
MT576	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907514	97
MT577	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907515	96
MT604	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907512	98
MT669	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907533	99
MT732	2009	MT/Cuiabá	Culture	JF907534	98

<sup>a</sup> The similarity percents were obtained comparing the 33 isolates with the sample of *T. caninum* stock A27 (accession no. GU385824) by Blast program. GO: Goiás, MG: Minas Gerais, MT: Mato Grosso, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo.

#### 4. Discussion

The *Trypanosoma* genus comprises numerous species already described and associated to different hosts. This study gives information about *Trypanosoma caninum*, a new species of this genus, about which little is known, identified in canine natural infection. This parasite was described in the municipality of Rio de Janeiro in 2003<sup>2</sup> and now, for the first time, we report the presence of this parasite in the states of São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso and Goiás, which added to the cases already described in the state of Rio de Janeiro<sup>2,3</sup> gives a total of 53 cases of canine natural infection by this parasite. These data clearly show the circulation and the existence of a natural cycle of *T. caninum* and calls attention to an epidemiological scenario newly described in Brazil.

Most of the time *T. caninum* was isolated from healthy dogs, suggesting that this parasite might be non-pathogenic in dogs, although this fact has not been investigated since one dog presented clinical signs compatible with canine VL. It is a matter of concern that *T. caninum* might stimulate the humoral immune system of infected dogs, producing specific antibodies that might cross-react with *Leishmania* in serological tests. This hypothesis is based on the reports of Pinto et al.<sup>3</sup> and Silva et al.<sup>10</sup> who isolated *T. caninum* from seroreactive dogs which were euthanized by leishmaniasis control programs in the municipality of Rio de Janeiro although *Leishmania* parasites were not isolated from these animals. The cross reactivity between different trypanosomatids, e.g., *Leishmania* and *T. cruzi* in canine infection has already been reported.<sup>11</sup> Considering that VL is a growing disease in Brazil<sup>9</sup> and that the domestic dog has a relevant role in the transmission cycle, this hypothesis, if true, will deeply impact VL control and will initiate discussions on canine euthanasia based solely on serological tests.

The fact of *T. caninum* being recently described may be related to the anatomical site where this parasite has been isolated, since the parasites of *Trypanosoma* genus are not usually searched for in the skin. In addition, few studies use intact skin in the diagnosis of canine VL. Fortunately, our team has used this site for canine VL diagnosis for many years,<sup>12</sup> which allowed isolation and identification of this new *Trypanosoma* species. All the samples of *T. caninum* obtained up to this moment were isolated exclusively from this site; all the attempts of isolation from hemoculture failed.

In this study, we demonstrate that the analysis of partial SSU ribosomal DNA sequence was enough to taxonomically identify the 33 samples isolated from different Brazilian regions and grouped all stocks reported to date in a single clade (data not shown). Although the *T. pestanai* and the wombat trypanosome appear to be the most similar trypanosomes, only part of the partial 18S sequences can be aligned with some reliability, and the *T. caninum* sequence is substantially different from others within this group. Biological aspects had already revealed similar patterns between the samples described in this study and the sample of *T. caninum* (stock A27) previously described by Madeira et al.<sup>2</sup> It is important to mention that the molecular target selected in this study to characterize

the samples isolated in culture, was also able to amplify the DNA of *T. caninum* in skin fragments, showing that PCR directed to a selected target can be a useful tool for the molecular tracking of this parasite directly in different clinical samples of dogs from endemic areas. Therefore, with regards to this point and considering the limited sensitivity of culture, further study, using molecular approach on blood samples and other anatomical sites in dogs naturally infected by *T. caninum* is in progress.

Numerous aspects of *T. caninum* biology and epidemiology need to be investigated, e.g., the morphology of the forms present in the vertebrate host; the transmission vector; the possible pathogenic potential for dogs; the prevalence of this parasite; and the impact that its presence may cause in areas where other trypanosomatid species occur, especially those of the *Leishmania* genus.

The observation of autochthonous cases of infection by *T. caninum* in different VL areas in Brazil is an alert for epidemiological surveillance. An overlapping geographical distribution of both *T. caninum* and *Leishmania* parasites indicates the need for techniques to ensure the identification and differentiation of these agents in canine infection.

Considering the lack of information that we have about this new parasite, and the importance of such knowledge in the context of public health, studies to evaluate the serological cross reactivity between *T. caninum* and *L. chagasi* and description of the genetic polymorphism among *T. caninum* stocks are in progress and aim to clarify more aspects of this new parasite.

**Authors' contributions:** JHSB and MFM conceived and designed the study. JHSB drafted the manuscript. MFM critically revised the manuscript for intellectual content. ABPFA, FBF and VRFS conducted fieldwork and analysed the data. AF, AGSP and CB participated in the laboratory tests and interpreted the data. All authors read and approved the final version. JHSB and MFM are the guarantors of the paper.

**Acknowledgements:** We thank Arlene BM Paula Ferreira de Almeida for the inestimable help in the preparing the map. We also thank the Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS-Fiocruz) for supporting the sequencing of the samples in this study. This research is part of the PhD thesis in Clinical Research in Infectious Disease of Juliana Helena da Silva Barros in the program of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Funding:** This study was partly supported by the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Programa de Incentivo à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico - PIPDT/2009) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process nº 474894/2010-0).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** The collection of biological samples of dogs was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), license numbers L-023/06 and LW-1/10.

## References

1. Hoare CA. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
2. Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2009;**136**:401–13.
3. Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol* 2010;**26**:1653–60.
4. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007;**149**:136–46.
5. Ministério da Saúde. Manual for the surveillance and control of visceral leishmaniasis [in Portuguese]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
6. Coutinho CR, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil by multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000049>.
7. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006;**138**:366–70.
8. Smith A, Clark P, Averis S, et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol* 2008;**135**:1329–35.
9. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Ac Res* 1997;**24**:4876–82.
10. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011;**179**:257–61.
11. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucchesi SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;**164**:118–23.
12. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009;**87**:206–62.

### 3.2 - Artigo 2

---

#### **Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers**

Artigo submetido para publicação na revista Experimental Parasitology

---

*Trypanosoma caninum* é um agente ainda muito pouco estudado, particularmente no campo da biologia molecular. Os estudos realizados anteriormente, utilizando a PCR e sequenciamento da região parcial do 18S rRNA visaram basicamente a identificação das amostras. Neste artigo, a nossa proposta foi identificar três novos isolados e estudar todas as amostras de *T. caninum* descritas até então por diferentes marcadores moleculares. Os experimentos foram realizados através da PCR e sequenciamento dos produtos empregando alvos direcionados para diferentes regiões do genoma (genes nucleares e mitocondriais). Empregamos, também, ensaios com alvos direcionados para região do ITS rDNA, a partir da técnica de RFLP-PCR, visando avaliar a heterogeneidade intraespecífica. Os resultados obtidos neste artigo foram importantes para provar que *T. caninum* é de fato uma nova espécie, já que independente do alvo molecular utilizado, todas as amostras foram agrupadas no mesmo cluster, separadas de outras espécies de tripanosomas. Além disso, nossos resultados nos levam à hipótese de que *T. caninum* seja composto por uma população geneticamente homogênea. Esse dado é importante e pode contribuir futuramente para eleição de ferramentas diagnósticas, que sejam específicas e que apoiem a identificação e diferenciação de *T. caninum*. Essas ferramentas diagnósticas serão úteis principalmente em áreas onde circulam outros tripanosomatídeos, como exemplo, parasitos do gênero *Leishmania* que comumente infectam os cães.

Este artigo complementa o objetivo nº 1 e responde os objetivos de nº 2 e 3 desta tese.

Elsevier Editorial System(tm) for Experimental Parasitology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers

Article Type: Research Paper

Keywords: Trypanosomatidae; PCR; dogs; Brazil

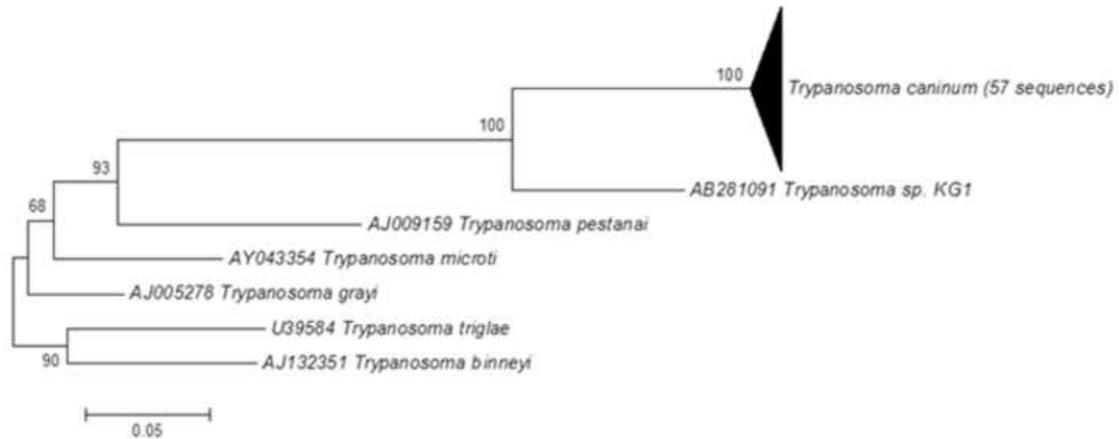
Corresponding Author: Dr. Maria de Fatima Madeira, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Fundação Oswaldo Cruz

First Author: Juliana Helena S Barros, Msc

Order of Authors: Juliana Helena S Barros, Msc; Helena K Toma, PhD; Maria de Fatima Madeira, Ph.D

Abstract: *Trypanosoma caninum* is a recently described parasite and little is known about this organism. In this study, we performed a genetic survey of *T. caninum* isolates from dogs captured from different regions of Brazil. The goal of this study was to add genetic knowledge about this parasite species. These assays were performed by examining PCR target amplification for different regions of nuclear and mitochondrial genes. All nucleotide sequences obtained for each target molecular were compared to *T. caninum* sequences determined in our previous studies and sequences of other *Trypanosoma* species. Fifty isolates of *T. caninum* were analyzed, and in all PCR assays, these isolates were successfully amplified and displayed the same amplification pattern. Based on the results of phylogenetic analysis, all samples of *T. caninum* studied, regardless of the molecular target used, were grouped in the same cluster. Our findings are important for proving that *T. caninum* is a new species and lead us to hypothesize that this is a genetically homogeneous parasite.



## HIGHLIGHTS

- In the phylogenetic analyses, all *Trypanosoma caninum* isolates (n=50) studied were grouped into the same cluster, regardless of geographic precedence and genetic marker
- According to the congruence of the three molecular markers, our results consolidate previous data and support that *T. caninum* is really a new species
- Our findings add more knowledge about this parasite and lead us to the hypothesis that *T. caninum* is a genetically homogeneous parasite.

**Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers**

Juliana H S Barros<sup>a</sup>, Helena K Toma<sup>b</sup>, Maria de Fátima Madeira<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

\*Corresponding author. Address: Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

E-mail address: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br (MF Madeira)

**ABSTRACT**

*Trypanosoma caninum* is a recently described parasite and little is known about this organism. In this study, we performed a genetic survey of *T. caninum* isolates from dogs captured from different regions of Brazil. The goal of this study was to add genetic knowledge about this parasite species. These assays were performed by examining PCR target amplification for different regions of nuclear and mitochondrial genes. All nucleotide sequences obtained for each target molecular were compared to *T. caninum* sequences determined in our previous studies and sequences of other *Trypanosoma* species. Fifty isolates of *T. caninum* were analyzed, and in all PCR assays, these isolates were successfully amplified and displayed the same amplification pattern. Based on the results of phylogenetic analysis, all samples of *T. caninum* studied, regardless of the molecular target used, were grouped in the same cluster. Our findings are important for proving that *T. caninum* is a new species and lead us to hypothesize that this is a genetically homogeneous parasite.

**1. Introduction**

Flagellates of the *Trypanosoma* genus are parasites that belong to the Trypanosomatidae family, and this group includes species that infect a variety of vertebrate hosts (Hoare, 1972). *Trypanosoma caninum* has been reported in dogs from

different Brazilian states (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011) and little is known about the genetics of this parasite. To date, only one genetic approach has been conducted on *T. caninum* using PCR and sequencing by analysis of partial SSU ribosomal DNA with the goal of classifying the various isolates discovered thus far. These studies showed that *T. caninum* isolates are genetically identical or closely similar. Moreover, after grouping all collected samples from different Brazilian regions into a single clade and substantially different from others within this genus. *Trypanosoma pestanaei* and the wombat trypanosome are the most similar species to *T. caninum* in those analyses (Barros et al., 2012).

Several genetic markers have been employed for the molecular study of parasites from the *Trypanosoma* genus and each genetic target is chosen for a specific reason. Targets in the conserved regions of the genome, such as genes of the small and large subunit ribosomal DNA (SSU and LSU rDNA), are frequently used for diagnostic applications, for the identification of new species (Lima et al., 2012; Simo et al., 2013; Villareal et al., 2013), and for phylogenetic studies of different related species (Garcia et al., 2011; Voty'pka et al., 2012; Arenas et al., 2012; Fischer et al., 2013; Ramirez et al., 2013). Moreover, targets in the variable regions of the genome, such as, internal transcribed spacers (ITS rDNA) and mitochondrial genes are extremely useful for studies investigating genetic aspects of intraspecific and interspecific variability due to high degree of mutations in these genetic regions (Auty et al., 2012; Garcia et al., 2012; Silva-Iturriza et al., 2012; Nakayima et al., 2013; Roellig et al., 2013). These markers are studied using different techniques; which involve PCR-based methodologies. Currently, several studies use classical techniques such as amplified restriction fragment length polymorphism analyses combined with more advance methodologies, including sequencing and identification of microsatellite regions (Rodrigues et al., 2009; Câmara et al., 2010; Ramirez et al., 2012; Câmara et al., 2013).

Understanding *T. caninum* at the molecular level is important for a variety of reasons. In this study, we analyzed distinct regions of the *T. caninum* genome by using different molecular markers, thus providing a comprehensive analysis of this recently discovered parasite.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *T. caninum* isolates

We studied 50 *T. caninum* isolates from two geographic regions of Brazil. The southeast region includes the Rio de Janeiro (n=30 isolates), São Paulo (n=02), Minas Gerais (n=02) states and the midwest region consists of the Goiás (n=01) and Mato Grosso (n=15) states. All isolates were obtained from axenic culture of intact skin fragments of naturally infected dogs and were cryopreserved in Leishmaniasis Surveillance Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil).

### 2.2. PCR assay of multiple genes

Genomic DNA of cultured trypanosomes were extracted using DNAzol kit (Invitrogen, Life Sciences, USA) according to the manufacturer's instructions and were stored at -20 °C until use. Partial sequences of variable regions of small subunit ribosomal RNA gene (18S rRNA) were amplified using a nested-PCR approach with external primers TRY927F/TRY927R and internal primers SSU561F/SSU561R as described by Smith et al. (2008). To amplify the partial sequence of the large subunit of the ribosomal DNA gene (24S $\alpha$  rDNA), the D75/D76 primers were used according to Souto et al. (1999) by amplifying conserved sequences within the Trypanosomatidae genome. The primers used to amplify the 5'-half of the cytochrome b (Cyt b) gene region encoded in the maxicircle DNA of the mitochondrial genome were P18/P20 as described by Barnabé et al. (2003). PCR targeting the minicircle DNA (kDNA) region was performed as previously reported by Wincker et al. (1994) by amplifying the variable regions of minicircle using primers 121/122 that anneal to the constant regions present in all minicircles. The PCR primers employed to amplify the kinetoplastid internal transcribe spacer 1 (ITS1 rDNA) sequences were KIN1/KIN2, which were previously described by Desquesnes et al. (2001). These primers anneal to the conserved regions of the 18S and 5.8S rDNA to amplify the variable region of ITS1. The descriptions of molecular targets used in this study, as well as their references are listed in Table 01. Negative controls (no DNA) and positive controls (*T. caninum* DNA – MCAN/BR/03/stock A27) was used in all assays.

All PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels and were visualized by staining with ethidium bromide. Furthermore, all PCR products, except

those for minicircle kDNA, were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Crawley, Reino Unido) following the manufacturer's instructions.

### 2.3. Restriction fragment length polymorphism-PCR

The amplification products of ITS1 rDNA PCR were digested with *Hae*III, *Rsa*I, *Hin*fI, *Mbo*I e *Bsh*I enzymes (Invitrogen, Life Sciences, USA, Fermentas). Five microliters of the PCR product was subjected to enzymatic digestion with 1U of enzyme for 3 h at 37 °C in the appropriate buffer. Next, the generated fragments were electrophoresed run on 3% agarose gel and visualized under ultraviolet light following staining with ethidium bromide (solution 0.5 g/ml). The restriction fragment polymorphism lengths were estimated by comparison with molecular weight marker (100-bp DNA ladder).

### 2.4. Cloning

Cloning was performed using purified PCR products from the ITS1 rDNA PCR reaction, and the amplified DNA was ligated into an pGEM®-T Vector System I Kit (Promega, Madison, USA). The ligation reaction mixture, contained 3 µl of purified PCR, 1 µl of TVector (cloning vector [50 ng/µl]), 5 µl of buffer solution (T4 DNA ligase), and 1 µl of de T4 DNA ligase, was incubated overnight at 4°C. After transformation into chemically competent BL21 *Escherichia coli* cells, positive clones were identified by blue/white screening using X-Gal followed by amplification with KIN forward and reverse oligonucleotides. Selected clones were inoculated into LB broth overnight at 37 °C, and plasmid DNA was purified using PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### 2.5. DNA sequencing and analysis

All nucleotide sequences were determined using an automatic sequencer (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) and were initially analyzed with the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All nucleotide sequences obtained for each molecular target used in this study were compared using Mega version 5.1 program (Tamura et al., 2011) with *T. caninum* sequences determined in our previous studies and with sequences of genus *Trypanosoma* available in GenBank. The alignment results were processed using the same software and the neighbor-joining (NJ) method that was

used to construct the phylogenetic tree. We calculated models of sequence evolution and their parameters using jModelTest in Mega version 5.1 (Posada, 2008; Tamura et al., 2011). Forty-five 18S rRNA, 24S $\alpha$  rDNA, and Cyt b partial sequences were concatenated using SeaView 4.0 (Gouy et al., 2010). To evaluate the robustness of the nodes in the resulting phylogenetic tree, 1000 bootstrap replications were performed. The same analysis was performed in eight recombinant clones derived from products of the ITS rDNA PCR amplification.

### 3. Results

In this study, we analyzed and successfully amplified 50 isolates of *T. caninum*. With the 18S rRNA, all isolates evaluated (n=21) showed a 900-bp molecular pattern after the first round and a 700 bp pattern after the second round. For the 24S $\alpha$  rDNA targets, 48 samples yielded a 250 bp product, and amplification of the Cyt b mitochondrial gene (n=45) resulted in a 700 bp product. PCR was performed targeting the variable region of the ribosomal gene (ITS1 rDNA) in 47 samples and all samples yielded the same about 950 bp amplified product. Amplification of the minicircle kDNA region (n=49) yielded two products, 350 bp and 330 bp long. These results and the samples used to obtain them are shown in Figure 1.

Endonuclease restriction digestion of the ITS rDNA revealed that all samples have the same restriction profile. Among those endonucleases studied, the *BshI* digested PCR product resulted in six fragments: 320 bp, 160 bp and four fragments about 100 bp. The *MboI* enzyme digested the ITS rDNA into three fragments about 430 bp, 380 bp and 90 bp. The enzymes *HaeIII*, *RsaI*, and *HinfI* did not digest any isolates.

Phylogenetic analyses revealed clear separation of *T. caninum* isolates from other samples of the *Trypanosoma* genus. Investigation of the 18S rRNA across all samples studied (n=21) revealed 100% query coverage and clustered with all 36 samples of *T. caninum* retrieved from GenBank (Figure 2A). The same result was achieved with the 48 sequences obtained from the partial region of the 24S $\alpha$  rDNA, in which all samples clustered together with the first isolate of *T. caninum* (stock A27 - accession number FJ801040) (Figure 2B). Regarding the 45 sequences obtained from the partial region of the mitochondrial Cyt b gene, all samples aligned and grouped in the same cluster but were separate from other parasites of the *Trypanosoma* genus (Figure 2C). Phylogenies

based on the concatenate 18S rRNA, 24S $\alpha$  rDNA, and Cyt b sequences shared identical topology (Figure 3).

Using the ITS1 rDNA, eight representative *T. caninum* samples were selected for cloning and sequencing, and all cloned sequences showed 100% sequence identity. All sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the accession numbers shown in the Table 2.

#### 4. Discussion

*Trypanosoma caninum* is a recently described parasite that has been found to infect dogs in Brazil. In this study, we utilized various molecular markers to help clarify some issues about this specie. Few studies exist that have investigated the characteristics of *T. caninum*; therefore, we utilized known molecular targets with different evolutionary rates (Dietrich et al., 1993; Westenberger et al., 2006) to study this organism. First, the species status of *T. caninum* isolates was confirmed by sequencing the 18S rRNA gene. Using this approach, we identified three new *T. caninum* samples from the Mato Grosso state and confirmed the identity of 18 isolates from the Rio de Janeiro state that were initially identified by other tools (Pinto et al., 2010). Partial sequencing of the small ribosomal subunit (18S rRNA) is considered an acceptable molecular criterion for taxonomic identification and there are many advantages in using this molecular marker. Specifically, it is a highly conserved region in the genome, it is present in thousands of copies, and its DNA sequence is widely available in public databases. Moreover, several species have been reliably identified using this marker (Lima et al., 2012; Voty'pka et al., 2012; Fischer et al., 2013; Simo et al., 2013). Based on phylogenetic analysis using this molecular target, all *T. caninum* samples were grouped into the same cluster with sequences determined in our previous studies (Pinto et al., 2010; Barros et al., 2012). Using this marker, our study confirmed a total of 57 *T. caninum* samples from different geographic areas of Brazil. Our results obtained using 24S $\alpha$  rDNA and Cyt b markers support these findings and demonstrated that *T. caninum* displays a high degree of similarity. All isolates were located in the same cluster, regardless of geographic precedence and the genetic marker used. For these results, the bootstrap values (~100%) support this observation. Therefore, these findings show congruence between the three molecular markers suggesting that *T. caninum* has an evolutionary history independent of other species in the genus *Trypanosoma*.

Based on ITS rDNA analysis, high genetic homogeneity was also detected in *T. caninum* isolates, and the restriction pattern proved it is not a gold standard for detecting genetic heterogeneity in this species. For this reason, we selected eight representative samples of different geographical regions, and by cloning and sequencing, confirmed this observation. All cloned ITS rDNA sequences showed 100% query coverage to the isolates sequence sharing the highest identity. However, despite the high similarity observed, multiple sequence alignment of ITS1 rDNA revealed 40 polymorphic sites among the studied clones. These sites were characterized by substitutions and deletions, and they indicate some degree of heterogeneity in *T. caninum* isolates.

The low level of polymorphism observed in our study must be considered with caution because the samples were isolated from limited geographical surroundings. It is important to note that Brazil is a country with an extensive geographic area with different epidemiological patterns and that *T. caninum* has been isolated only from dogs in household and peridomestic environments. Additionally, *T. caninum* seems to have tropism for specific anatomic sites (Madeira et al., 2009). The homogeneity found in *T. caninum*, might be associated with these factors; however, the specific host–parasite association must also be considered. Taking this into account, investigation of *T. caninum* in other hosts such as wild canids and synanthropic animals, which are exposed to more complex epidemiological patterns, should also be investigated. Furthermore, additional isolates from dogs should be investigated to accurately evaluate the level of genetic diversity within this species.

In this study, phylogenetic trees were constructed using the GenBank sequences of organisms related to *T. caninum*. However, based on the molecular targets analyzed, these species varied. An important fact that must be mentioned is that as more DNA sequences in public databases become available, greater will be confidence inferred to the studies, especially in identification with new species, strains, or isolates are collected and identified (Hamilton and Stevens 2010). Thus, the availability of nucleotide sequences from different regions of the genome of *T. caninum* certainly facilitate future studies, including the design or choice of specific molecular targets that could be used for their diagnosis.

Some studies have reported differences in the lengths of minicircles from several trypanosomatid species (Garcia et al., 2012; Brewster, 2002) and, in this study, we showed that the length of the variable region of the minicircles in *T. caninum* is

different from that of other trypanosomes, 330 and 350 bp long, which is another unique feature of this parasite.

Finally, *T. caninum* is an intriguing parasite of which very little is known and our results provide further information concerning the genetic profile of all isolates described to date. Our findings are important for proving that *T. caninum* is a new species and lead us to hypothesize that this is a genetically homogeneous parasite.

### Acknowledgments

This research is part of the PhD thesis in Clinical Research in Infectious Disease of Juliana Helena da Silva Barros in the Program of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

We also thank the Genomic Platform-DNA Sequencing (PDTIS-Fiocruz) for supporting the sequencing of the samples in this study. The present study was partially supported by CNPq (Program Papes VI – process 407700/2012-9).

### References

- Almeida, A.B.P.F., Sousa, V.R., Boa Sorte, E., Figueiredo, F.B., de Paula, D.A., Pimentel, M.F., Dutra, V., Madeira, M.F., 2011. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 11, 1555-1560.
- Arenas, M., Campos, R., Coronado, X., Ortiz, S., Solari, A., 2012. *Trypanosoma cruzi* genotypes of insect vectors and patients with Chagas of Chile studied by means of cytochrome b gene sequencing, minicircle hybridization, and nuclear gene polymorphisms. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12, 196-205.
- Auty, H., Anderson, N.E., Picozzi, K., Lembo, T., Mubanga, J., Hoare, R., Fyumagwa, R.D., Mable, B., Hamill, L., Cleaveland, S., Welburn, S.C., 2012. Trypanosome Diversity in Wildlife Species from the Serengeti and Luangwa Valley Ecosystems. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6, e1828.
- Barnabé, C., Brisse, S., Tibayrenc, M., 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of genus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infection Genetics and Evolution* 2, 201-208.

- Barros, J.H.S., Almeida, A.B.P.F., Figueiredo, F.B., Sousa, V.R.F., Fagundes, A., Pinto, A.G.S., Baptista, C., Madeira, M.F., 2012. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 106, 419-423.
- Brewster, S., Barker, D.C., 2002. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96, S55-63.
- Câmara, A.C.J., Varela-Freire, A.A., Valadares, H.M.S., Macedo, A.M., D'Ávila, D.A., Machado, C.R., Lages-Silva, E., Chiari, E., Galvão, L.M.C., 2010. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. Acta Tropica 115, 205-211.
- Câmara, A.C.J., Lages-Silva, E., Sampaio, G.H.F., D'Ávila, D.A., Chiari, E., Lúcia, L.M.C.G., 2013. Homogeneity of *Trypanosoma cruzi* I, II, and III populations and the overlap of wild and domestic transmission cycles by *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil. Parasitology Research 112, 1543-1550.
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungnanab, A., Dávila, A.M.R., 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. International Journal for Parasitology 3, 610-614.
- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H.T., Floeter-Winter, L.M., 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. Gene 125, 103-107.
- Fisher, A.C., Schusterb, G., Cobba, J.W., Jamesa, A.M., Cooperc, S.M., León, A.A.P., Holmana, P.J., 2013. Molecular characterization of *Trypanosoma (Megatrypanum)* spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. Veterinary Parasitology 197, 29-42.
- Garcia, H.A., Rodrigues, A.C., Martinkovic, F., Minervino, A.H.H., Campaner, M., Nunes, V.B., Paiva, F., Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G., 2011. 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 41, 1385-1396.

- García, L., Ortíz, S., Osorio, G., Torrico, M.C., Torrico, F., Solari, A., 2012. Phylogenetic analysis of bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome b sequence and minicircle analyses. *Plos One* 7: e36578.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221-224.
- Hamilton, P.B., Stevens, R.J., 2010. Resolving relationships between Australian trypanosomes using DNA barcoding data. *Trends in Parasitology* 11, 99.
- Hoare, C.A., 1972. The trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Backweel Scientific Publications, Oxford and Edinburg, UK.
- Lima, L., Maia da Silva, F., Neves, L., Attias, M., Takata, C.S.A., Campaner, M., Souza, W., Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G., 2012. Evolutionary insights from bats trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erney* sp. Nov. in African Bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist* 163, 856-872.
- Madeira, M.F., Sousa, M.A., Barros, J.H., Figueiredo, F.B., Fagundes, A., Schubach, A., Paula, C.C., Faissal, B.N.S., Fonseca, T.S., Thoma, H.K., Marzochi, M.C.A., 2009. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 136, 401-413.
- Nakayima, J., Nakao, R., Alhassan, A., Hayashida, K., Namangala, B., Mahama, C., Afakye, K., Sugimoto, C., 2013. Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. *Parasite* 20, 24.
- Pinto, A.G.S., Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Baptista, C., Fagundes, A., Barros, J.H.S., Paula, C.C., Toma, H.K., Madeira, M.F., 2010. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 137, 1653-1660.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256.
- Ramírez, J.D., Duque, M.C., Montilla, M., Cucunubá, Z., Guhl, F., 2012. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Experimental Parasitology* 132, 487-494.

- Ramírez, J.D., Tapia-Calle, G., Muñoz-Cruz, G., Poveda, C., Rendón, L.M., Hincapié, E., Guhl, F., 2013. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.022.
- Rodrigues, I.B., Botero, A., Mejjia-Jaramillo, A.M., Marquez, E.J., Ortiz, S., Solari, A., Traina-Chavez, O., 2009. Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the sierra nevada de Santa Marta, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 396-403.
- Roellig, D.M., Savage, M.Y., Fujita, A.W., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., 2013. Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *Plos One* 8, e56198.
- Silva-Iturriza, A., Nassar, J.M., García-Rawlins, A.M., Rosales, R., Mijares, A., 2013. *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. *Parasitology International* 62, 95-99.
- Simo, G., Sobgwi, P.F., Njitchouang, G.R., Njiokou, F., Kuate, J.R., Cuny, G., Asonganyi, T., 2013. Identification and genetic characterization of *Trypanosoma congolense* in domestic animals of Fontem in the South-West region of Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution* 18, 66-73.
- Smith, A., Clark, P., Averis, S., Lymbery, A.J., Wayne, A.F., Morris, K.D., Thompson, R.C.A., 2008. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitology* 135, 1329-1335.
- Souto, R.P., Vargas, N., Zingales, B., 1999. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Experimental Parasitology* 91, 306-314.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

- Villareal, M.V., Mingala, C.N., Rivera, W.L., 2013. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Acta Parasitologica*. 8, 6-12.
- Votýpka, J., Szabová, J., Rádová, J., Zidková, L., Svobodová, M., 2012. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 745-754.
- Westenberger, S.J., Sturm, N.R., Campbell, D.A., 2006. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *International Journal for Parasitology* 36, 337-346.
- Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., Morel, C.M. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 771-777.

**Figure legends:**

**Figure 1:** Agarose gel showing the amplified products generated by the different PCR assays with one representative sample of *T. caninum* (RJA27). PCR assay that target a partial sequence of the 18S rRNA (lane 1), 24S  $\alpha$  rDNA (lane 2), cytochrome b (lane 3), ITS rDNA (lane 4), kDNA (lane 5). Molecular weight marker 100 bp (M). Ethidium bromide-stained 2% agarose gel.

**Figure 2:** Phylogenies analyses demonstrating clear separation of *T. caninum* isolates of others samples of *Trypanosoma* sp. Neighbor-joining phylogenetic tree with the Kimura-2-parameter model of partial sequences of (a) 18S rRNA, (b) 24S $\alpha$  rDNA and with the Tamura-Nei model of partial sequences of (c) cytochrome b genes of *Trypanosoma caninum* from different states and others parasites of genus *Trypanosoma* aligned with Mega version 5.1 program. Outgroups: *T. binneyi* and *T. triglæ* for 18S rRNA, *T. vivax* and *T. congolense* for 24S $\alpha$  rDNA and *T. avium* for cytochrome b. Bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. GenBank Accession numbers of *T. caninum* are in Table 2 in this paper and other *Trypanosoma* species in front of its name on the tree.

**Figure 3:** Phylogenetic neighbor-joining concatenate tree from 45 samples of *T. caninum* combined 18S rRNA, 24S $\alpha$  rDNA, and cytochrome b data sets (1315 characters). Numbers at nodes represent bootstrap values after 1000 replicates. GenBank Accession numbers of *T. caninum* are in Table 2 in this paper and other *Trypanosoma* species behind its name on the tree.

Figure 1

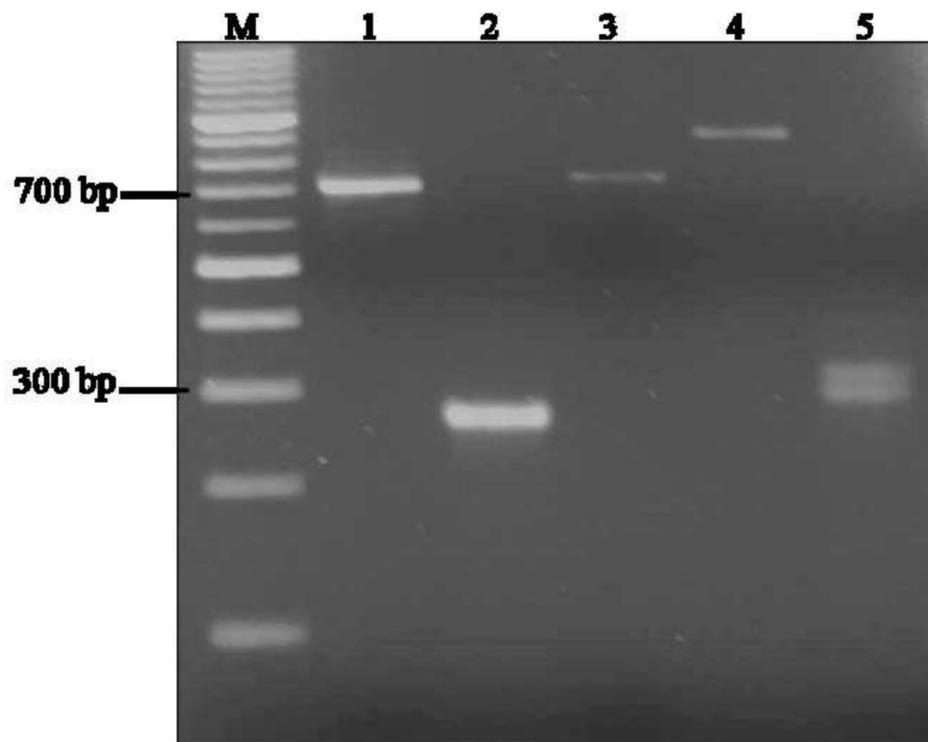


Figure 2

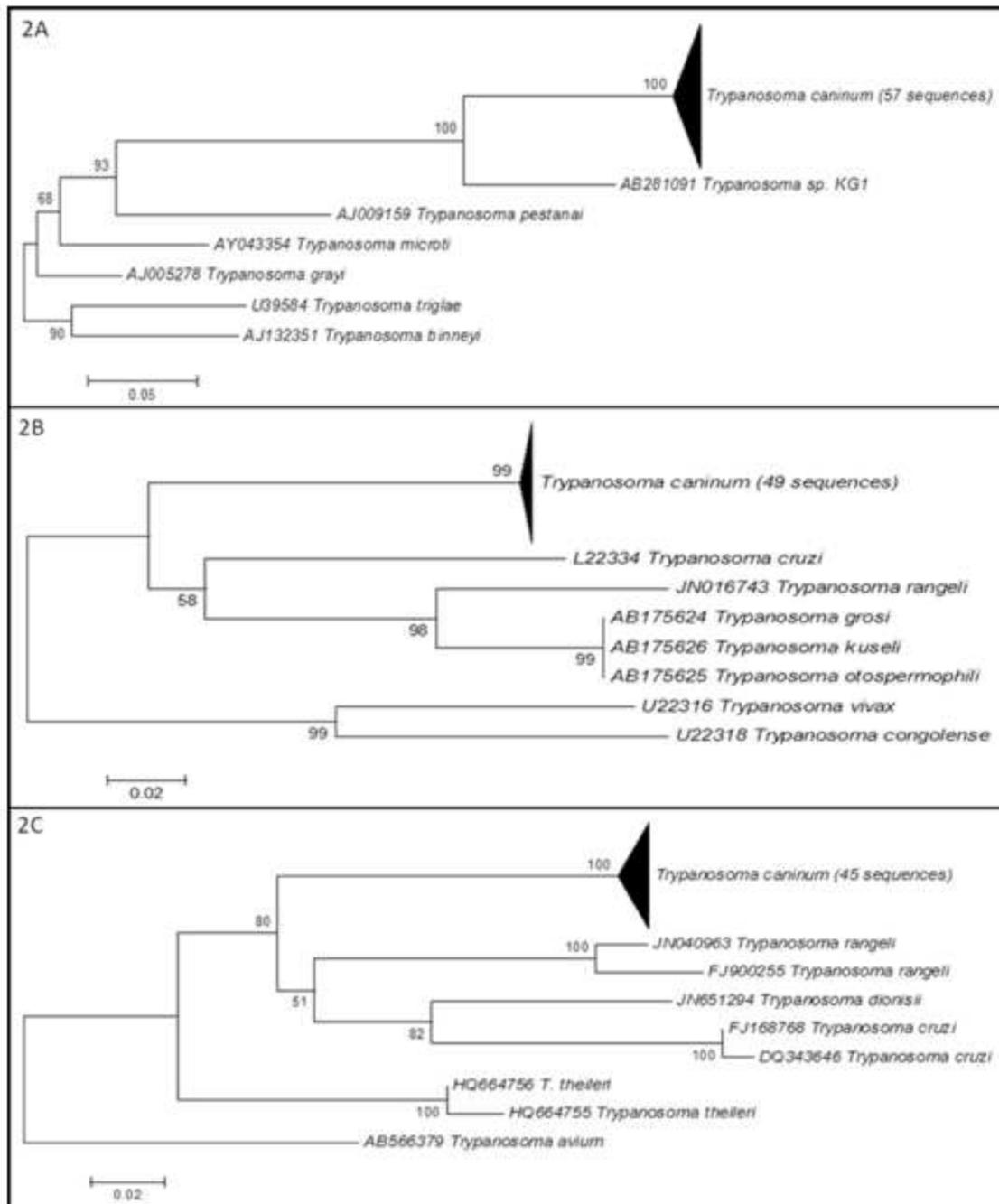


Figure 3

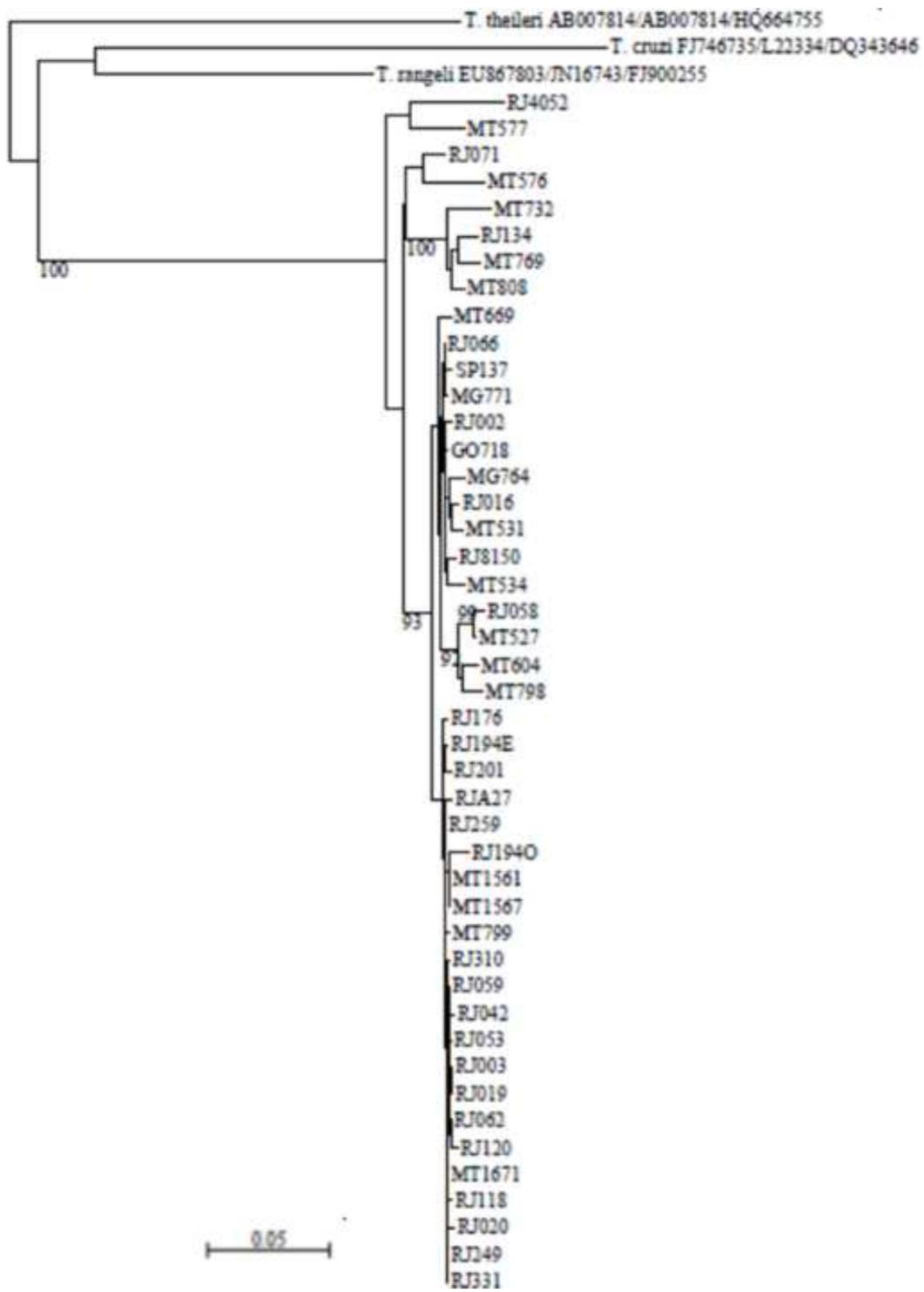


Tabela 1

**Table 1:** Molecular targets used for amplification of different genomic regions of *Trypanosoma caninum*

Target	Primers	Sequence 5'-3'	Reference
18S rRNA	TRY927F	GAAACAAGAAACACGGGAG	Smith et al. 2008
	TRY927R	CTACTGGGCAGCTTGA	
	SSU561F	TGGGATAACAAAGGAGCA	
	SSU561R	CTGAGACTGTAACCTCAAAGC	
24S $\alpha$ rDNA	D75	GCAGATCTTGGTTGGCGTAG	Souto et al. 1999
	D76	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT	
Cytochrome b	P18	GACAGGATTGAGAAGCGAGAGAG	Barnabé et al. 2003
	P20	CAAACCTATCACAAAAAGCATCTG	
kDNA	121	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	Wincker et al. 1994
	122	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTATA TA	
ITS1 rDNA	KIN1	GCGTTCAAAGATTGGGCAAT	Desquenes et al. 2001
	KIN2	CGCCCGAAAGTTCACC	

Tabela 2

**Table 2:** *Trypanosoma caninum* isolates used in this study, geographic origin, and GenBank accession numbers sequences of 18S rRNA, 24Sα rDNA, cytochrome b, and ITS1 rDNA genes employed for analyses.

Sample code	Geographical origin	GenBank Accession numbers			
		18S rRNA	24Sα rDNA	Cyt b	ITS1 rDNA
RJA27	RJ / Rio de Janeiro	GU385824*	FJ801040*	KF805529	KF805452
RJ002	RJ / Rio de Janeiro	JF907507*	KF805481	KF805530	nd
RJ016	RJ / Rio de Janeiro	JF907508*	KF805482	KF805531	nd
RJ058	RJ / Rio de Janeiro	JF907509*	KF805483	KF805532	nd
RJ066	RJ / Rio de Janeiro	JF907510*	KF805484	KF805533	nd
RJ071	RJ / Rio de Janeiro	JF907531*	KF805485	KF805534	KF805453
RJ134	RJ / Rio de Janeiro	JF907523*	KF805486	KF805535	nd
RJ4814	RJ / Rio de Janeiro	JF907517*	nd	nd	nd
RJ4052	RJ / Niterói	JF907516*	KF805487	KF805536	nd
RJ8150	RJ / Maricá	JF951431*	KF805488	KF805537	nd
RJ003	RJ / Rio de Janeiro	KF805460	KF805489	KF805538	nd
RJ020	RJ / Rio de Janeiro	GU385826*	KF805490	KF805539	nd
RJ019	RJ / Rio de Janeiro	KF805461	KF805491	KF805540	nd
RJ042	RJ / Rio de Janeiro	KF805462	KF805492	KF805541	nd
RJ059	RJ / Rio de Janeiro	KF805463	KF805493	KF805542	nd
RJ060	RJ / Rio de Janeiro	KF805464	KF805494	nd	nd
RJ053	RJ / Rio de Janeiro	KF805465	KF805495	KF805543	nd
RJ062	RJ / Rio de Janeiro	KF805466	KF805496	KF805544	nd
RJ120	RJ / Rio de Janeiro	KF805467	KF805497	KF805545	nd
RJ118	RJ / Rio de Janeiro	GU385825*	KF805498	KF805546	nd
RJ176	RJ / Rio de Janeiro	KF805468	KF805499	KF805547	nd
RJ194O	RJ / Rio de Janeiro	KF805469	KF805500	KF805548	nd
RJ194E	RJ / Rio de Janeiro	KF805470	KF805501	KF805549	nd
RJ201	RJ / Rio de Janeiro	KF805471	KF805502	KF805550	nd
RJ249	RJ / Rio de Janeiro	KF805472	KF805503	KF805551	nd
RJ259	RJ / Rio de Janeiro	KF805473	KF805504	KF805552	nd
RJ271	RJ / Rio de Janeiro	KF805474	KF805505	nd	nd
RJ310	RJ / Rio de Janeiro	KF805475	KF805506	KF805553	nd
RJ265	RJ / Rio de Janeiro	KF805476	KF805507	nd	nd
RJ 331	RJ / Rio de Janeiro	KF805477	KF805508	KF805554	nd
SP137	SP / Bauru	JF907518*	KF805509	KF805555	KF805454
SP269	SP / Bauru	JF907519*	KF805510	nd	nd
SP350	SP / Bauru	JF907525*	nd	nd	nd
SP301	SP / Bauru	JF907526*	nd	nd	nd
SP385	SP / Bauru	JF907527*	nd	nd	nd
SP393	SP / Bauru	JF907528*	nd	nd	nd
MG771	MG / Belo Horizonte	JF907521*	KF805511	KF805556	KF805455
MG764	MG / Belo Horizonte	JF907520*	KF805512	KF805557	nd
MG610	MG / Belo Horizonte	JF907524*	nd	nd	nd
GO718	GO / Brasília	JF907522*	KF805513	KF805558	KF805456
GO533	GO / Brasília	JF907529*	nd	nd	nd
GO705	GO / Brasília	JF907530*	nd	nd	nd
MT527	MT / Cuiabá	JF907511*	KF805514	KF805559	nd
MT531	MT / Cuiabá	JF907513*	KF805515	KF805560	nd
MT534	MT / Cuiabá	JF907532*	KF805516	KF805561	nd
MT576	MT / Cuiabá	JF907514*	KF805517	KF805562	nd
MT577	MT / Cuiabá	JF907515*	KF805518	KF805563	nd

Tabela 2

MT604	MT / Cuiabá	JF907512*	KF805519	KF805564	KF805457
MT669	MT / Cuiabá	JF907533*	KF805520	KF805565	nd
MT732	MT / Cuiabá	JF907534*	KF805521	KF805566	nd
MT769	MT / Cuiabá	JF907535*	KF805522	KF805567	nd
MT798	MT / Cuiabá	JF907536*	KF805523	KF805568	nd
MT799	MT / Cuiabá	JF907537*	KF805524	KF805569	KF805458
MT808	MT / Cuiabá	JF907538*	KF805525	KF805570	KF805459
MT1561	MT / Cuiabá	KF805478	KF805526	KF805571	nd
MT1567	MT / Cuiabá	KF805479	KF805527	KF805572	nd
MT1671	MT / Cuiabá	KF805480	KF805528	KF805573	nd

nd – not done, \*reference sequences retrieved from GenBank

### **3.1 - Artigo 3**

---

#### **Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of *Trypanosoma caninum***

Artigo submetido para publicação na revista Parasitology Research

---

Tradicionalmente, em cultivo axênico, os parasitos do gênero *Trypanosoma* são encontrados sob as formas epimastigota, esferomastigota e tripomastigota. *T. caninum* é uma espécie que possui características particulares. Além de ser isolado exclusivamente de fragmentos de pele, apresenta formas atípicas sem flagelo livre no cultivo axênico, sendo ambos aspectos características incomuns para os representantes do gênero *Trypanosoma*. A presença de formas aflageladas no cultivo de *T. caninum* chamou a nossa atenção, principalmente porque essa estrutura está relacionada a funções variadas durante o ciclo evolutivo dos tripanosomatídeos. Neste artigo, nós descrevemos formas atípicas no cultivo de *T. caninum*, através da microscopia óptica e microscopia eletrônica, apresentando assim, mais uma característica desse parasito. As análises mostraram que se trata de formas epimastigotas atípicas, que durante o crescimento se alongam e expõem o flagelo, que também cresce gradativamente, dando origem à formas epimastigotas com longos flagelos. Entretanto, algumas dessas formas atípicas não se diferenciam, mantendo-se na cultura por longos períodos. As razões desse fenômeno são ainda desconhecidas, porém, considerando que *T. caninum* é um parasito pouco estudado, as informações trazidas pelo nosso estudo acrescentam dados que podem ser úteis para ajudar a esclarecer aspectos sobre o seu ciclo biológico.

Este artigo responde ao objetivo nº 4 desta tese.

## Parasitology Research

Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of <i>Trypanosoma caninum</i>
Article Type:	Original Paper
Abstract:	Representatives of the genus <i>Trypanosoma</i> have been traditionally found in epimastigote, espermastigote and trypomastigote flagellated forms in axenic cultures. <i>Trypanosoma caninum</i> is a trypanosomatid that has recently been reported infecting dogs in Brazil. It presents specific biological characteristics and it is found exclusively on healthy skin. Here, we describe the evolutive forms of this agent showing not only the forms commonly found in culture medium, but also atypical epimastigote forms with no free flagellum. The study was conducted using scanning and transmission electron microscopy and, we demonstrate that flagellated epimastigotes originate from atypical forms without flagellum, although the latter may remain without differentiation in the culture. We hypothesized that the emergence of these atypical forms could be resultant from a disturbed process during cell division caused by interfering specific proteins, which leads to inability to form and regulate the flagellum length. The reasons for this phenomenon are still unknown. However, considering that <i>T. caninum</i> is a parasite that is still little studied, the information brought by our study adds data which may be useful to clarify aspects on the cell cycle of this intriguing parasite that has been found in different regions of Brazil.
Corresponding Author:	Maria de Fatima Madeira, Ph.D. Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundação Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Juliana Helena da Silva Barros, Msc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Juliana Helena da Silva Barros, Msc. Tatiana S Fonseca, Msc Roger M Macedo-Silva, Msc Suzana Côte-Real, PhD Helena K Toma, PhD Maria de Fatima Madeira, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	I, along with my coauthors, would like to ask you to consider the attached manuscript entitled publication in "Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of <i>Trypanosoma caninum</i> " to be reviewed and published in this Journal. It is being submitted under the original article format which aims to describe the atypical forms of this agent displayed by optical microscopy and electron microscopy. <i>Trypanosoma caninum</i> constitutes the most recent trypanosomatid specie described infecting dogs in Brazil. Although this parasite is still little known, are already described 59 cases of natural infection in different regions of Brazil. <i>T. caninum</i> is a species that presents intriguing features which differentiates it from other species of <i>Trypanosoma</i> , being isolated exclusively from health skin fragments. In this study we described the

presence of atypical epimastigote forms with no free flagellum in axenic cultures. The reasons for this phenomenon are still unknown but considering that *T. caninum* is a parasite little studied and that the flagellum is a structure involved in widely different functions of trypanosomatids, the information brought by our study adds data that can be useful to help clarify aspects of its biological cycle of this intriguing parasite. We hereby declare that all data contained are accurate; all authors have participated in the work in a substantive way and are in agreement with its content. The manuscript being submitted to this Journal has not been published and is not being submitted for publication elsewhere.

Description of atypical epimastigote forms found in axenic culture of *Trypanosoma caninum*

Juliana HS Barros, Tatiana S Fonseca, Roger M Macedo-Silva, Suzana Côrte-Real, Helena K Toma, Maria de Fatima Madeira

J. Barros  
Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

R. M. Macedo-Silva  
Plataforma Multiusuários Rudolf Barth, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

S. Côrte-Real  
Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

H. K. Toma  
Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

M. F. Madeira (✉), T. S. Fonseca  
Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
e-mail: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br

**Abstract** Representatives of the genus *Trypanosoma* have been traditionally found in epimastigote, espheromastigote and trypomastigote flagellated forms in axenic cultures. *Trypanosoma caninum* is a trypanosomatid that has recently been reported infecting dogs in Brazil. It presents specific biological characteristics and it is found exclusively on healthy skin. Here, we describe the evolutive forms of this agent showing not only the forms commonly found in culture medium, but also atypical epimastigote forms with no free flagellum. The study was conducted using scanning and transmission electron microscopy and, we demonstrate that flagellated epimastigotes originate from atypical forms without flagellum, although the latter may remain without differentiation in the culture. We hypothesized that the emergence of these atypical forms could be resultant from a disturbed process during cell division caused by interfering specific proteins, which leads to inability to form and regulate the flagellum length. The reasons for this phenomenon are still unknown. However, considering that *T. caninum* is a parasite that is still little studied, the information brought by our study adds data which may be useful to clarify aspects on the cell cycle of this intriguing parasite that has been found in different regions of Brazil.

**Introduction**

Trypanosomes are flagellated protozoa that exhibit a wide range of hosts covering all classes of vertebrates. Some species are etiologic agents of significant tropical diseases afflicting humans, livestock and domesticated animals (WHO 2002; Barret et al. 2003).

These amazing organisms present a eukaryotic cellular organization whose genome is organized in the nucleus and kinetoplast, the latter being a typical structure of the kinetoplastids parasites constituted by a

1 high concentration of condensed circular DNA (Jensen and Englund 2012). Besides being an excellent  
2 target for molecular genetic studies, the location of the kinetoplast in the cell in relation to the nucleus  
3 defines the evolutive stage of flagellated forms of these organisms (Hoare and Wallace 1966). This  
4 location can be easily verified by light microscopy after specific staining, and it is important additional  
5 information especially regarding newly described species (Lainson et al. 2008; Madeira et al. 2009; Viola  
6 et al. 2009; Lima et al. 2012).

7  
8  
9 The evolutive stages that characterize parasites of the genus *Trypanosoma* have been known for a long  
10 time (Hoare 1972). Amastigote form is an obligate intracellular stage in vertebrate hosts; it does not  
11 present free flagellum and it is non motile. The flagellated forms are present in vertebrate and invertebrate  
12 hosts and in axenic medium cultures; comprising the epimastigote form, whose flagellum emergence  
13 occurs laterally in the anterior body portion of the parasite; the trypomastigote form, whose emergence of  
14 the flagellum also occurs laterally, but in the posterior body part of the parasite, and remains adhered to it  
15 forming an extended undulating membrane; and the espheromastigote form, which is round and  
16 constitutes the transition stage between the epimastigote and trypomastigote forms (Souza 2002).

17  
18  
19  
20  
21 Trypanosomes are organisms that show a complex life cycle. During their development, they are  
22 exposed to different environments in both vertebrate and invertebrate hosts, and develop mechanisms to  
23 adapt to each of these conditions (Machado et al. 2006; Oladiran and Belosevic 2012). Specific organelles  
24 also act in this process, and the flagellum is a good example in this context. This structure is highly  
25 sophisticated, with varied functions as motility, sensitivity, and others as attachment to host tissue and  
26 cell morphogenesis (Kohl and Bastin 2005). Mutant trypanosomatids have been described in function of  
27 the absence, length, or motility of the flagellum, and several insights in this context come from the studies  
28 with specific proteins that show to be associated with these phenomena (Cuvillier et al. 2000; 2003; Thiel  
29 et al. 2008).

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

There are many parasite species of the genus *Trypanosoma* described worldwide (Hoare 1972) and *Trypanosoma caninum* is one more agent of this genus recently reported in Brazil (Madeira et al. 2009). This parasite is still little known and studied being recognized so far in the natural infection of domestic dogs (Pinto et al. 2010; Almeida et al. 2011; Barros et al. 2012). The fact that the *Trypanosoma caninum* shares the same reservoir of *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*), the agent of visceral leishmaniasis (VL), places this parasite in evidence for several aspects of public health, especially the risk of misdiagnosis of canine visceral leishmaniasis particularly in areas where *L. chagasi* and *T. caninum* co-exist (Alves et al. 2012). Little is known about the developmental cycle, tissue tropism and pathogenicity of *T. caninum*. However, this parasite has shown intriguing biological characteristics – a fact that has aroused our interest in its study. In addition to the exclusive isolation on healthy skin, we now described the presence of atypical epimastigote forms with no free flagellum in axenic cultures; these are two unusual facts to the *Trypanosoma* genus.

## Materials and methods

The sample selected for this study (RJ4052) was isolated in Rio de Janeiro state and identified as *T. caninum* by nested-PCR (18S rRNA) and sequencing (Barros et al. 2012). This sample has been

1 cultivated in Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) overlaid with Schneider's Drosophila Medium  
2 (Sigma), supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS), 100 U/mL Penicillin, and 100 µg/mL  
3 Streptomycin in BOD incubators at 26-28 °C.

4 We performed a growth curve using two variations of culture medium and three different temperatures  
5 to assess the profile of growth and differentiation of evolutive forms present in axenic culture. We used  
6 the NNN/Schneider biphasic culture medium, which constitutes the culture medium employed for the  
7 isolation and maintenance of *T. caninum* and the Schneider medium, both supplemented with 10 % FCS,  
8 100 U/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin, and kept at 28 °C, 35 °C and 37 °C. The growth curve  
9 started with  $1 \times 10^6$  parasites/mL and counting was performed in a Neubauer chamber, in triplicate,  
10 considering 48-72 h intervals for 30 days. At each interval, about 10 µl of the culture was spread slightly  
11 onto slides, fixed with methanol, treated with 5N hydrochloric acid for 10 minutes and then stained with  
12 Giemsa for 20 minutes. The slides were analyzed under optical microscopy at x1.000 magnification by  
13 examining the culture forms and their peculiarities. Photomicrographs were obtained using the Motic  
14 Image Plus 2.0 software. The rates of different forms were determined by counting 100 randomly chosen  
15 forms on the slides prepared during the growth curve. Measures (µm) were taken with the same software  
16 considering the total growth of the cell body and flagellum of the parasites randomly selected.

17 Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) analyses were  
18 performed on a 6-day-old culture maintained at 28 °C in biphasic medium. For TEM, approximately 5  
19 mL of culture was washed twice with saline solution plus phosphates (PBS, pH 7.2) by centrifugation  
20 process and the resulting pellet was resuspended in 2.5 % glutaraldehyde diluted in cacodylate buffer  
21 0.1M, pH 7.2. This suspension was slightly homogenized and maintained at 4-8 °C for 24 hours. Post-  
22 fixation was then performed using osmium tetroxide 0.1 M, 0.8 % potassium ferrocyanide, 5 mM calcium  
23 chloride in cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2 for 30 minutes. After fixation, serial dehydration in acetone  
24 was carried out; after centrifugation, the pellet was impregnate in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections  
25 were obtained and stained with uranyl acetate at 5 % lead citrate; they were then examined in  
26 transmission electron microscope JEOL-1011 (Jeol, Akishima-Shi, Tokyo, Japan).

27 For SEM, after the washing process described for TEM, the parasite pellet was fixed with 2.5 %  
28 glutaraldehyde and approximately 30 µl was placed on coverslips previously coated with poly-L-lysine.  
29 Adhesion of cells to coverslips was performed for 40 minutes at 37 °C. Posteriorly, the coverslips were  
30 post-fixed using osmium tetroxide 0.1M and then washed and dehydrated in acetone series, processed by  
31 critical point (Balzers-CPD 030), metalized (Delton Vacuun), and observed in scanning electron  
32 microscope Jeol-JSM 6390 LV (Jeol, Akishima-Shi, Tokyo, Japan).

## 33 Results

### 34 Growth profile and light microscopy

35 During the growth process, the cultures were observed under light microscopy, presenting similar  
36 growth profiles for both culture media used in this assay; however, the same was not observed regarding  
37 temperature. At 28 °C, we observed a tenuous growth until the sixth day that peaked with  $\sim 10^7$   
38 parasites/mL and then it stabilized until day 22. When parasites were submitted to 35 °C and 37 °C

1 temperatures in both culture media, accentuated death was observed after the fourth and sixth days,  
2 respectively. The growth profile of sample RJ4052 cultivated in biphasic medium is shown in Figure 1.

3 Analyses by light microscopy using slides stained with Giemsa were carried out with parasites  
4 cultivated in NNN/Schneider medium at 28 °C. Quantification of the evolutive forms found at the  
5 beginning of the growth curve demonstrated that atypical forms, with no free flagellum, represented 80  
6 %; epimastigote forms with free flagellum, 18 %; and espheromastigote forms, 2 %. These proportions  
7 were maintained throughout the curve and trypomastigote forms were only observed as of the tenth day,  
8 accounting for 2 % (Figure 2). Statistical analysis, mean and standard deviation (SD) were performed  
9 using the GraphPad Prism software.

10 Epimastigote forms with free flagellum were observed in fusiform format in varied sizes, both the  
11 parasite body, with average 18.75  $\mu\text{m}$  +/- 5.31 (10  $\mu\text{m}$  to 27,5  $\mu\text{m}$ ), and the flagellum, with average 21  
12  $\mu\text{m}$  +/- 17.08 (2.0 $\mu\text{m}$  to 40.0  $\mu\text{m}$ ). A discrete undulating membrane was observed in these forms. The  
13 kinetoplast was found in circular or rod formats close to the nucleus, more frequently in the center of the  
14 parasite body. Atypical forms, with no free flagellum, are non motile and are also found in different sizes,  
15 with average 11.75  $\mu\text{m}$  +/- 3.43 (7.5 $\mu\text{m}$  to 16.0 $\mu\text{m}$ ), always in fusiform format. No posterior/anterior end  
16 could be recognized in these forms. It was not possible to visualize the flagellum or any rudiment of this  
17 structure through light microscopy. The kinetoplast was smaller than in the forms with free flagellum,  
18 always located near the nucleus. Throughout the growth curve, was observed the division process of both  
19 epimastigote forms (atypical and typical). Espheromastigote forms presented round format with free  
20 flagellum of different sizes. Trypomastigote forms represented a rare event and were found in fusiform  
21 format, with no significant variation in body and flagellum sizes, showing exuberant undulating  
22 membrane. The kinetoplast was located in the anterior part of the parasite body, but always close to the  
23 nucleus. The morphologic diversity of the *T. caninum* RJ4052 sample in axenic culture is shown in Figure  
24 3.

#### 25 Electron microscopy

26 *Trypanosoma caninum* epimastigote forms presented ultrastructural organization similar to that found in  
27 parasites of the genus *Trypanosoma*, by transmission electron microscopy (TEM) analysis. In all the  
28 forms studied, it was possible to visualize structures such as the kinetoplast located near the nucleus and  
29 the basal body close to the flagellar pocket, both located laterally to the parasite body. We also observed  
30 epimastigote forms with flagellum emerging laterally to the body and forms with no free flagellum, which  
31 were identified as atypical epimastigotes because structures such as basal body and flagellar pocket were  
32 visualized located laterally to the body. Furthermore, epimastigote forms with rudimentary flagellum  
33 were also found (Figure 4).

34 Analysis by scanning electron microscopy revealed typical epimastigote forms with flagella of  
35 different sizes emerging laterally to body. Forms with no free flagellum (atypical epimastigotes)  
36 presented twisted body with longitudinal striae. The fusiform format, with one thin end, was confirmed  
37 by SEM and no structure similar to the flagellum was observed in these forms (Figure 5).

## Discussion

1  
2 The necessity to define the evolutive stages of trypanosomatids is an old concern because this  
3 knowledge is decisive to establish aspects of the life cycle of these organisms (Hoare and Wallace 1966).  
4 In this study, we describe the presence of atypical epimastigote forms, with no free flagellum, that  
5 multiply in the axenic culture of *T. caninum*, constituting an inedited phenomenon in the literature on  
6 evolutive forms of parasites of the genus *Trypanosoma*.  
7  
8

9  
10 Although trypanosomatids organisms are morphologically very heterogeneous, the main characteristic  
11 that distinguishes their morphological stage is the arrangement of the flagellum in the body, as  
12 determined by its starting point. According to Hoare and Wallace (1966), epimastigote forms were  
13 defined as "... stage represented by forms with just a nuclear kinetoplast; flagellum arising near it and  
14 emerging from the side of the body to run along a short undulating membrane ..." Considering this  
15 definition and the results obtained by TEM, the forms with no free flagellum described herein were  
16 classified as atypical epimastigote forms. Structures such as basal body and flagellar pocket, which  
17 constitute an indispensable set for the presence of flagellum (Kohl and Bastin 2005) were visualized  
18 located laterally in these forms, a fact that reinforces our interpretation.  
19  
20

21  
22 Non-flagellated cells are defined as mutant forms and these conditions were reported in different  
23 species of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* (Cuvelier et al. 2003; Kohl et al. 2003; Zauli et al.  
24 2012). It is well known that genes and specific proteins are involved in the assembling of the flagellar  
25 structure of these parasites (Thiel et al. 2008). Although mutant forms present stable phenotype (Kohl and  
26 Bastin 2005), this characteristic was not observed in our study, in which it was possible to verify that  
27 flagellated forms originate from forms with no free flagellum. By optical microscopy (as shown in Figure  
28 3), can be clearly observed that some atypical forms with no flagellum, elongate at first and then develop  
29 the flagellum, displayed as typical epimastigotes with a very long flagellum. We also verified that some  
30 forms with no flagellum do not differentiate, but do not prevents its growth, remaining in the culture until  
31 the thirtieth day of observation. For some reason, these forms were not able to trigger the mechanism for  
32 the development and growth of the flagellum. Investigation of the functional role of genes involved both  
33 in the formation and in the development of the flagellum of this agent is essential to clarify the  
34 phenomena described herein.  
35  
36

37 We started this study with one isolate of *T. caninum*, but the characteristics herein reported are  
38 common to practically all samples of this species obtained so far. This fact suggests that this characteristic  
39 may be specific of this agent, and that these atypical forms may be found in some stage biological cycle  
40 of this parasite still little studied.  
41  
42

43 Initially, we speculated whether the arising of atypical epimastigote forms could have been caused by  
44 culture conditions, once they were adapted from the routine for the diagnosis of leishmaniasis (Madeira et  
45 al. 2009; Almeida et al. 2011; Barros et al. 2012) and do not correspond to the conditions commonly used  
46 for parasites of the genus *Trypanosoma* (Lustosa 1978; Bourguignon et al. 2006; Eloy et al. 2012). To  
47 address this question, we maintained the RJ4052 sample in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium and  
48 verified the same phenomena (data not shown), which demonstrates that such condition was not  
49 responsible for the emergence of atypical forms with no flagellum. Interestingly, we noticed that these  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 atypical forms were not reported for the first isolate of this species (Madeira et al. 2009). As it is well  
2 known, in vitro culture has considerable impact in certain subpopulations of parasites, modulating  
3 morphological and functional characteristics (Dey et al. 2002; Devera et al. 2003). This would be one  
4 possible explanation given that stock A27, the first *T. caninum* isolate (Madeira et al. 2009), has remained  
5 in our laboratory and has not presented such forms. It is important to emphasize that, at molecular level,  
6 all *T. caninum* isolates previously described are grouped in the same cluster (Barros et al. 2012).  
7

8  
9 Most studies of cultivation of *Trypanosoma* parasites are conducted at about 25 °C-28 °C (Camargo  
10 1964; Brun and Jenni 1985; Contreras et al. 1998; Archer 2009) and this condition is an important factor  
11 for the maintenance of *T. caninum*. Cultures carried out at 35 °C and 37 °C were not successful,  
12 demonstrating that this agent is sensitive to high temperatures. The fact that *T. caninum* is found  
13 exclusively on skin may present correlation with this characteristic, although more studies are necessary  
14 to prove this hypothesis. Another interesting datum of our study was to note that atypical epimastigote  
15 forms are often found growing in clusters and we speculate that may be this is not a random phenomenon.  
16 In *Leishmania* parasites, the frequency of rosette formation was temperature dependent and this  
17 organization was considered important to the activation of the sexual process in these organisms  
18 (Iovannisci et al. 2010).  
19

20  
21 Little is known about the developmental cycle, tissue tropism, and pathogenicity of *T. caninum*, and  
22 we considered that the arising of these atypical forms may result from a disturb by interfering specific  
23 proteins. These interfering protein leads to the inability to form and regulate the flagellum length. As  
24 previously shown in non-flagellated cells from *T. brucei* mutants, the cellular organization was severely  
25 perturbed, demonstrating that the formation of the flagellum is a step important in many physiological  
26 and structural aspects of the trypanosomatids (Kohl et al. 2003).  
27

28  
29 In summary, considering that the flagellum is a structure involved in widely different functions of  
30 trypanosomatids, the findings reported herein bring additional data to the study of *T. caninum*. These data  
31 will be useful to clarify some aspects on the cell cycle of this intriguing parasite that has been reported in  
32 various regions of Brazil.  
33

#### 34 **Acknowledgments**

35 This research is part of the PhD thesis in Clinical Research in Infectious Disease of Juliana Helena da  
36 Silva Barros in the Program of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação  
37 Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.  
38

39 We also thank the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform of the Instituto Oswaldo Cruz (IOC),  
40 Fundação Oswaldo Cruz for technical support and analyses. The present study was partially supported by  
41 CNPq (Program Papes VI – process 407700/2012-9).  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- 1  
2 Almeida ABPF, Sousa VR, Boa Sorte E, Figueiredo FB, de Paula DA, Pimentel MF, Dutra V, Madeira  
3 MF (2011) Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally  
4 infected dogs. Vector Borne Zoonotic Dis 11:1555-1560. doi: 10.1089/vbz.2011.0723  
5  
6  
7 Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF (2012)  
8 Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection  
9 by *Trypanosoma caninum*. Res Vet Sci 93:1329-1333. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006  
10  
11 Archer SK (2009) Standard culture medium allows clonal dilution of *Trypanosoma brucei* procyclic cells  
12 after auto-conditioning. Mol Bioch Parasitol 164:100-103. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.003.  
13  
14 Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S (2003) The  
15 trypanosomiasis. Lancet 362:1469-1480  
16  
17 Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, Baptista C, Madeira  
18 MF (2012) Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil:  
19 what is the real impact of canine leishmaniasis control? Trans Roy Soc Trop Med Hyg 106:419-423.  
20 doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.014  
21  
22 Bourguignon SC, Meloo CB, Santos DO, Gonzalez MS, Souto-Padron T (2006) Biological aspects of the  
23 *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote,  
24 obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. Acta Trop 98:103-109.  
25 doi:10.1016/j.actatropica.2006.02.006  
26  
27 Brun R, Jenni L (1985) Cultivation of african and south american trypanosomes of medical or veterinary  
28 importance. Br Med Bull 41:122-129  
29  
30 Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic  
31 trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo 6: 93-100  
32  
33 Contreras VT, Lima AR, Zorrilla G (1998) *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and  
34 antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 753-760  
35  
36 Cuvillier A, Miranda JC, Ambit A, Barral A, Merlin G (2003) Abortive infection of *Lutzomyia*  
37 *longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania*  
38 *amazonensis* parasites. Cell Microb 5:717-728  
39  
40 Cuvillier A, Redon f, Antoine JC, Chardin P, DeVos T, Merlin G (2000) LdARL-3A, a *Leishmania*  
41 promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity. J Cell  
42 Sci 113:2065-2074  
43  
44 Devera R, Fernandes O, Coura JR (2003) Should *Trypanosoma cruzi* be called. *T. cruzi*. complex? A  
45 review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and  
46 mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 1-12  
47  
48 Dey T, Afrin F, Anam K, Ali N (2002) Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a  
49 role for media, source, and strain of parasite. J Euk Microbiol 49:270-274  
50  
51 Eloy LJ, Lucheis SB (2012) Hemoculture and polymerase chain reaction using primers TCZ1/TCZ2 for  
52 the diagnosis of canine and feline trypanosomiasis. ISRN Vet Sci 2012:419378. doi:  
53 10.5402/2012/419378  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Backweel Scientific  
2 Publications, Oxford and Edinburg, UK p 327- 400
- 3 Hoare CA, Wallace F (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology.  
4 Nature 212:1385 -1386
- 5 Iovannisci DM, Plested CP, Moe GR (2010) Evidence for rosettes as an unrecognized stage in the life  
6 cycle of *Leishmania* parasites. J Eukaryot Microbiol 57:405-414. doi: 10.1111/j.1550-  
7 7408.2010.00496.x
- 8  
9  
10 Jensen RE, Englund PT (2012) Network news: the replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol  
11 66:473-479. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150057
- 12  
13 Kohl L, Bastin P (2005) The flagellum of trypanosomes. Int Rev Cytol 244:227-284
- 14  
15 Kohl L, Robinson D, Bastin P (2003) Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis  
16 of trypanosomes. EMBO J 22:5336-5346
- 17  
18 Lainson R, da Silva M, Franco CM (2008) *Trypanosoma (Megatrypanum) saloboense* n. sp.  
19 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasite of *Monodelphis emiliae* (Marsupiala: Didelphidae)  
20 from Amazonian Brazil. Parasite 15:99-103
- 21  
22  
23 Lima L, Maia da Silva F, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M, Souza W, Hamilton PB,  
24 Teixeira MMG (2012) Evolutionary insights from bats trypanosomes: morphological, developmental  
25 and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erney* sp. Nov. in  
26 African Bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. Protist  
27 163:856-872. doi: 10.1016/j.protis.2011.12.003
- 28  
29  
30 Lustosa ES (1978) Crescimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em meio líquido. Rev Pat Trop 3-  
31 4:183-192
- 32  
33 Machado CR, Augusto-Pinto P, McCulloch R, Teixeira SMR (2006) DNA metabolism and genetic  
34 diversity in Trypanosomes. Mutation Res 612: 40-57
- 35  
36 Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A Paula CC, Faissal BNS,  
37 Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MCA (2009) *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa:  
38 Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de  
39 Janeiro, Brazil. Parasitol 136:401-413. doi: 10.1017/S003118200900554X
- 40  
41  
42 Oladiran A, Belosevic M (2012) Immune evasion strategies of trypanosomes: a review. J. Parasitol  
43 98:284-292. doi: 10.1645/GE-2925.1
- 44  
45  
46 Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Barros JHS, Paula CC, Toma HK,  
47 Madeira MF (2010) Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil.  
48 Parasitol 137:1653-1660. doi: 10.1017/S0031182010000417
- 49  
50 Souza W. Special organelles of pathogenic protozoa (2002) Parasitol Res 88:1013-1025
- 51  
52 Thiel M, Harder S, Wiese M, Kroemer M, Bruchhaus I (2008) Involvement of a *Leishmania* thymidine  
53 kinase in flagellum formation, promastigote shape and growth as well as virulence. Mol Biochem  
54 Parasitol 158:152-162. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.12.005
- 55  
56 Viola LB, Mattias M, Takat CS, Campner M, Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG (2009)  
57 Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate  
58 dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake trypanosomes: *Trypanosoma*  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1                    *serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus*  
2                    *terrificus*. J Eukaryot Microbiol 56:594-602. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00444.x  
3                    World Health Organization (2002) Control of Chagas Disease: Second Report of the WHO Expert  
4                    Committee. UNDP/World Bank/WHO, Geneva  
5                    Zauli RC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Miguel DC, Moura AS, Pereira LIA, Silva IA, Lemes LGN, Dorta  
6                    ML, Oliveira MAP, Pitaluga AN, Ishikawa EAY, Rodrigues JCF, Traub-Cseko YM, Bijovsky AT,  
7                    Ribeiro-Dias F, Uliana SRB (2012) A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis*  
8                    isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. Parasit Vect 5:1-11. doi: 10.1186/1756-3305-5-11  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Figure legends

**Fig. 1.** Growth curve profile of *Trypanosoma caninum* RJ4052 sample in biphasic medium (NNN+Schneider) at 28 °C, 35 °C and 37 °C. Data show the averages of three counts at each curve point.

**Fig. 2.** Graph showing the proportion of atypical epimastigote forms, and epimastigote, trypomastigote, espheromastigote forms observed during the growth curve of *Trypanosoma caninum* RJ4052 sample in NNN/Schneider medium at 28 °C.

**Fig. 3.** Photomicrographs illustrative of the morphological diversity of culture forms of *T. caninum* (isolate RJ4052) during the growth curve. Epimastigotes: **a, b, c, d, e** atypical forms – with no free flagellum; **f, g, h, i, l** short flagellum; **j, n, r** medium flagellum; **s, t** long flagellum; **b, m** forms under division; **p, q** espheromastigotes; and **o** trypomastigote. Giemsa stained. 1000x. Scale bar – 10.0 µm

**Fig. 4.** Transmission electron microscopy (TEM) of thin sections from epimastigote forms of *T. caninum* (RJ4052) culture. **a, b** Longitudinal section of showing nucleus, kinetoplast, basal body, flagellar pocket (arrow) without the emergence of the flagellum. **c** Transverse section showing nucleus, kinetoplast, and short flagellum (arrow). **d** Transverse section of forms under division showing two nucleus (arrow), kinetoplast, basal body, flagellar pocket with the emergence of the flagellum. **e** Longitudinal section showing nucleus, kinetoplast, basal body, flagellar pocket, and flagellum. **f** Longitudinal section showing the whole body length and nucleus, kinetoplast, flagellar pocket, and flagellum. Nucleus (N), kinetoplast (K), basal body (BB), flagellar pocket (FP), flagellum (F). Scale bar - 0.5 µm in **a** and **b**, 1.0 µm in **c** to **e**, 2.0 µm in **f**.

**Fig. 5.** Scanning electron microscopy (SEM) of epimastigote and espheromastigote culture forms of *T. caninum* (RJ4052). **a, b, c** Atypical epimastigote forms with no flagellum showing a twisted body with longitudinal striae; these forms are often observed adhered to the body; **d, e, f** Atypical epimastigote forms presenting oval format with one thin end and one rounded end. **g** Espheromastigote with medium flagellum. **i** Epimastigote with medium flagellum. **h, j** Epimastigotes with long flagellum. Scale bar - 2.0 µm in **a** to **c**, 5.0 µm in **d** to **j**.

Figure 1

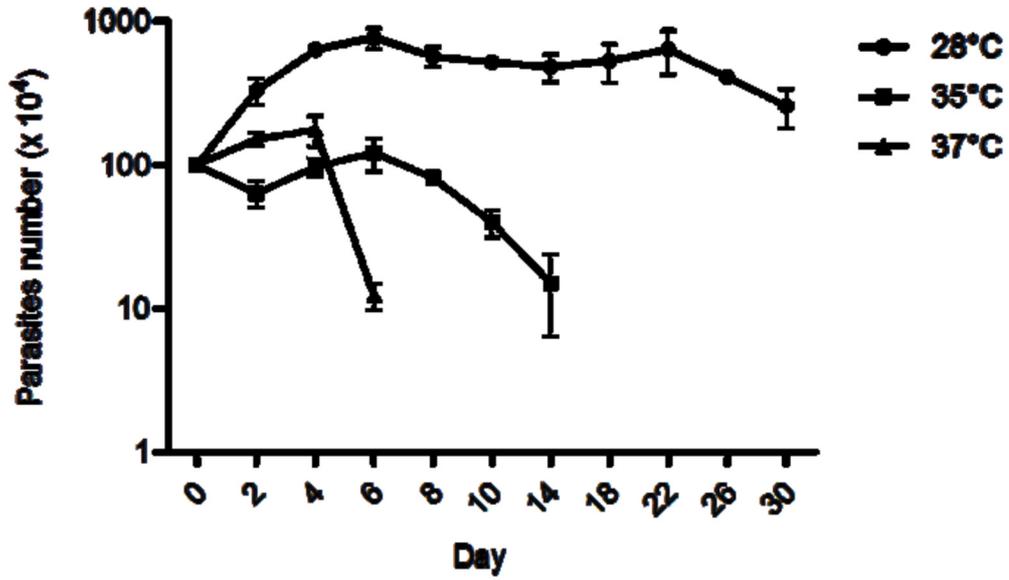


Figure 2

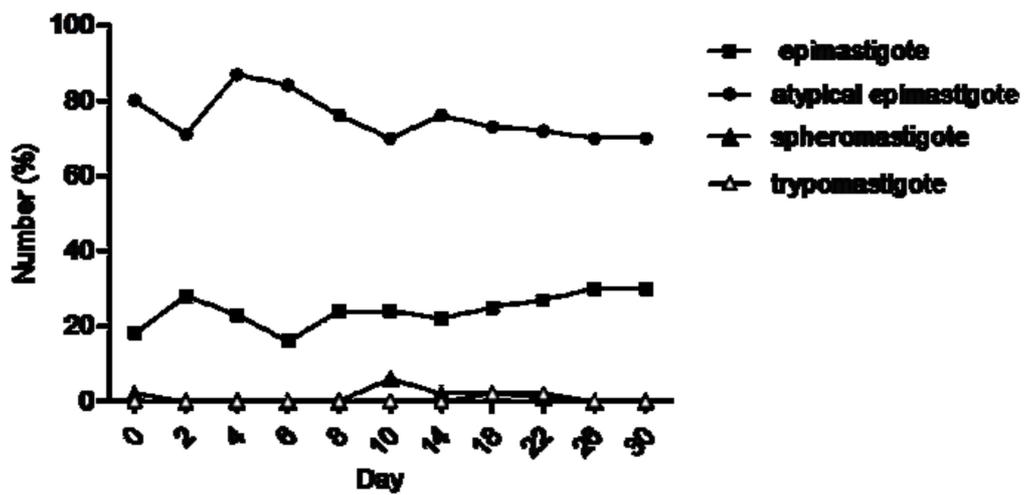


Figure 3

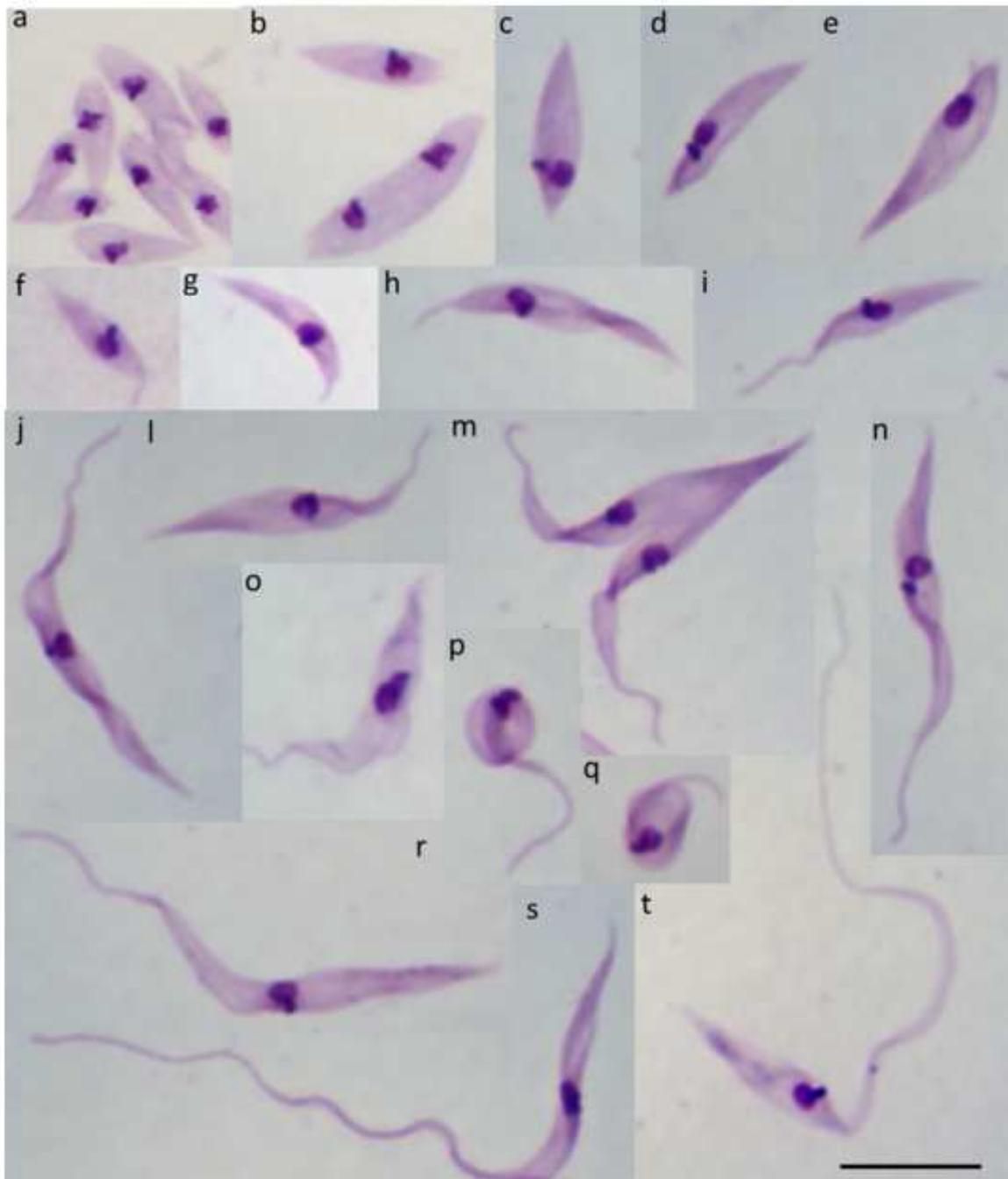


Figure 4

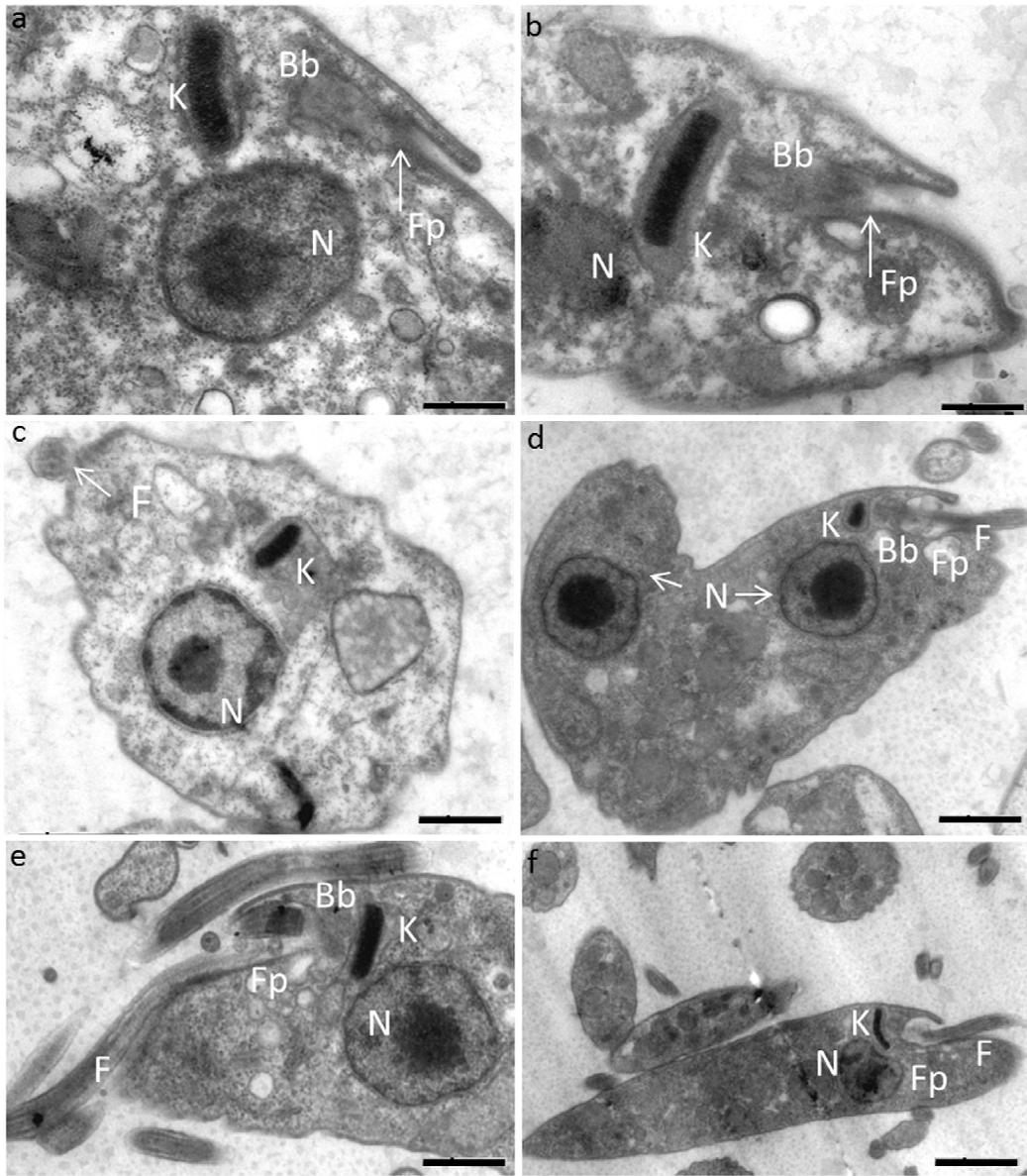
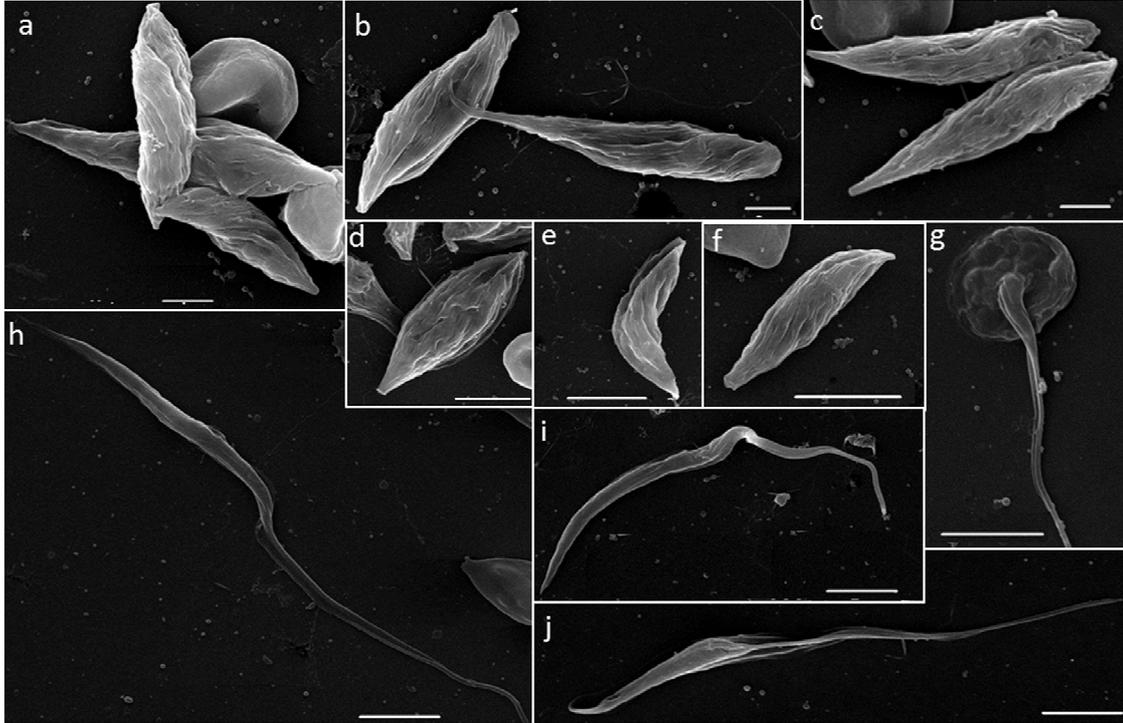


Figure 5



#### 4. Discussão geral

Parasitas do gênero *Trypanosoma* possuem ampla variedade de hospedeiros vertebrados podendo ser agrupados filogeneticamente em quatro diferentes clados: aquáticos, mamíferos, terrestres e aves. Dentre os parasitos de mamíferos, *Trypanosoma caninum* foi descrito como uma nova espécie em 2009, infectando naturalmente cães domésticos (Madeira et al., 2009). *T. caninum* é um parasito ainda pouco conhecido, sendo nosso principal objetivo acrescentar e divulgar informações sobre esse parasito. Nesse sentido, nosso primeiro passo foi a identificação de todos os isolados descritos, utilizando para isso um alvo molecular conservado, a subunidade 18S do gene ribossômico e posterior análise das sequências nucleotídicas. Essa abordagem demonstrou que todas as 57 amostras de *T. caninum* estudadas, eram geneticamente idênticas ou muito semelhantes, sendo agrupadas em um único clado, substancialmente diferente das outras espécies do gênero *Trypanosoma*. Esses dados foram apresentados no artigo nº 1 e corroboram a classificação de *T. caninum* como uma nova espécie, pois dados de caracterização desses parasitos restringiam-se somente ao primeiro isolado (*stock* A27) e informações bioquímicas de 19 amostras do Rio de Janeiro (Pinto et al., 2010). No decorrer deste estudo, duas novas amostras foram isoladas no município do Rio de Janeiro (dados não apresentados), totalizando até o momento 59 amostras de *T. caninum* descritas no Brasil.

No artigo nº 1, relatamos, pela primeira vez, a presença de *T. caninum* nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal, além dos casos já descritos no estado do Rio de Janeiro (Madeira et al., 2009; Pinto et al., 2010; Almeida et al., 2011). Esses dados seguramente demonstram que *T. caninum* está circulando entre cães em diferentes regiões do Brasil, ressaltando a importância do estudo deste parasito. É importante mencionar que alvos direcionados para regiões conservadas do

genoma, como a região da subunidade 18S do gene ribossomal (rDNA), são muito utilizados com fins diagnósticos, sobretudo para identificação de novas espécies (Lima et al., 2012; Simo et al., 2013; Villareal et al., 2013). Um dado interessante encontrado em nosso estudo foi o fato de que este mesmo alvo também foi capaz de amplificar DNA de *T. caninum* em amostras cutâneas, já que algumas amostras de cultivo foram perdidas. Esse resultado demonstra que a PCR, empregando esse alvo, pode constituir uma ferramenta útil para o rastreamento molecular desse parasito, sobretudo em estudos retrospectivos.

O interesse pelo estudo de *T. caninum* foi motivado também pelo fato do parasito infectar o reservatório doméstico de *L. chagasi* (sin. *L. infantum*), agente da leishmaniose visceral (LV) e esse fenômeno interferir no controle desse importante agravo. Todas as regiões onde *T. caninum* foi encontrado são áreas endêmicas de LV e nessas regiões, os cães positivos (ou sororeatores) são recolhidos e eutanasiados pelos programas de vigilância epidemiológica por constituírem um dos principais elos no ciclo de transmissão (Mistério da Saúde, 2006). O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é dado principalmente pela sorologia e embora *T. caninum* pareça não ser patogênico para o cão, a sua ocorrência em áreas de sobreposição com *L. chagasi* pode causar confusão na identificação de cães sororeatores, já que ferramentas sorológicas não discriminam ambos os parasitos (Silva et al., 2012). Em 2012, o *status* sorológico de cães infectados por *T. caninum* foi investigado e tais resultados apontaram que esta infecção pode confundir o diagnóstico da LVC (Alves et al. 2012) e constitui um alerta para a vigilância epidemiológica. Isto ressalta a necessidade do estudo de *T. caninum* por diferentes abordagens, mas principalmente na determinação de ferramentas diagnósticas específicas e sensíveis que possam assegurar a identificação e

discriminação desses agentes na infecção canina. Assim, o conhecimento de aspectos moleculares desse agente é fundamental nesse processo e nosso estudo visou dar contribuições nesse campo cujos resultados são apresentados no artigo nº 2 desta tese.

Os tripanosomatídeos são geneticamente muito heterogêneos e esse aspecto pode estar relacionado às características do genoma desses organismos ou mesmo, a outros fatores que possuem influência nesse contexto (Desquesnes e Dávila 2002). *T. caninum* tem sido isolado de diferentes regiões do Brasil e um dos objetivos do nosso estudo foi conhecer a diversidade genética desse agente e avaliar se possíveis padrões genéticos poderiam ser correlacionados com a região geográfica do isolamento, como já demonstrado em estudos com outras espécies de tripanosomatídeos (Ferreira et al., 2007; Viola et al., 2008; Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012).

Das 57 amostras de *T. caninum*, 50 foram estudadas com esse objetivo e, os resultados demonstraram alta similaridade entre todos os isolados, independente da sua procedência geográfica ou marcador molecular utilizado (18S rDNA, 24Sα rDNA ou Cyt b). Mesmo quando foram utilizados alvos moleculares para genes de evolução rápida foram obtidos os mesmos resultados. Neste estudo foram empregados alvos para o gene Cyt b (maxicírculos do kDNA) e para região do ITS, que são amplamente utilizados em estudos de polimorfismo genético de tripanosomatídeos (Ferreira et al., 2007; Lima et al., 2008; Auty et al., 2012). Sendo assim, de acordo com esses resultados e o valor de bootstrap encontrado (~100%) nas árvores filogenéticas, sugerimos que *T. caninum* possua uma história evolutiva independente das outras espécies do gênero *Trypanosoma*.

A homogeneidade genética entre os isolados de *T. caninum* também foi confirmada quando foram empregadas as técnicas de RFLP e a clonagem molecular. O

estudo da região ITS rDNA por PCR-RFLP é muito empregado visando avaliar a diversidade intraespecíficas entre isolados. Lima et al., 2008 estudando amostras de *T. evansi* isoladas de diferentes hospedeiros relataram elevada homogeneidade entre 41 isolados. Entretanto, em outro estudo com amostras de *T. theileiri* os autores encontraram alta variabilidade entre as amostras (Rodrigues et al., 2006). Esses resultados mostram que o marcador molecular utilizado pode nos fornecer informações distintas de acordo com a espécie estudada, demonstrando importantes diferenças entre os organismos. Vale lembrar que as amostras de *T. caninum* estudadas são de ambientes geográficos restritos (peridoméstico e doméstico) e por esse motivo o baixo nível de polimorfismo observado deve ser considerado com cautela. Na análise das sequências da região ITS rDNA foram encontradas aproximadamente de 40 sítios polimórficos, o que indica algum grau de heterogeneidade entre os isolados. Também é importante mencionar que o Brasil é um país de extensa área geográfica e padrões epidemiológicos variados. Nesse contexto, mais informações podem ser obtidas através da investigação de *T. caninum* em outras regiões geográficas e em outros hospedeiros, como os canídeos silvestres e animais sinantrópicos que são expostos a padrões epidemiológicos mais complexos.

Outra característica interessante e distinta de *T. caninum* que este estudo demonstrou se relaciona ao tamanho da região hipervariável dos minicírculos de kDNA. Essa região é amplamente utilizada com fins de caracterização e pesquisa de variabilidade genética entre as espécies do gênero *Trypanosoma*, sobretudo *T. cruzi* (Brito et al., 2008; Rodríguez et al., 2009). Utilizando os iniciadores 121/122 em ensaios da PCR, *T. caninum* apresentou dois produtos, um com tamanho de 330 e outro com 350 bp. Esse padrão é diferente quando comparado com outras espécies do gênero

*Trypanosoma*. O protozoário *T. cruzi* é uma espécie amplamente estudada por esse alvo e apresenta um produto de 330bp. Garcia et al. (2012), em seu estudo também relataram diferenças de tamanho dessa região em amostras de *T. c. marinkelli* (280 e 350 bp), *T. rangeli* (330 e 380 bp) e *T. dionisii* (600 bp). Sendo *T. caninum* um agente ainda pouco estudado, essa informação será de grande utilidade, principalmente na distinção das espécies de *Trypanosoma* encontradas em mamíferos quando avaliado por alvos moleculares que visem a região dos minicírculos.

Atualmente, a sistemática dos parasitos do gênero *Trypanosoma* conta com inúmeras ferramentas moleculares (Rodrigues et al., 2010; Higuera et al., 2013; Pourjafar et al., 2013) entretanto, aspectos a nível morfológico, embora limitados para algumas abordagens, também são importantes como elementos auxiliares para identificação, sobretudo na distinção dos estágios evolutivos dos tripanosomatídeos (Lainson et al., 2008; Madeira et al., 2009; Viola et al., 2009; Lima et al., 2012; Martinkovic et al., 2012). O estudo de uma nova espécie deve considerar também, aspectos relacionados à biologia, entre os quais citamos o conhecimento das formas evolutivas que os parasitos apresentam durante o seu ciclo biológico. Assim, nosso estudo, através dos resultados apresentados no artigo nº 3 contribui para o conhecimento de aspectos morfológicos de *T. caninum*. As formas evolutivas que *T. caninum* assume na infecção do hospedeiro vertebrado ainda não são conhecidas e neste artigo é demonstrada outra particularidade desse parasito. Além das formas evolutivas comumente encontradas no cultivo axênico de parasitos do gênero *Trypanosoma*, tais como formas epimastigotas, tripomastigotas e esferomastigotas, foi detectada a presença de formas epimastigotas atípicas, que se apresentam sem flagelo livre visível e que se multiplicam no cultivo axênico. Em algumas dessas formas atípicas foi possível

observar o desenvolvimento do flagelo, as quais deram origem às formas epimastigotas típicas que apresentaram flagelos de diferentes tamanhos durante a curva de crescimento. Parasitos mutantes, sem flagelo, são descritos na literatura para diferentes gêneros e espécies de tripanosomatídeos e, essa condição tem despertado o interesse de pesquisadores, já que o flagelo está relacionado a atividades funcionais e biológicas desses organismos (Kohl e Bastin, 2005).

Nos tripanosomatídeos, o flagelo é considerado uma estrutura altamente sofisticada e problemas na expressão de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento dessa organela estão relacionadas ao aparecimento de formas mutantes sem flagelo (Bastin et al. 1999). Quando proteínas do axonema foram estudadas, comparando parasitos flagelados e não-flagelados, foi constatado que nas formas flageladas essas proteínas estão presentes e nas formas aflageladas, ausentes (Li et al. 2004). Neste estudo, foi demonstrada a presença de formas mutantes sem flagelo livre, claramente evidenciado por técnicas de microscopia óptica e eletrônica. Tais fatos apontam para a possibilidade de que o surgimento dessas formas atípicas possa ser resultante de um processo perturbado durante a divisão celular desse parasito, que leva à incapacidade de formar e alongar o flagelo. As razões deste fenômeno ainda são desconhecidas, mas, considerando-se que *T. caninum* é um agente ainda pouco estudado, essa informação pode ser útil para esclarecer aspectos do ciclo biológico desse parasito. Adicionalmente, a investigação do papel funcional de genes envolvidos tanto na formação como no desenvolvimento do flagelo são importantes para esclarecer tais fenômenos.

Neste estudo, a condição ótima de crescimento de *T. caninum* foi à temperatura de 28°C utilizando meio NNN acrescido de meio Schneider. Esse resultado foi interessante principalmente porque essa condição é a mesma utilizada na rotina de

isolamento desse agente. Apesar de até o momento, contarmos com 59 amostras de *T. caninum*, em todos os isolamentos o objetivo foi o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) (Barros et al., 2012). Essa condição de cultivo (NNN + Schneider) difere da literatura sobre a manutenção de parasitos do gênero *Trypanosoma* no qual o frequentemente é utilizado o meio LIT (Lustosa, 1978). Já as temperaturas de 35,5° e 37°C não favoreceram o crescimento de *T. caninum*, demonstrando que esse agente seja sensível a temperaturas mais elevadas, diferente de outros parasitos desse gênero. Interessante lembrar que *T. caninum* somente foi isolado de pele, sítio que possui temperatura mais baixa quando comparado aos órgãos internos.

O fato das formas epimastigotas atípicas serem observadas praticamente em todas as amostras de *T. caninum* também pode sugerir que essas formas estejam envolvidas em alguma etapa do ciclo de vida desse parasito, embora isto precise ser estudado de forma mais aprofundada.

Nossos resultados contribuíram para a divulgação das áreas onde *T. caninum* tem sido encontrado e certamente representam um avanço na compreensão biológica e molecular deste surpreendente parasito.

O presente estudo traz dados inéditos sobre *T. caninum*, principalmente relacionado aos aspectos morfológicos e genéticos. Consideramos que as publicações apresentadas nesta tese consolidam informações anteriores e adicionam novos dados. No entanto, diversas perguntas ainda persistem sobre esse intrigante agente cujas respostas ficarão na dependência de investigações mais aprofundadas.

Estudos futuros deverão investir no esclarecimento do ciclo biológico, eleição de ferramentas diagnósticas e, na pesquisa do possível envolvimento de outros hospedeiros vertebrados, como canídeos silvestres e animais sinantrópicos, os quais estão expostos a

diferentes padrões epidemiológicos. Além disso, a infecção natural por *T. caninum* deve ser considerada nos inquéritos epidemiológicos e pesquisada em outras regiões do Brasil a fim de avaliar a real prevalência e distribuição geográfica desse agente parasitário no Brasil. Por fim, é considerado que contribuíram para um maior conhecimento desse novo parasito e, de uma forma interessante, agregou metodologias tradicionais como a microscopia às ferramentas moleculares.

## 5. Conclusões

1. A identidade de *Trypanosoma caninum* foi confirmada em todas as amostras estudadas, mostrando a sua circulação nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso;
2. Todas as amostras de *T. caninum* estudadas apresentaram o mesmo padrão genético independente da procedência geográfica e marcador molecular, confirmando que *T. caninum* é uma nova espécie.
3. A homogeneidade genética entre os isolados de *T. caninum* foi confirmada levando a hipótese de ser um parasito composto por uma população altamente homogênea
4. *T. caninum* apresenta no cultivo axênico formas evolutivas típicas do gênero *Trypanosoma*, além das formas epimastigotas atípicas que se apresentam sem flagelo livre, as quais dão origem às formas flageladas.

## 6. Referências

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS. et al. (2012) The revised classification of eukaryotes *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2012; 59: 429-493
- Almeida ABPF, Sousa VR, Boa Sorte E, Figueiredo FB, Paula DA, Pimentel MF. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11: 1555-1560
- Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RVC, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res Vet Sci.* 2012; 93: 1329-1333
- Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J, Hoare R. et al. Trypanosome Diversity in Wildlife Species from the Serengeti and Luangwa Valley Ecosystems. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1828
- Barker JR, Thompson GB. Two species of *Trypanosoma* from British Chiroptera (Bats). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1971; 65:427
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of genus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2003; 2: 201-208
- Barrett MP, Burchmore RJS, Lazzari A, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiases (Seminar) *Lancet* 2003; 362: 1469-1480
- Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS. et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106: 419-423
- Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K. Flagellum ontogeny studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci.* 2000; 113: 3321-3328
- Bastin P, MacRae TH, Francis SB, Matthews KR, Gull K. Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 8191-8200
- Botero A, Ortiz S, Muñoz S, Triana O, Solari A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* of Colombia using minicircle hybridization tests. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68: 265-270
- Briones MR, Nelson K, Beverley SM, Affonso HT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 53: 121-127
- Brito CM, Lima MM, Sarquis O Pires, MQ Coutinho CF, Duarte R. et al. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008; 103: 1111-1117
- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999; 42:29-112
- Cavazzana Jr, M, Marcili, A, Lima, L, Maia da Silva, F, Junqueira, ACV, Veludo, HH et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH)

- and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats International. *J Parasitol.* 2010; 40: 345–355
- Coleman AW. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 2003; 19: 370-375
- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M. et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2008; 198: 1565-1572
- Dedet JP, Lambert M, Pratlong F. Leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *Presse Médicale* 1995; 24: 1036-40
- Desquesnes M, Dávila AM. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol.* 2002; 109: 213-231
- Desquesnes M, Ravel S, Cuny G. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002, 29: 1-6
- Dietrich P, Soares MB, Affonso MHT, Floeter-Winter LM. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 1993; 125: 103-107
- Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1143: 243-271
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CSA, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitol.* 2007; 134: 1623-1638
- Franco AM, Grimaldi G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 26126-8
- García L, Ortíz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F, Solari A. Phylogenetic analysis of bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome b sequence and minicircle analyses. *Plos One* 2012; 7: e36578
- Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 107: 269-277
- Guevara P, Alonso G, Silveira JF, Mello M, Scorza JV, Añez N, Ramírez JL. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 56:15-26
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004; 34:1393-1404
- Hamilton PB, Stevens RJ. (2010) Resolving relationships between Australian trypanosomes using DNA barcoding data. *Trends in Parasitol.* 2010; 11: 99
- Hernandez R, Rios P, Valdés AM, Pifiero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 41: 207-212

- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* 2013; 6: 112
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes X Revision of the systematic. *J Protozool.* 1964; 11: 200-207
- Hoare CA. 1972. The trypanosomes of mammals: A zoological monograph Backweel Scientific Publications, Oxford and Edinburg, UK
- Junqueira AC, Degraeve W, Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends in Parasitol.* 2005; 1: 270-272
- Kim M, Lee KH, Yoon SW, Kim BS, Chun J, Yi H. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. *Genome Inform.* 2013; 11: 102-113
- Kohl L, Bastin P. The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol.* 2005; 244: 227-284
- Kohl L, Robinson D, Bastin P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* 2003; 22; 5336–5346
- Lainson R, Silva M, Franco CM. *Trypanosoma (Megatrypanum) saloboense* n sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasite of *Monodelphis emiliae* (Marsupiala: Didelphidae) from Amazonian Brazil. *Parasite* 2008; 15: 99-103
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM. et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27: 37-58
- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H. et al. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 2004; 117: 541–552
- Lima ANO, Silva Santos S, Herrera HM, Gama, C, Cupolillo, E, Jansen, AM. et al. *Trypanosoma evansi*: molecular homogeneity as inferred by phenetical analysis of ribosomal internal transcribed spacers DNA of an eclectic parasite. *Exp Parasitol.* 8: 402-407
- Lima L, Maia da Silva F, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M. et al. Evolutionary insights from bats trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erney* sp Nov in African Bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist* 2012; 163: 856-872
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA *Trends in Parasitol.* 2005; 21: 363-369
- Liu H, Fu Y, Jiang D, Li G, Xie J, Cheng J. et al. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *J Virol.* 2010; 84:11876-87
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *PNAS* 2001; 98: 7396-7401
- Madeira, MF, Sousa, MA, Barros, JH, Figueiredo, FB, Fagundes, A, Schubach, A. et al. *Trypanosoma caninum* n sp (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol.* 2009; 136: 411-423

- Marszalek JR, Liu X, Roberts EA, Chui D, Marth, JD, Williams, D S. et al. Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell* 2000; 102: 175–187
- Martinkovic F, Matanovic KI, Rodrigues AC, Garcia HA, Teixeira MMG. *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylogenetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and close relationship with Trypanosomes from other ruminant species. *J Euk Microbiol.* 2012; 59: 134–144
- Masiga DK, Gibson WC. Specific probes for *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 40: 279-284
- Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int J Parasitol.* 1992; 22: 909-918
- Meissner M, Agop-Nersesian C, Sullivan WJ. Molecular tools for analysis of gene function in parasitic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 75: 963-975
- Meyer H, Oliveira Musacchio M, Andrade Mendonça I. Electron microscopy study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and blood agar forms. *Parasitol.* 1958; 48: 1-8
- Ministério da Saúde. 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília
- Moreira D, López-García 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 1861-1875
- Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitol.* 1989a; 99: 57–66
- Moser DR, Kirchhof LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989b; 27: 1477–1482
- Myler P. Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop.* 1993; 53: 205–225
- Naegel MP, Costa PI, Rosa JA. (2006) Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the triatominae *Rhodnius domesticus*, *R pictipes*, *R prolixus* and *R stali*. *Med Vet Entomol.* 2006; 20: 353-357
- Noble ER. The morphology and life cycles of trypanosomes. *Q Rev Biol.* 1955; 30:1-28
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol* 1999; 29: 331-339
- Pacheco RS, Marzochi MC, Pires MQ, Brito CM, Madeira MF, Barbosa-Santos EG. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 531-537
- Pinto AGS, Schubach TMP, Figueiredo FB, Baptista, C, Fagundes, A, Barros, JHS et al. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitol.* 2010; 137: 1653-1660

- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 1328-1332
- Pourjafar M, Badiei K, Sharifiyazdi H, Chalmehm A, Naghib M, Babazadeh M. et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* in Iranian dromedary camels. *Parasitol Res.* 2013; 112: 899–903
- Pulido M, Martínez-Calvillo S, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. *Acta Trop.* 1996; 62: 163-170
- Quadri SS. (1955) The morphology of *Trypanosoma striati* n sp, from an Indian freshwater fish. *Parasitol.* 1955; 45: 79-85
- Ramírez J L, Guevara P. The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1987; 66: 261-277
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E. et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol.* 2013; doi: 101016/j.meegid201306022
- Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Góes-Cavalcante G, Maia da Silva F. et al. (2010) Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitol.* 2010; 137; 111-122
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MMG. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU. *Parasitol.* 2006; 132: 215–224
- Rodrigues IB, Botero A, Meijia-Jaramillo AM, Marquez EJ, Ortiz S, Solari A. et al. Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the sierra nevada de Santa Marta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81: 396–403
- Routh A, Domitrovic T, Johnson JE Host RNAs, including transposons, are encapsidated by a eukaryotic single-stranded RNA virus. *PNAS* 2012; 109:1907-12
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol.* 2011; 79: 257-261
- Simo G, Sobgwi PF, Njitchouang GR, Njiokou F, Kuate JR, Cuny G. et al. Identification and genetic characterization of *Trypanosoma congolense* in domestic animals of Fontem in the South-West region of Cameroon. *Infect Genet Evol.* 2013; 18: 66-73
- Simpson L. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 86: 133–141
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 117-143

- Smith, A, Clark, P, Averis, S, Lymbery, AJ, Wayne, AF, Morris, KD. et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae) Parasitol. 2008; 135: 1329-1335
- Soares MJ, Souza W. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. J Protozool. 1987; 34: 199-203
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. Exp Parasitol. 1999; 91: 306-314
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol. 1993; 62: 45-52
- Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 4: 89-100
- Stevens, J, Gibson, W. The molecular evolution of trypanosomes. Parasitol Today 1999; 15: 432-437
- Sturn NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 1990; 33: 205-214
- Tait A, Morrison LJ, Duffy CW, Cooper A, Turner CM, Macleod A. (2011) Trypanosome genetics: populations, phenotypes and diversity. Vet Parasitol. 2011; 181: 61-68
- Tibayrenc M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases Parasitol Today 1998; 14: 323-329
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala, FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. PNAS 1993; 90: 1335-1339
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and minicircle gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *T. rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. Infect Genet Evol. 2003; 3: 39-45
- Vickerman K. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J Cell Sci. 1969; 5: 163-193
- Vickerman K. 1976. Diversity of the kinetoplastid flagellates In: Biology of the Kinetoplastida WHR Lumsden, DS Evans (eds) Academic Press, London/New York/San Francisco
- Villareal MV, Mingala CN, Rivera WL. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. Acta Parasitol. 2013; 8: 6-12
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CSA, Rodrigues AC. et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. Parasitol. 2008; 136: 55-65
- Viola LB, Mattias M, Takat CS, Campner M, Souza W, Camargo EP. et al. 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*. J Eukaryot Microbiol. 2009; 56: 594-602
- Walker PJ. Organization of function in trypanosome flagella. Nature 1961; 189: 1017–1018
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. Int J Parasitol. 2006; 36: 337-346
- Zauli RC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Miguel DC, Moura AS, Pereira LIA, Silva IA. Et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. Parasit Vectors 2012; 5: 1-11