

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Instituto Oswaldo Cruz

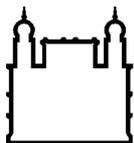
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitaria

**Nova espécie de *Trypanosoma* isolada de *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro:
caracterização biológica e molecular**

Aluna: Camila Madeira Tavares Lopes

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque

Laboratório: Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CAMILA MADEIRA TAVARES LOPES

Nova espécie de *Trypanosoma* isolada de *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro: caracterização biológica e molecular

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2016

Lopes, Camila MadeiraTavares .

Nova espécie de Trypanosoma isolada de Didelphis aurita na Mata Atlântica do Rio de Janeiro: caracterização biológica e molecular / Camila MadeiraTavares Lopes. - Rio de Janeiro, 2016.

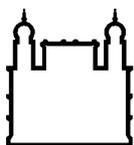
85 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 53-59

1. Trypanosoma. 2. caracterização molecular. 3. Didelphis aurita. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CAMILA MADEIRA TAVARES LOPES

Nova espécie de *Trypanosoma* isolada de *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro: caracterização biológica e molecular

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Claudia Masini d'Ávila Levy (IOC/FIOCRUZ) – Presidente e revisora

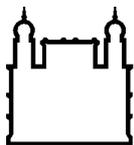
Prof. Dra. Maria de Fátima Madeira (INI/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho (UENF)

Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Marta Helena Branquinha de Sá (UFRJ)

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

v

À vida. Tão bela quanto imprevisível.

AGRADECIMENTOS

Esta história começou há muitos anos. Em 2004, quando era aluna do Curso Técnico de Biologia Parasitária, tive uma aula com integrantes do Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos e gostei muito da abordagem interdisciplinar que sempre foi característica do nosso Laboratório. Fiz especialização em nível técnico no mesmo local, mas, por circunstâncias da vida, tive que sair e viver outras aventuras em outros horizontes. Passados cinco anos, em 2010, retornei como aluna de mestrado, orientada pela Dra. Ana Jansen, grande mentora e a quem admiro para além da Ciência. Tivemos muitos percalços e a relação de parceria acadêmica parecia ter tido um fim por grande imaturidade em lidar com as dificuldades que se apresentaram.

Apesar da ajuda da coordenadora da pós-graduação na época, Dra. Ana Gaspar, não consegui prosseguir e abandonei o mestrado. Foi uma das decisões mais difíceis da minha vida, mas não havia outra maneira.

Em 2013 decidi tentar novamente a prova para o mestrado, pensando que talvez conseguisse seguir em outra área, em outro laboratório, já que eu havia maculado minhas relações com o LABTRIP.

Fiz a primeira prova e passei. Fiz a prova de inglês e passei. E passei dias e dias olhando as linhas de pesquisa de outros laboratórios, pesquisando outros orientadores, sem sucesso. Eu sabia onde eu queria estar e, com o auxílio do amigo Vítor Araújo enviei um *email* à Dra. Ana e ao Dr. André Roque. Qual não foi minha surpresa ao perceber que eles me aceitaram de volta? Como diria a Dra. Ana, “ a gente não tem só filho bonito”.

Fiz um projeto maravilhoso e que me realizou de muitas formas. Aprendi muito, mas muito mesmo. Sobre a vida, sobre visões de ciência, sobre respeito.

Tive muita ajuda de muitas pessoas ao longo desse processo que, mesmo sendo de um mestrado, não durou só 2 anos. Já dura 12 anos. Doze anos de amor por um laboratório, por uma visão de natureza, por um jeito de olhar a ciência.

Será impossível colocar no papel todas as pessoas a quem deveria agradecer, pois o espaço não seria suficiente e cobriria meio mestrado e um mestrado inteiro.

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, **Elizabeth e Wayner** por todo o apoio em todas as minhas empreitadas acadêmicas, com ou sem sucesso, e por acreditarem em minha capacidade. Se fiz faculdade, passei num concurso público e hoje estou concluindo o mestrado, devo a eles.

Às minhas tias **Deise e Maria de Lourdes** pelos tão sábios conselhos, aquietando meu caos interior.

Ao meu filho **Gustavo** por ser meu amigo e companheiro mais fiel.

Ao meu orientador **Dr. André Luiz Roque** pela orientação maravilhosa, por ser amigo, por dar broncas e por entender uma orientanda tão interessada quanto desfocada e ajudar a colocar o barco no rumo certo.

À minha orientadora de vida, **Drª. Ana Maria Jansen** por me acolher novamente apesar das decepções do passado, por fomentar meu amor pela ciência e por desconstruir todos os dias as crenças que carregamos como tesouros tão preciosos e que na verdade são grandes bolas de ferro que amarram nosso crescimento. “A ciência é o exercício da incerteza.” Sinto uma honra imensa em poder defender essa dissertação e ter o privilégio de poder homenagear alguém que admiro tanto.

Ao **Dr. Rubem Barreto**, do Laboratório de Biologia Celular, pelo auxílio na realização dos experimentos e aquisição de imagens para a análise morfológica

Ao **Dr. Marcio Pavan**, que ainda na qualificação do mestrado se mostrou prestativo e interessado em auxiliar as análises filogenéticas desse trabalho. Agradeço também toda a paciência e esforço em se fazer entender nas suas explicações.

A **Drª. Mirian Claudia Pereira**, do Laboratório de Ultraestrutura Celular, por estar sempre disposta a discutir a melhor forma de elaborar experimentos, discutir resultados e analisar que caminhos seguir.

À **Liliane, Allanderson, Erick, Francisco e Renata**, todos integrantes do Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo auxílio e paciência na realização dos experimentos

Aos amigos e também “orientadores” **Marcos Lima** e **Carlos Alberto** pela orientação que começou lá em 2004, quando nem sabia o que fazer da vida e entrei no laboratório que mudaria minha visão de ciência, ecologia e parasitologia para sempre. Vocês são fundamentais na minha vida e na vida de todos os alunos. Muito obrigada!

Ao **Dr. Roberto Lent**, ex-diretor do **Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ**, por ter permitido meu afastamento da instituição para a realização desse grande sonho.

Ao **Campus Fiocruz Mata Atlântica** e ao **LABBPMSR IOC/Fiocruz**

A **Pós-Graduação** em Biologia Parasitária por todo o apoio dado no processo de desistência de 2012 e pelo voto de confiança dado na entrevista em 2013

A **Danielle Bilac** e **Juliana Barros** pelos ensinamentos nos primeiros passos no trabalho com Biologia Molecular

A **Cristiane Varella, Elida Brandão, Isabel di Azevedo** e **Maria Augusta Dario (as Lablucas)** por tornarem os dias mais leves e divertidos. Por serem amigas e conselheiras nos momentos em que precisei. Nossa amizade é o título mais importante que levo desse processo.

Aos **amigos do LABTRIP** que fazem do trabalho um prazer, que vivem como uma grande família e com os quais sempre pude contar. Num mundo competitivo como o da Ciência é bom estar num lugar onde todos os trabalhos são feitos a muitas mãos e com muita dedicação. Obrigada pela amizade, companheirismo e por todas as conversas, científicas ou não.

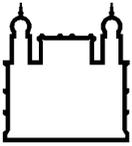
A amiga de todas as horas e dos últimos 17 anos **Juliana Andrade**; com quem passei ensino médio, graduação e pós-graduação; e a amiga **Yasmine Rangel** pelo apoio, companheirismo, risadas e por formarmos o clã que acaba nos sustentando em muitos momentos difíceis.

Aos amigos-irmãos **André Torres** e **Renan Rangel** pela fidelidade, pelas broncas, pela parceria, pelas aventuras, pelos perrengues e pelas discussões filosóficas sobre os rumos da humanidade.

A todos os que cruzaram meu caminho nesses 12 anos de LABTRIP (com grandes intervalos de ausência, mas com nenhum intervalo na vontade de regressar).

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

NOVA ESPÉCIE DE *TRYPANOSOMA* ISOLADA DE *DIDELPHIS AURITA* NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR

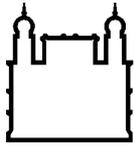
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Camila Madeira Tavares Lopes

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são capazes de infectar todas as classes de vertebrados em todos os continentes. Durante um estudo onde buscávamos detectar infecção por *Leishmania* spp, isolamos flagelados em baço e fígado de um *Didelphis aurita* proveniente do campus Fiocruz da Mata Atlântica. Observamos formas epimastigotas não compatíveis com outros tripanosomatídeos já descritos e os submetemos a caracterização biológica, morfológica e molecular. Para a análise biológica realizamos curva de crescimento e teste de viabilidade em meios de isolamento e manutenção de *Trypanosoma* descritos na literatura. Para a análise morfológica e morfométrica utilizamos esfregaços de cultura em fase exponencial corada pelo Giemsa; microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A análise molecular foi realizada através de PCR (reação em cadeia da polimerase) direcionada ao gene do mini-éxon, à região parcial da subunidade menor ribossomal do gene 18S através dos marcadores 18S SSU e V7-V8, além do gGAPDH. Os produtos amplificados foram sequenciados e a edição e a construção de sequências consenso foi realizada com o programa SeqMan-DNAStar e submetidas a análise por similaridade através do algoritmo Blastn. O alinhamento das sequências foi realizado no programa Mega 5 e as árvores foram construídas utilizando as análises *Neighbour-Joining* (NJ) e Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML). O resultado da análise biológica indicou que os parasitos se replicam quando mantidos em meio Schneider acrescido de 10% SFB e 2% de urina humana masculina. A curva de crescimento durou 5 dias e apenas formas epimastigotas foram identificadas por microscopia de luz (coloração pelo método de Giemsa) e microscopia eletrônica de varredura. A análise morfométrica realizada em imagens de varredura não revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as duas populações: comprimento total dos parasitos de $23,3 \pm 5,9 \mu\text{m}$ e $28,7 \pm 6,2 \mu\text{m}$; comprimento da porção livre do flagelo de $9,5 \pm 3,2 \mu\text{m}$ e $11,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$; e comprimento médio do corpo de $13,8 \pm 3,6 \mu\text{m}$ e $17,1 \pm 3,7 \mu\text{m}$ nas populações de baço e fígado, respectivamente. Como resultado da caracterização molecular, pôde-se definir que as populações de baço e fígado compunham uma mesma espécie e esta espécie apresentava maior similaridade com isolados de morcego neotropicais das Américas do Sul e Central (*Trypanosoma wauwau*) e espécies de *Trypanosoma* de marsupiais australianos. A similaridade tanto com os marsupiais australianos quanto com os morcegos neotropicais, aliada à sua posição basal no clado *cruzi* reacende a

discussão da origem do *T. cruzi* e sugere que talvez as duas hipóteses atualmente apresentadas (“*Southern Supercontinent*” e “*Bat seeding*”) não sejam excludentes e sim complementares. A similaridade filogenética desta nova espécie aqui descrita com espécies de *Trypanosoma* descritos em marsupiais australianos indica que se trata de um parasito bastante antigo que provavelmente derivou-se de um parasito ancestral presente nos marsupiais do Supercontinente Sul. Este parasito pode posteriormente ter sido adquirido por morcegos (*host-switching*) e originado o que hoje conhecemos como *T. wauwau*. Migrações de morcegos infectados e novo *host-switching* para hospedeiros terrestres (tal como proposto na “*Bat seeding hypothesis*”) teria originado o *T. cruzi*. A nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita, juntamente com o *T. wauwau* seriam um elo perdido, o “*missing-link*”, entre as duas teorias que buscam explicar a história evolutiva do gênero *Trypanosoma*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

NEW *TRYPANOSOMA* SPECIES ISOLATED FROM *DIDELPHIS AURITA* IN THE ATLANTIC RAINFOREST OF RIO DE JANEIRO: MOLECULAR AND BIOLÓGICAL CHARACTERIZATION

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Camila Madeira Tavares Lopes

Parasites from *Trypanosoma* genus are able to infect all vertebrate classes in all continents. During a field expedition searching for *Leishmania* infection, we isolated flagellates in spleen and liver from *Didelphis aurita* in the *Campus* Fiocruz da Mata Atlântica, Rio de Janeiro/RJ. We observed epimastigote forms that were not compatible with other trypanosomatids already described, and decided to analyze them by biological, morphological and molecular assays. The parasites replicate when maintained in Schneider's medium with 10% FCS (Fetal Calf Serum). For biological analysis we performed viability and growth curve test in different media for *Trypanosoma* described in the literature. For morphological and morphometric analysis we used, exponential phase culture smears stained by Giemsa; scanning and transmission electron microscopy. Molecular analysis was performed by PCR (polymerase chain reaction) directed to the mini-exon gene, the partial region of the subunit smaller ribosomal gene 18S through 18S SSU and V7-V8 markers, beyond gGAPDH. The amplified products were sequenced and edited, and construction of consensus sequences were done with the SeqMan program DNASTar, and subjected to analysis by similarity using the Blastn algorithm. The alignment and trees were performed by Mega 5 software using the Neighbour-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (Maximum Likelihood - ML) analysis. The biological results of growth curve presented its beginning and end of the logarithmic phase in the 2nd and 4th days, respectively, and only epimastigote forms were identified by light microscopy (Giemsa staining method) and scanning electron microscopy. The morphometric analysis revealed no significant differences ($p < 0.05$) between the two populations: total length of the parasites of $23.3 \pm 28.7 \pm 5,9\mu\text{m}$ and $6,2\mu\text{m}$; length of the free portion of the flagella of $9.5 \pm 3.2 \mu\text{m}$ and $11.6 \pm 3,0\mu\text{m}$; and average body length of $13.8 \pm 17.1 \pm 3,6\mu\text{m}$ and $3,7\mu\text{m}$ in populations of spleen and liver, respectively. As a result of molecular analyzes we could define that the populations of spleen and liver composed an unique species and this species presented a higher similarity with recently described isolates from Neotropical bat from South and Central America (*Trypanosoma wauwau*) and some *Trypanosoma* species from Australian marsupials. The similarity with isolates derived from both Australian marsupials and neotropical bats, combined with its position in the basal *cruzi* clade renews the discussion of the origin of *T. cruzi* and suggests that perhaps the two currently presented hypothesis ("Southern Supercontinent" and "Bat seeding") are not

mutually exclusive, but complementary. The phylogenetic similarity of the new species herein described with *Trypanosoma* species from Australian marsupials indicates that it is a very ancient parasite that probably derived from an ancient parasite present in marsupials from the Southern Supercontinent. This parasite may subsequently have been acquired by bats (host-switching) and originated what we know as *T. wauwau*. Migrations of infected bats and new host-switching for terrestrial hosts (as proposed in "Bat seeding hypothesis") have originated the *T. cruzi*. The new species of *Trypanosoma* herein described, along with *T. wauwau* would be the missing link between the two theories proposed to explain the evolutionary history of *Trypanosoma* genus.

1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Kinetoplastea e Trypanosomatidae	1
1.2 Trypanosoma spp.	3
1.3 Diversidade e novas espécies em tripanossomatídeos	4
1.4 Expansão e dispersão de Marsupialia e Didelphidae	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	10
3.1Objetivos específicos:	10
4.MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1Origem dos isolados	11
4.2Análise Biológica	12
4.2.1Cinética dos isolados	12
4.2.2Testes de meio de cultura	12
4.3 Análise morfológica	13
4.3.1 Microscopia de luz	13
4.3.2 Microscopia Eletrônica	13
4.3.2.1Microscopia Eletrônica de Varredura	14
4.4.Caracterização molecular dos isolados	15
4.4.1 PCR Miniexon	16
4.4.2. Nested-PCR 18S SSU	18
4.4.3. PCR V7V8 SSU	20
4.4.4. PCR gGAPDH	22
4.4.5. Purificação, Sequenciamento e Análise dos produtos amplificados	24
4.5 Análises Filogenéticas	24
5 RESULTADOS	25
5.1.Análise Biológica	26
5.1.1Cinética dos isolados	26
5.1.2 Testes de meio de cultura	26

5.2 Análise Morfológica	27
5.2.1 Microscopia de luz	27
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	28
5.2.3. Microscopia de Eletrônica de Transmissão	29
5.3. Caracterização molecular dos isolados	31
5.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>)	31
5.4 Análise filogenética	34
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO I	60
ANEXO II	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Curva de crescimento de parasitos cultivados em meio bifásico (NNN+Schneider com 10% SFB)	27
Figura 2: Esfregaço de cultura axênica em fase exponencial do isolado Fígado apresentando forma epimastigota.	28
Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigota	30
Figura 4: Microscopia de Eletrônica de Transmissão mostrando a seção longitudinal de célula epimastigota de <i>Trypanosoma</i> sp. isolado de fígado do gambá	31
Figura 5: Gel do PCR-Multiplex para a região não-transcrita do gene do Miniexon	32
Figura 6: Gel do <i>Nested-PCR</i> para a subunidade ribossomal menor.	33
Figura 7: Gel do <i>PCR</i> para a região variável V7-V8 da subunidade ribossomal menor	33

- Figura 8:** Gel da *PCR* para o gene gGAPDH 33
- Figura 9:** Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio 18S SSU para as amostras denominadas “Baco” e “Fígado”. 36
- Figura 10:** Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio V7-V8 para as amostras denominadas “Baco” e “Fígado”. 38
- Figura 11:** Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio gGAPDH para as amostras denominadas “Baco” e Fígado”. 39
- Figura 12:** Árvore concatenada dos marcadores V7-V8 e gGAPDH: 40
- Figura 13:** Árvore de espécies realizada pelo programa *BEAST para os marcadores 18S SSU e gGAPDH: 41

ÍNDICE DE QUADROS

Página

Quadro 1: Informação das sequencias de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no <i>GenBank</i> para o alvo 18S SSU. Ponto de corte 95% de identidade.	35
Quadro 2: Informação das sequencias de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no <i>GenBank</i> para o alvo V7-V8. Ponto de corte 96% de identidade.	37
Quadro 3: Informação das sequencias de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no <i>GenBank</i> para o alvo gGAPDH. Ponto de corte 93% de identidade	38

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 1: Iniciadores utilizados no ensaio do Miniexon e sentido de amplificação do fragmento.	16
Tabela 2: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do miniexon	17
Tabela 3: Iniciadores utilizados no PCR 18S SSU	18
Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do gene 18S SSU	19
Tabela 5: Iniciadores utilizados no PCR da região variável V7V8 SSU:	20
Tabela 6: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR da região variável V7V8 SSU:	21
Tabela 7: Iniciadores utilizados no PCR do gene gGAPDH	22
Tabela 8: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do gene gGAPDH	23
Tabela 9: Resultados obtidos do PCR-Multiplex para a região não-transcrita do gene do Miniexon	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA – *Desoxirribonucleic acid* em inglês, ácido desoxirribonucleico

Hsp 90 – *Heat shock protein* em inglês, proteína de choque térmico

RNA – *Ribonucleic acid* em inglês, ácido ribonucleico

mRNA – *Messenger Ribonucleic acid* em inglês, ácido ribonucleico mensageiro

rRNA – *Ribossomal Ribonucleic acid* em inglês, ácido ribonucleico ribossomal

PCR – *Polymerase chain reaction* em inglês, reação em cadeia da polymerase

FFLB - *Fluorescent Fragment Length Barcoding* em inglês,

DTU – *Discrete Typing Unit* em inglês, unidades discretas de tipagem

LIT – *Liver Infusion Tryptose* em inglês, infusão de triptose de fígado

Maa – milhões de anos atrás

GABI – *Great American Biotic Interchange* em inglês, grande intercâmbio biótico americano

NNN - *Neal, Novy, Nicolle*

SFB – Soro fetal bovino

CFMA – *Campus Fiocruz Mata Atlântica*

DEMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* em inglês, meio de Eagle modificado por Dulbecco

Eagle – Meio mínimo de Eagle

RPMI - Roswell Park Memorial Institute, meio de cultivo celular

TRPMI - Roswell Park Memorial Institute Tryptose, meio de cultivo celular RPMI enriquecido com triptose

LBC – Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz

LUC – Laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto Oswaldo Cruz

LESM – Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular

LABTRIP – Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

PBS – Tampão fosfato salino

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

F – *Forward* em inglês, senso

R - *Reverse* em inglês, anti-senso

Nested-PCR - reação em cadeia da polymerase com duas etapas

SSU – *small subunit* em inglês, subunidade menor

Pb – pares de base

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

TBE – Tampão Tris-EDTA

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* em inglês, ácido etilenodiamino tetraacético

gGAPDH – marcador do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

DNase – enzima degradante de DNA

Blastn – algoritmo matemático usado para busca por similaridade de sequências nos bancos de dados de sequências disponíveis

NJ - Neighbor-Joining

MV - Máxima Verossimilhança

ML – *Maximum Likelihood* em inglês, Máxima Verossimilhança

*Beast - *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* em inglês, análise Bayesiana por amostragem de árvores

P – Probabilidade de hipótese

C- - controle negativo

TryB – Resultado da primeira etapa do *Nested-PCR* do 18S SSU da amostra baço

Try F – Resultado da primeira etapa do *Nested-PCR* do 18S SSU da amostra fígado

SSUB – Resultado da segunda etapa do *Nested-PCR* do 18S SSU da amostra baço

SSUF – Resultado da segunda etapa do *Nested-PCR* do 18S SSU da amostra fígado

B – Resultado do PCR da amostra baço

F – Resultado do PCR da amostra fígado

1 INTRODUÇÃO

1.1. Kinetoplastea e Trypanosomatidae

A classe Kinetoplastea compreende um grupo de protozoários caracterizado pela presença de uma organela exclusiva, o Cinetoplasto. Tal organela representa uma porção especializada dentro de uma única mitocôndria ramificada da célula que contém uma grande massa de DNA mitocondrial e é formada por maxi e minicírculos de DNA (Stevens et al 2008). Os maxicírculos estão em número pequeno, são similares entre si, e codificam genes mitocondriais; enquanto os minicírculos estão presentes aos milhares, em conformação não tão enovelada e são interconectados entre si (Simpson; Lukes; Roger 2002). Outra estrutura característica dos Kinetoplastea são os Glicossomos, que atuam como uma espécie de peroxissomo especializado onde as enzimas da via glicolítica estão compartimentalizadas. Da mesma forma que outras células animais mudam completamente seus peroxissomos nas alterações metabólicas através do processo de autofagia (Monastyrska e Klionsky, 2006), nos tripanossomatídeos parasitas esse processo de *turnover* metabólico, no caso de *T. brucei*, regula não só a expressão do mRNA das diferentes enzimas da via glicolítica como os glicossomos podem ser quase completamente renovados nas mudanças de formas ao longo do ciclo de vida destes parasitas (Szöör et al 2014). Os acidocalcissomos foram primeiramente descritos em tripanossomatídeos e mais tarde descrito também em outros organismos da classe (Docampo; Huang 2015) e são organelas lisossomo relacionadas que atuam como reserva de cálcio, além de ter uma série de bombas de transporte que atuam na sinalização celular e na invasão de células de mamíferos em parasitas intracelulares (como *T. cruzi*, por exemplo) (Docampo; Huang 2015). Outras estruturas, não necessariamente organelas, tem papel crucial em determinadas fases do ciclo de vida de tripanossomatídeos parasitas, como é o caso do citóstoma para *T. brucei*, por onde são recicladas (via endocitose) as moléculas VSG a cada troca de antigenicidade (Matthews 2005).

Anteriormente a classe Kinetoplastea era chamada ordem Kinetoplastida e dividida em duas subordens, Bodonida e Trypanosomatina, baseada em caracteres morfológicos (como número de flagelos; dois e um respectivamente; tamanho do cinetoplasto, tamanho do corpo, distância do cinetoplasto à porção anterior, entre outros caracteres) e no ciclo de vida desses protozoários (Maslov; Podlipaev; Lukes

2001). Entretanto, após o início do uso das ferramentas moleculares como a análise da subunidade menor do ribossomo (18S SSU) e de proteínas conservadas (como Hsp 90) pode-se observar novas relações de parentesco entre os integrantes dessas subordens, levando a um rearranjo desta classificação. Segundo Deschamps (2011), a classe Kinetoplastea divide-se em duas subclasses, Prokinetoplastina (com uma única ordem, Prokinetoplastida) e a subclasse Metakinetoplastina, formada por três ordens de bodonídeos (Eubodonidae, Parabodonidae e Neobodonida) e a ordem Trypanosomatida, cuja única família é a família Trypanosomatidae (Stevens et al 2008; Deschamps et al 2011).

A família *Trypanosomatidae* é formada por dezessete gêneros, sendo doze deles parasitas monoxênicos (é o que possui apenas o hospedeiro definitivo) de insetos, especialmente das ordens *Diptera* e *Hemiptera* (*Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Kentomonas*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Streigomonas* e *Wallaceomonas*), um heteroxênico (é o que possui hospedeiro definitivo e intermediário) com alternância de ciclo de vida entre insetos fitófagos e plantas (*Phytomonas*), e três heteroxênicos com alternância de ciclo entre insetos hematófagos e vertebrados (*Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*). (Maslov; Podlipaev; Lukes 2001). Esta família, portanto, compreende organismos monoxênicos e heteroxênicos e tem os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* como de grande importância médica e veterinária, sendo capazes de infectar praticamente toda classe de vertebrados.

Além dos estudos genômicos para arranjos filogenéticos, outros estudos moleculares revelaram importantes características desse grupo, tais como sistema de edição de RNA complexo e energeticamente custoso, *trans-splicing* de todo mRNA transcrito (que auxilia na variação dos antígenos de superfície - *T. brucei*), arranjo de genes em grandes clusters policistrônicos, alteração de nucleotídeos, compartimentalização da glicólise (glicossomos), mecanismo de escape de sistema imune por utilização de uma superfície celular variável (*T. brucei*) e habilidade de escapar do vacúolo parasitóforo de células fagocíticas de vertebrados (*T. cruzi*) (Simpson; Stevens; Lukes 2006)..

O gênero *Trypanosoma* como flagelo único saindo da região anterior, bolsa flagelar, corpos basais, rede de microtúbulos sub-peliculares, múltiplos lisossomos, paraxonema (ou estrutura paraflagelar), acidocalcissomos e reservossomos. (Acosta et al 2013, Souza 2009 e 2008, Mathews 2005)

1. 2 *Trypanosoma* spp.

O gênero *Trypanosoma* é dividido em duas seções, Salivaria e Stercoraria segundo sua forma de transmissão. As espécies do grupo Salivaria são transmitidas de forma inoculativa por moscas Tsé-Tsé (*Glossina*, Diptera), além de outros vetores na África e Américas, e compreende 5 subgêneros: *Tejeraia*, *Trypanozoon*, *Nannomonas*, *Duttonella* e *Pycnomonas*. Dentre as espécies mais conhecidas desta seção estão o *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* causador da doença do sono em humanos e nagana em animais africanos; além de *T. (T) evansi* e *T. (Duttonella) vivax*, causadores de doenças em animais de produção na África e Américas (Hoare 1972). O sub-gênero *Tejeraia* foi o último a ser criado nesta seção, e inclui apenas o *T. rangeli*. Esse subgênero foi criado devido a uma série de características consideradas diferentes dos demais integrantes dos *Herpetosoma*, como a capacidade de infectar grande número de hospedeiros vertebrados e invertebrados, comportamento no hospedeiro vertebrado (até o momento sua reprodução neste é um tema controverso), rápida invasão das glândulas salivares, patogênico para o hospedeiro invertebrado, entre outras. *Trypanosoma rangeli* caracteriza-se, portanto, por ser um parasito multi-hospedeiro das Américas, transmitido por via inoculativa por insetos do grupo dos Triatomíneos, estando atualmente incluído na seção Salivaria (Añez 1982, Guhl e Valejo, 2003).

Já as espécies do grupo Stercoraria são transmitidas de forma contaminativa por diferentes insetos hematófagos (triatomíneos e outros) e possui três subgêneros (*Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*). O subgênero *Schizotrypanum* é aquele que apresenta maior importância em saúde pública por ser onde está classificado o agente etiológico da Doença de Chagas (humanos) e tripanossomíase americana (outros mamíferos), *Trypanosoma cruzi*, além de diversas outras espécies atualmente descritas apenas em morcegos (Hoare 1972, Haag; O'h Uigin; Overath 1998, Lima 2012, 2013, 2015).

Algumas teorias tentam explicar a separação e a divergência destas seções e a mais aceita até muito recentemente era a da origem das espécies da seção Stercoraria num supercontinente ao Sul que incluía América do Sul, Antártica e Austrália, há aproximadamente 100 milhões de anos. Esta é baseada na Biogeografia de Vicariância e usa a movimentação das grandes massas de terra no

globo para explicar a atual distribuição das espécies (Hamilton, Teixeira e Stevens et al 2012). As poucas espécies desta seção presentes no Velho Mundo seriam exclusivas de morcegos e estabelecidas por deslocamento de seus hospedeiros. O desenvolvimento de técnicas moleculares mostrou, no entanto, que a diversidade de espécies nesta seção era bem mais baixa do que esperado para um grupo que havia divergido há mais de 40 milhões de anos (Hamilton, Teixeira e Stevens et al 2012). Somando-se a isso, tem-se a descrição de 2 novos isolados de *Trypanosoma* em mamíferos terrestres africanos, que estavam filogeneticamente mais próximos do clado *cruzi* do que de *Trypanosomas* africanos (Hamilton et al 2009; Lima et al 2013). Estes foram os principais achados que embasaram a teoria conhecida como “*The bat seeding hypothesis*”, atualmente mais aceita para explicar a origem do *T. cruzi* (Hamilton, Teixeira e Stevens et al 2012). De fato, mesmo após mais de um século de estudos com tripanosomatídeos, ainda estamos longe de entender a origem e os fatores que influenciaram a dispersão deste grupo de parasitos.

1.3 Diversidade e novas espécies em tripanossomatídeos

Atualmente as ferramentas moleculares têm sido de grande valia na descrição de novas espécies de tripanossomatídeos, e têm sido utilizadas para levantamento de prevalência de infecção em mamíferos silvestres (Thompson; Godfrey; Thompson 2014; Adams; Hamilton 2008). Além disso, também auxilia no histórico de relação com os seus hospedeiros e destes com o meio ambiente ao longo do espaço e tempo.

Diversos estudos, especialmente baseados em análises de múltiplas regiões variáveis dos genes 18S e 28S rRNA usando fragmentos de PCR fluorescentes (FFLB- Fluorescent Fragment Length Barcoding) (Noyes 1999; Hamilton; Stevens 2011, Adams; Hamilton; Gibson 2010; Lima et al 2013) vêm mostrando que a diversidade de espécies de *Trypanosoma* também é bem maior do que se conhecia (Hamilton et al 2009; Adams; Hamilton; Gibson 2010; Lima et al 2013).

O uso destes marcadores em amostras de sangue e tecido, sem a necessidade de isolamento em cultura, levou a um aumento significativo no número de espécies de *Trypanosoma* descritas (Noyes 1999, McInnes 2009,2011, Thompson; Godfrey; Thompson 2014, Lima 2009, 2013, 2015), já que evita o viés causado pelo isolamento em cultura, onde as populações parasitárias mais capazes de sobreviver e multiplicar dentro destas condições tendem a suplantar e até

extinguir as que não estejam tão bem adaptadas a estas condições. A Austrália também tem figurado como um terreno fértil para descoberta de novos *Trypanosoma* sp, principalmente após a publicação do *Trypanosoma* sp H25 (Noyes 1999), isolado de um canguru e que levou a criação da teoria do Supercontinente do Sul para a história evolutiva de *Trypanosoma cruzi*. Estes mesmos marcadores mostraram-se capazes não apenas de identificar espécies de *Trypanosoma*, mesmo em amostras de culturas mistas, como também de diferenciar as DTUs de *T. cruzi* (I-VI descritas em Zingales et al 2009) (Hamilton et al 2010) através das técnicas de sequenciamento. Além de auxiliarem na identificação de novas espécies, também são ensaios mais sensíveis em infecções mistas e apresentam um quadro mais próximo da realidade em relação a prevalência de infecção em mamíferos silvestres (Thompson; Godfrey; Thompson 2014 e Adams; Hamilton 2008), auxiliando no histórico de relação com os seus hospedeiros e destes com o meio ambiente ao longo do espaço-tempo.

Em uma revisão de 2014, Thompson; Godfrey e Thompson fizeram um levantamento de diversos tripanossomatídeos identificados através de técnicas moleculares. Entretanto, a maioria destes flagelados não foi isolado em cultura ou não foi detectado no exame a fresco, dificultando a caracterização da espécie e o estudo da sua biologia e morfologia. Dos numerosos isolados geneticamente distintos das espécies conhecidas de tripanossomatídeos, apenas cinco espécies foram formalmente descritas na Austrália; *Trypanosoma thylacis* (Mackerras 1958/1959), *T. copemani* (Austen 2009), *T. irwini* (Mc Innes et al 2009), *T. gilleti* (McInnes et al 2011) *T. vegrandis* (Thompson et al 2013). Já no Brasil tivemos a recente descrição de uma nova espécie de *Trypanosoma* isolado de pele íntegra de cão (*Canis familiaris*) em um estudo epidemiológico de Leishmaniose conduzido nos arredores do Parque Estadual da Pedra Branca e do maciço de Gericinó, Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro/RJ. Este tripanossomatídeo foi isolado em LIT (*Liver Tryptose Infusion*) (Madeira et al 2009). Outros exemplos incluem duas espécies de *Trypanosoma* descritas, respectivamente, em anta (*Tapirus terrestris*), nomeada como *T. terrestris* (Acosta et al 2013) e morcegos neotropicais, nomeada *T. wauwau* (Lima et al 2015). Isso nos mostra que talvez ainda exista uma grande diversidade de espécies desconhecidas de tripanossomatídeos circulando mesmo entre hospedeiros que são muito estudados, como é o caso da investigação de parasitos em pele de cães por conta dos estudos de Leishmaniose Canina.

1.4 Expansão e dispersão de Marsupialia e Didelphidae

Os marsupiais modernos se originaram no fim do Cretáceo (aproximadamente 65 milhões de anos atrás), possuem aproximadamente 300 espécies conhecidas distribuídas entre América e Austrália e são divididos em dois grandes grupos. O clado Australidelphia compreende as ordens Diprotodontia, Peramelemorphia, Dasyuromorphia e Notoryctemorphia que abrange os marsupiais australianos. Já o clado Ameridelphia compreende as ordens Didelphina, Paucituberculata e Microbiotheria. A ordem Microbiotheria é controversa já que o exemplar *Dromiciops gliroides* (Monito del Monte) é filogeneticamente mais próximo de Australidelphia que de Ameridelphia, que suscita discussões quanto ao surgimento e expansão dessa ordem (Mitchell et al 2014).

Dados fósseis, geológicos e filogenéticos acumulados sugerem que os marsupiais modernos se originaram nas Américas e migraram para a Austrália através do continente Antártico no fim do Cretáceo ou Paleoceno. Segundo estudos feitos por Beck em um calcanhar de um Metatherio da fauna Tingamarra do início do Eoceno no nordeste da Austrália, a distribuição dos marsupiais na Gondwana não pode ser explicada por um único evento de dispersão da América do Sul e Austrália. Segundo o autor, é mais provável que tenham ocorrido múltiplas dispersões de marsupiais entre a América do Sul e a Austrália (Beck 2012, Nilsson 2010). O ponto em comum dentre todas as teorias que busca explicar a dispersão dos marsupiais é o fluxo migratório de marsupiais ancestrais do que seria hoje a Austrália em direção ao que seria hoje a América do Sul, incluindo um longo período de união entre esses dois continentes.

Após a definitiva separação dos continentes, a América do Sul permaneceu isolada durante longo tempo a partir do Cenozóico (~66maa) até o meio do Eoceno (~41maa), quando correu a entrada de roedores caviomorfos e primatas vindo diretamente da África, e fim do Oligoceno (~ 26maa), com a entrada de alguns primatas que radiaram como primatas do Novo Mundo (Berthel 2013). O isolamento da América do Sul teve fim entre dez e sete milhões de anos atrás, quando houve a união com a América do Norte através do Istmo do Panamá, e a ocorrência do evento conhecido como o grande intercâmbio biótico americano, tradução livre de “*Great American Biotic Interchange – GABI*” (Carrillo 2015). Nesse processo, ao

longo de milhares de anos, ocorreu um fluxo migratório que alguns autores descrevem como predominante no sentido N→S, enquanto outros autores sugerem um equilíbrio dinâmico entre os dois sentidos (N→S e S→N) durante os primeiros milhares de anos até cerca de seis milhões de anos atrás, quando ocorreu um intenso fluxo migratório no sentido N→S que levou a uma extinção em massa da fauna nativa sul-americana levando a uma diminuição da diversidade da fauna previamente existente, incluindo a Marsupialia (Bacon 2015).

Dessa forma, com a separação do Supercontinente Sul tendo ocorrido entre 60 e 40 milhões de anos atrás, as espécies de parasitos que eram albergados por estes marsupiais também foram isoladas e uma determinada espécie de parasito ancestral, para ser encontrado ainda nos dias atuais, teria que ter sobrevivido à drástica redução de diversidade de espécies de marsupiais e permanecer no grupo que originou as espécies que atualmente compõem os Didelphina.

Gambás do gênero *Didelphis* (Didelphidae) são marsupiais representantes da nossa fauna autóctone, possuem uma ampla dispersão no continente e, provavelmente por seu caráter sinantrópico, é um dos animais mais estudados no que diz respeito à infecção por *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. (Travi et al 1994; Schallig et al 2007; Yeo et al 2005). São animais já apontados como reservatórios de diferentes espécies de tripanossomatídeos, tais como *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* e diferentes espécies de *Leishmania*, mas também como sendo os únicos mamíferos capazes de realizar o ciclo extracelular de *T. cruzi* dentro da sua glândula de cheiro (Deane; Lenzi; Jansen 1984). São reportados em diversos estudos como sendo importantes na interface entre o ciclo silvestre do *T. cruzi* e o ambiente peridoméstico (Cantillo-Barraza et al 2015 Jansen; Xavier; Roque 2015), além de participar do ciclo silvestre de algumas espécies de *Leishmania* spp (Roque; Jansen 2014, Carreira et al 2012, Santiago et al 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da longa experiência do grupo no estudo de tripanosomatídeos em gambás (Jansen et al 1991; Roque et al 2013), duas populações de tripanosomatídeos isoladas de baço e fígado de um *Didelphis aurita* permaneciam sem identificação mesmo após vários ensaios biológicos e moleculares. O objetivo deste trabalho foi identificar estas populações, classificando-as taxonomicamente e inferindo a filogenia.

Em julho de 2012, isolamos três populações de flagelados em amostras de sangue, baço e fígado de um mesmo gambá, *Didelphis aurita*, na Mata Atlântica do Rio de Janeiro/RJ. As três populações foram analisadas através da técnica de genes não transcritos do gene de miniexon, conforme descrito por Fernandes et al (2001) e revalidado por Aliaga et al (Aliaga; Breni'ere; Barnabé 2011). A população isolada do sangue em meio NNN (*Neal, Novy, Nicolle*) com LIT (*Liver Triptose Infusion*) foi caracterizada como *Trypanosoma cruzi*, DTU (Discrete Typing Unit) Tc1. Já os parasitos obtidos de fígado e baço foram isolados em meio NNN com Schneider, uma vez que a proposta do trabalho era o isolamento de *Leishmania* sp. A mesma técnica do miniexon foi realizada para as populações de baço e fígado, não sendo possível classificar nenhuma das duas dentro do escopo oferecido pela técnica. Esse fato, aliado a características morfológicas observadas durante o isolamento em meio de cultura, nos levaram a propor uma mais ampla investigação, utilizando técnicas biológicas e moleculares de caracterização do que agora supúnhamos tratar-se de nova espécie.

Aqui no Brasil tivemos um caso semelhante, com recente descrição de nova espécie, apontando para a importância de um olhar não direcionado às espécies conhecidas em estudos de hospedeiros das diversas parasitoses endêmicas. Este tipo de olhar possibilitou a descoberta do *Trypanosoma caninum*, isolado de pele íntegra de cães do Rio de Janeiro após caracterizações bioquímica, biológica e molecular (Madeira et al 2009 e 2013). Chamou a atenção o fato da pele de cão ser exaustivamente estudada por diversos grupos há muitos anos em estudos de leishmaniose canina (Pedroso 1923) e apenas recentemente ter sido possível identificar esta nova espécie, hoje já descrita em diversos locais do país (Barros et al 2012). O mesmo raciocínio também se aplica a descoberta, quase 80 anos depois

da descrição do *T. cruzi*, de um ciclo replicativo do parasito na glândula de cheiro de um de seus hospedeiros mais conhecidos, o gambá (Deane; Lenzi; Jansen 1984).

O diferencial do nosso trabalho e dos outros trabalhos que resultaram na descrição formal de espécies é a abordagem integrada da taxonomia clássica (com morfologia, morfometria e análise biológica) aliada a filogenética. Essa abordagem nos permite observar a morfologia do parasito através de diferentes abordagens em microscopia (de luz e eletrônica), seu comportamento em condições experimentais (curva de crescimento em meio axênico e testes de invasão celular), além da análise molecular para caracterização do parasito. Aliamos a tudo isso também a análise filogenética das sequencias, obtidas na caracterização molecular. Dessa forma, aliando dados biológicos e filogenéticos, realizamos a caracterização das populações parasitárias isoladas nos tecidos do gambá.

3. OBJETIVOS

Identificar as populações de tripanosomatídeos obtidas de baço e fígado de um gambá (*Didelphis aurita*) proveniente da Mata Atlântica do Rio de Janeiro/RJ.

3.1 Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a viabilidade dos isolados em diferentes meios de cultivo;
- 2) Acompanhar a cinética de crescimento dos parasitos em cultura axênica até a fase estacionária;
- 3) Analisar a morfologia ultraestrutural de formas de cultura axênica;
- 4) Caracterizar molecularmente e analisar a relação filogenética dos isolados.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados

Nosso laboratório desenvolve um trabalho de avaliação do ciclo silvestre de transmissão de tripanossomatídeos em diversos biomas brasileiros, incluindo projetos em andamento no *Campus Fiocruz da Mata Atlântica (CFMA)*. Para isso, são frequentemente realizadas expedições científicas para captura de pequenos mamíferos silvestres (roedores, marsupiais e morcegos). Nestas expedições são coletados materiais para avaliação parasitológica e acompanhamento da dinâmica do ciclo silvestre de transmissão de parasitos nestas áreas.

Em uma dessas expedições, em julho de 2012, foi capturado um marsupial da espécie *Didelphis aurita* mediante armadilhamento do tipo *LiveTrap* distribuído de forma equidistante em transectos na mata. Tratava-se de um macho, adulto (dentição completa e 1,450 kg de peso corpóreo) que foi capturado numa trilha classificada como de transição entre áreas peri-domiciliares e áreas de mata. Após a captura, o animal foi levado para o laboratório de campo onde foi eutanasiado para a coleta de material. Foram coletados fragmentos de baço e fígado para diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp através de análise parasitológica (por meio de isolamento em meio de cultivo) e molecular. As amostras de baço e fígado, coletadas foram semeadas em meio NNN+Schneider com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). O acompanhamento das culturas no LABTRIP (Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos) foi realizado a cada quatro dias (culturas de tecidos). Quando foram visualizados parasitos, a cultura foi repicada e ampliada até a obtenção de 10^5 – 10^7 parasitas/ml. Após esse período, 10ml do sobrenadante foram retirados e lavados em PBS 0,015M (solução salina tamponada fosfato de sódio) três vezes a 2500G por 15 min e à 4°C. Os parasitas lavados foram ressuspensos em Schneider com 20% de SFB e 10% de glicerol. Esse volume foi dividido em seis tubos de criopreservação e foram resfriados em vapor de nitrogênio líquido por 20 min. Após esse tempo, os tubos de criopreservação foram devidamente acondicionados em suportes e armazenados nos botijões de nitrogênio líquido. Todos os procedimentos acima descritos foram realizados para ambos isolados.

A manipulação deste e dos demais animais inseridos nos projetos do LABTRIP foi realizada atendendo as normas estabelecidas pela Comissão de

Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz. A coleta dos animais silvestres segue a Instrução Normativa do Ibama nº154/2007 e foi licenciada em nome de Paulo Sergio D'Andrea (Licença 13373-1). Os protocolos de manejo e coleta de material foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (LW81/12).

4.2 Análise Biológica

4.2.1 Cinética dos isolados

A curva de crescimento foi realizada adaptando a metodologia apresentada em Araújo e colaboradores (Araújo; Cabello; Jansen 2007). Para isso foi realizado um ensaio com população inicial de 1×10^6 parasitas/ml em 5ml de meio de cultivo em três tubos para cada isolado, que foram mantidos em temperatura constante de 27°C. O crescimento foi observado até o início da fase estacionária e o número de parasitas vivos foi verificado diariamente em hemocitômetro com aumento de 400x, sendo a média e desvio padrão calculados entre os três tubos considerados para a confecção do gráfico. Este experimento foi realizado em duplicata em meio Schneider com 10% de Soro Fetal Bovino.

4.2.2 Testes de meio de cultura

Foram realizados testes de viabilidade nos seguintes meios de cultura (Fórmulas e modo de preparo estão listadas no Anexo 1) (Duran-Rehbein 2014, Botero 2016):

- DEMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de Soro Fetal Bovino
- EAGLE (Meio mínimo de Eagle) com 10% de Soro Fetal Bovino
- TRPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, meio de cultivo celular comercial enriquecido com triptose) com 10% de Soro Fetal Bovino
- RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, meio de cultivo celular comercial) com 10% de Soro Fetal Bovino
- LIT (*Liver Tryptose Infusion*) com 10% de Soro Fetal Bovino

Também foi realizada a tentativa de co-cultivo em *Feeder-Layer* com células Vero e RPMI 1640 com 10% de Soro Fetal Bovino.

Além disso, foi realizado um teste com o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento, onde foi adicionado 2% de urina humana masculina previamente esterilizada por filtração (filtro de 0,22µm de porosidade), como já descrito para o crescimento *in vitro* de *Leishmania* spp. (Howard et al 1991).

Os ensaios foram realizados com inóculo inicial de 1×10^6 parasitas/ml e o acompanhamento de viabilidade das células foi realizado através da observação de uma gota de cultura entre lâmina e lamínula em aumento de 400x por 5 dias em Microscópio de Luz Olympus Carl Zeiss Axiostar Plus® em objetiva com contraste de fase. Todos os ensaios foram realizados mantendo os frascos experimentais à temperatura controlada de 27°C.

4.3 Análise morfológica

4.3.1 Microscopia de luz

Realizamos esfregaços de culturas em terceiro dia de cultivo em meio axênico. Os parasitos obtidos foram fixados com metanol e corados pelo método de Giemsa, sendo observados e fotografados em Microscópio de Luz Olympus Carl Zeiss Axiostar Plus® e o registro fotográfico foi feito pela câmera Canon Powershot A650 IS® em aumento de 1000x. Os experimentos foram realizados em triplicata e as imagens foram utilizadas para inferência de forma evolutiva.

4.3.2 Microscopia Eletrônica

O preparo foi realizado com parasitos de cultura axênica em fase logarítmica, coletando-se apenas os que se localizavam no sobrenadante do meio bifásico (evitando a coleta de parasitos mortos depositados ao fundo do frasco). O volume final sempre continha no mínimo 5×10^7 parasitos/ml.

Para o preparo e fixação dos materiais, retiramos os parasitos da cultura axênica como descrito acima e centrifugamos a 7000 G por sete min em centrífuga refrigerada a 4°C. Suspendemos novamente o *pellet* em Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato e deixamos o material fixar por 40 min a temperatura ambiente, com volume final de 1,5 ml. Ao final, o material foi transferido para um microtubo de 1,5 ml e armazenado em geladeira até a pós-fixação.

Todo o processamento do material a partir da pós-fixação foi realizado com a colaboração do Dr. Rubem Menna-Barreto no Laboratório de Biologia Celular do

Instituto Oswaldo Cruz (LBC-IOC-Fiocruz). Na pós-fixação o material foi retirado da geladeira e centrifugado a 7000 G por 5 min, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o material foi lavado em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por 3 vezes. Após a lavagem suspendemos novamente o material em uma solução de Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M na proporção 1:2 e deixamos fixar por 20 min.

. Essa primeira etapa do preparo é comum às técnicas de Varredura e Transmissão. Nos itens subsequentes são descritas as particularidades das duas técnicas de microscopia eletrônica.

4.3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram preparadas lamínulas redondas (13 mm) com filme de poli L lisina, deixando secar por 24 h e, no momento do experimento, foram lavadas três vezes com PBS 0,015 M e deixadas para secar antes de começar a segunda etapa do processamento do material.

O preparo inicial a partir dos parasitos de cultura seguiu os procedimentos iniciais descritos no primeiro parágrafo do item 4.3.2. Em seguida homogenizamos bem o pós-fixado e depositamos 5 μ L desta amostra sobre cada lamínula. Observamos ao microscópio invertido a distribuição dos parasitos para nos certificarmos de não estarem muito dispersos nem muito concentrados na superfície e também para observar qualquer alteração provocada por diferença de osmolaridade nas soluções utilizadas até aqui. O processo de desidratação foi realizado com banhos de dois min em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90%, 100% e 100%). Esse processo foi realizado com etanol gelado, retirado do freezer apenas no momento das lavagens. Após a desidratação, o material passou pelo ponto crítico, onde o etanol presente na amostra foi trocado por CO₂ (gás carbônico). Em seguida o material seguiu para a metalização, onde é depositado ouro em pó sobre a amostra para aumentar a condutividade. Tanto o ponto crítico quanto a metalização foram realizados pela Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC-Fiocruz.

4.3.2.2. Microscopia de Eletrônica de Transmissão

Na Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), o material foi incluído em uma resina e posteriormente seccionado em cortes ultrafinos, observados ao microscópio eletrônico de transmissão (met). No nosso trabalho o material foi

analisado no met Jeol JEM1011 (Tóquio, Japão) na plataforma de microscopia eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz – IOC - Fiocruz.

O preparo inicial a partir dos parasitos de cultura seguiu os procedimentos iniciais descritos no primeiro parágrafo do item 4.3.2. O material já pós-fixado foi centrifugado a 7000 G por 5min em microcentrífuga. A partir deste ponto o objetivo da técnica é que se forme um sedimento (*pellet*) coeso, sendo todas as trocas de reagentes realizadas sem que haja suspensão do material depositado no fundo do tubo. A desidratação foi realizada em concentrações progressivas de acetona (50%, 70%, 90%, 100% e 100%) com trocas a cada 2 min. As soluções são utilizadas refrigeradas e permanecem no freezer até o momento do uso. Após a desidratação, adicionamos ao *pellet* uma solução 1:2 de acetona 100% e Poly-bed 182 (Epon) e deixamos impregnar por 2 horas. Após a impregnação, retiramos o *pellet* e o incluímos em Epon 100% e deixamos polimerizando em estufa a 60 °C por 48 h.

A partir deste ponto o bloco estava pronto para sofrer os cortes ultrafinos, que foram realizados pela Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC-Fiocruz/RJ. A navalha utilizada para realização dos cortes foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Celular.

4.3.2.3. Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada através do programa *ImageJ* 1.47v a partir de 50 imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas de cada isolado e os parâmetros aferidos foram de tamanho total, tamanho do corpo e flagelo livre.

4.4. Caracterização molecular dos isolados

A caracterização molecular dos isolados foi realizada utilizando dois genes nucleares (Miniexon e gGAPDH) e um gene ribossômico (18S). O marcador miniexon foi utilizado por se tratar de ensaio de triagem regular no LABTRIP, uma vez que o mesmo ainda tem se mostrado eficiente para separar três grupos de DTUs de *T. cruzi* (TcI; TcII/V/VI e TcIII/IV) e identificar infecções por *T. rangeli* e mistas entre estes (Aliaga; Breniere; Barnabé 2011). O gene ribossômico foi utilizado por possuir um grande número de sequências depositadas, facilitando a comparação com outros isolados, visto que grande parte das publicações do gênero atualmente utiliza esse gene como alvo (Madeira et al 2013, Mc Innes 2011 and 2009, Smith et al 2008, Maslov; Podlipaev; Lukes 2001). O gene gGAPDH foi

escolhido por estar sujeito a pressões evolutivas diferentes dos genes ribossômicos, gerando resultados mais robustos quando comparamos organismos filogeneticamente distantes, além de também possuir um grande banco de dados de sequências disponível.

4.4.1 PCR Miniexon

A primeira das ferramentas utilizadas para a caracterização molecular dos isolados foi através da amplificação das regiões de espaçamento não transcrito do gene do miniexon. Este alvo é capaz de separar diferentes subpopulações (DTUs) de *Trypanosoma cruzi*: TcI (TCI) de TcII/TcV/TcVI (TCII) e TcIII/TcIV (Z3), além de separar essas populações de *Trypanosoma rangeli*. A técnica utilizada em nosso laboratório é realizada segundo Fernandes et al 2001 e foi recentemente revalidada por Aliaga em 2011 (Aliaga; Breniere; Barnabé 2011). Essa é uma técnica de PCR multiplex, onde são utilizados 4 iniciadores *forward* e apenas um *reverse*. Foram utilizados três iniciadores de uma região hipervariável do miniexon, para os grupos TCI, TCII, Z3 e um iniciador específico de um espaçador não transcrito para *Trypanosoma rangeli*. Como iniciador reverso foi utilizado um oligonucleotídeo da região mais conservada do gene do miniexon. As especificações dos iniciadores e reagentes utilizados encontram-se nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1: Iniciadores utilizados no ensaio do Miniexon e sentido de amplificação do fragmento.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Sentido	Tamanho do fragmento
Iniciador TCI	5'ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG3'	F*	200 pb
Iniciador TCII	5'TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT3'	F*	250 pb
Iniciador Z3	5'TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT3'	F*	150 pb
Iniciador TR	5'CCTATTGTGATCCCCATCTTCG3'	F*	100 pb
Éxon	5'TACCAATATAGTACAGAACTG	R**	-

* F – *Forward* ou senso

** R – *Reverse* ou antissenso

Tabela 2: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do miniexon :

Reagente	Concentração	Volume
Água para PCR estéril	-	12,2 µL
Tampão PCR Buffer II (Sem MgCl₂)	10X	2,5µL
MgCl₂	2,5mM	2,5 µL
dNTP*	1mM	0,5 µL
Iniciador TCI	10µmol cada	1,0 µL
Iniciador TCII	10µmol cada	1,0 µL
Iniciador Z3	10µmol cada	1,0 µL
Éxon	10µmol cada	1,0 µL
DNA**	10ng	2,0 µL
Volume Final		25 µL

*dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DNA Ácido desoxirribonucléico

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador *Swift Max Pro Thermal Cycler* com 34 ciclos de 94 °C, 55 °C e 72 °C por 30 seg cada e um ciclo inicial de 95°C por 5 min e um final de 72°C por 10 min.

O produto amplificado foi aplicado (volume de 10 µL) em gel de agarose 3% em tampão TBE (Tris base 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal a 70 Volts de corrente, devido ao baixo tamanho dos fragmentos (TCI – 200pb; TCII – 250pb; Z3 – 150pb e TR – 100pb). Após a corrida o gel foi corado com Brometo de Etídeo e as bandas foram visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE.

4.4.2. Nested-PCR 18S SSU

A técnica de Nested-PCR consiste numa reação em 2 etapas. Na primeira etapa amplifica-se uma região maior do alvo estudado (iniciadores externos), enquanto a segunda etapa utiliza como substrato de reação o produto amplificado da primeira e amplifica uma menor região dentro desta (iniciadores internos). Essa técnica foi realizada conforme descrito por Smith et al.,2008. As especificações dos iniciadores e reagentes utilizados encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Iniciadores utilizados no PCR 18S SSU:

Etapa	Iniciador	Seqüência de oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
Iniciadores Externos	Iniciador TRY927F	5' GAAACAAGAAACACGGGAG3'	900 pb*
	Iniciador TRY927R	5'CTACTGGGCAGCTTGGA 3'	
Iniciadores Internos	Iniciador SSU561F	5' TGGGATAACAAAGGAGCA3'	600 a 700 pb*
	Iniciador SSU561R	5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3'	

*pb – Pares de base

Tabela 4: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do gene 18S SSU:

Reagente	Concentração	Volume
Água para PCR estéril		29,72 µL
Tampão 10×PCR BufferII (Sem MgCl₂)	10×	5 µL
MgCl₂ (estoque 25 mM)	3 mM	6 µL
dNTP (estoque 10 mM)	2 mM	5 µL
Oligo Try R	16 pmol	1 µL
Oligo Try F	16 pmol	1 µL
AmpliTaqGold	1,4 U	0,28 µL
DNA	100 ng	2 µL

*dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DNA Ácido desoxirribonucleico

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador *Swift Max Pro Thermal Cycler* com 34 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 60 seg e 72 °C por 90 seg, além de um ciclo inicial de 95 °C por 15 min e um final de 72 °C por 10 min.

Para a segunda etapa, usamos o mesmo protocolo de reação acima e a mesma ciclagem. A diferença consistiu no substrato da reação. Ao invés do DNA, usamos 2 µL do produto amplificado da reação diluído na proporção de 1:5 (45 µL de água para PCR+ 5 µL do produto amplificado).

O produto amplificado foi aplicado (volume de 10 µL) em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris base 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal a 100 Volts de corrente durante 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com Brometo de Etídeo e as bandas foram visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE.

4.4.3. PCR V7V8 SSU

A região V7V8 SSU é uma região hipervariável do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico. É uma região amplamente utilizada para análise filogenética dentro do grupo Trypanosomidae. Os iniciadores utilizados amplificam uma região de aproximadamente 800 pb e aqui neste ensaio utilizamos os primers descritos por Borghesan e colaboradores (2013). As especificações dos iniciadores e reagentes utilizados encontram-se nas tabelas 5 e 6:

Tabela 5: Iniciadores utilizados no PCR da região variável V7V8 SSU:

	<i>Iniciadores</i>	Tamanho do fragmento
609F**	5' CACCCGCGGTAATTCCAGC3'	800 pb*
706R***	5' CTGAGACTGTAACCTCAA3'	

*pb – pares de base

** F – *Forward* ou senso

*** R – *Reverse* ou antissenso

Tabela 6: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR da região variável V7V8 SSU:

Reagente	Concentração	Volume
Água para PCR estéril		17,95 µl
Tampão 10xPCR BufferII (Sem MgCl₂)	10x	2,5 µl
MgCl₂ (estoque 50 mM)	1,5 mM	0,75 µl
dNTP (estoque 2,5 mM)*	0,25mM	5 µl
609F	10 pmol	1 µl
706 R	10 pmol	1 µl
AmpliTaQGold	1,4 U	0,28 µl
DNA**	100 ng	2 µl
Volume final		50 µL

*dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DNA Ácido desoxirribonucleico

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador *Swift Max Pro Thermal Cycler* com 34 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 48 °C por 2 min e 72 °C por 2 min, além de um ciclo inicial de 94 °C por 3 min e um final de 72 °C por 10 min.

O produto amplificado foi aplicado (volume de 10 µL) em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris base 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal a 100 Volts de corrente durante 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com Brometo de Etídeo por 1 min e 30 seg e as bandas foram visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE.

4.4.4. PCR gGAPDH

O gene codificador da enzima gliceraldeído – 3 – fosfato-desidrogenase glicossomal foi amplificado e é um alvo bastante utilizado na análise de relações filogenéticas entre organismos distantes. Essa reação foi realizada conforme descrito por Borghesan e colaboradores (2013), gerando um produto amplificado de aproximadamente 800 pb. As especificações dos iniciadores e reagentes utilizados encontram-se nas tabelas 7 e 8:

Tabela 7: Iniciadores utilizados no PCR do gene gGAPDH

	<i>Iniciadores</i>	Tamanho do fragmento
<i>GAPTRYmod</i> <i>F**</i>	5'GGBCGCATGGTSTTCCAG3'	800bp*
<i>GAPTRYr R***</i>	5'CCCCACTCGTTRTCRTACC3'	

*pb – pares de base

** F – *Forward* ou senso

*** R – *Reverse* ou antissenso

Tabela 8: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do gene gGAPDH

Reagente	Concentração	Volume
Água para PCR estéril		17,95 µl
Tampão 10XPCR Buffer II (Sem MgCl₂)	10X	2,5µl
MgCl₂ (estoque 50mM)	1,5mM	0,75µl
dNTP (estoque 2,5mM)*	0,25mM	2,0µl
GAPTRYmod F	10 pmol	1µl
GAPTRYr R	10 pmol	1µl
AmpliTaqGold	1,4U	0,28µl
DNA**	100ng	2µl
Volume final		25 µL

*dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DNA Ácido desoxirribonucleico

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador *Swift Max Pro Thermal Cycler* com 34 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 °C por 2min e 72 °C por 2 min, além de um ciclo inicial de 94 °C por 3 min e um final de 72 °C por 10 min.

O produto amplificado foi aplicado (volume de 10 µL) em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris base 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal a 100Volts de corrente durante uma hora. Após a corrida o

gel foi corado com Brometo de Etídeo e as bandas foram visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE.

4.4.5. Purificação, Sequenciamento e Análise dos produtos amplificados

A reação de purificação foi realizada apenas para os produtos de PCR dos alvos 18S SSU, V7-V8 e gGAPDH. Os produtos do alvo miniexon não foram sequenciados.

O processo de purificação foi realizado utilizando-se o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções dos fabricantes.

Brevemente, adicionamos 5 µL de tampão tipo 3 (tampão de captura) para cada 1 µL de produto amplificado, homogenizamos e transferimos para a coluna de purificação em um tubo estéril livre de *DNAse*. Centrifugamos 2 vezes por 30 seg a 16000g, adicionamos 500 µL de tampão tipo 1 (tampão de lavagem) e centrifugamos por 30 seg a 16000g. Em seguida, transferimos a coluna para novo tubo estéril livre de *DNAse* e adicionamos 30 µL de tampão de eluição, que deixamos agir por 1 minuto antes de centrifugar por 30 seg a 16000G. O produto purificado foi armazenado em tubo estéril livre de *DNAse* a -20°C até a realização do sequenciamento.

Os produtos das purificações foram enviados para sequenciamento na Plataforma de sequenciamento de DNA PDTIS/ FIOCRUZ com reação de sequenciamento realizada em máquina GeneAmp e análise automática de sequências realizada pelo analisador de DNA ABI 3730

Foram realizadas as análises das sequências dos três ensaios com identificação das espécies por análise de similaridade usando algoritmo BLAST contra sequências de referência obtidas no *GenBank*. Edição e construção de sequência foram realizadas com o programa SeqMan-DNAStar, enquanto o alinhamento e árvore filogenética foram construídos no programa MEGA5 (Tamura et al., 2011).

4.5 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas em conjunto com o Dr. Marcio Pavan do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos – IOC – Fiocruz e consistiu

na elaboração e análise, primeiramente, de árvores filogenéticas individuais dos genes 18 S (18S SSU e V7-V8) e gGAPDH.

Para todos os alvos citados a edição e construção de sequência foi realizada com o programa SeqMan-DNAStar. As sequências obtidas foram submetidas a comparação com outras depositadas no *GenBank* através do algoritmo Blastn realizando busca por similaridade. O alinhamento das sequências dos isolados com as sequências de retorno foi realizado no programa Mega 5 e as árvores foram construídas utilizando as metodologias de análise Neighbour-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) (Tamura et al., 2011).

Após uma primeira análise individual, foi realizada a árvore concatenada dos alvos sequenciados para avaliar a concordância entre eles. A análise concatenada consiste na junção das sequências, obtidas de um mesmo organismo, de dois genes. Após a junção temos uma sequência única do tamanho da soma dos fragmentos de ambos os genes utilizados e são realizados o alinhamento e árvore filogenética dessa sequência resultante.

Como todas as análises apontavam para uma possível nova espécie de *Trypanosoma*, e considerando que árvores concatenadas não são capazes de mensurar e agregar ao cálculo os diferentes tipos de pressão evolutiva a que estão submetidos os diferentes alvos estudados, elaboramos uma árvore de espécies utilizando o programa *BEAST (*Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*), que é capaz de aliar os dados fornecidos pelas sequências dos genes a outros fatores de calibração, tais como velocidade de evolução de cada gene, dados fósseis, geográficos, entre outros (Heled and Drumond 2010). A análise é realizada utilizando as diferentes probabilidades de organização das espécies previamente definidas no programa. Para isso o programa usa os dados de verossimilhança das árvores de genes como perturbação do que foi previamente definido para dar uma maior confiabilidade ao resultado apresentado pela árvore de gene de um ou outro marcador molecular.

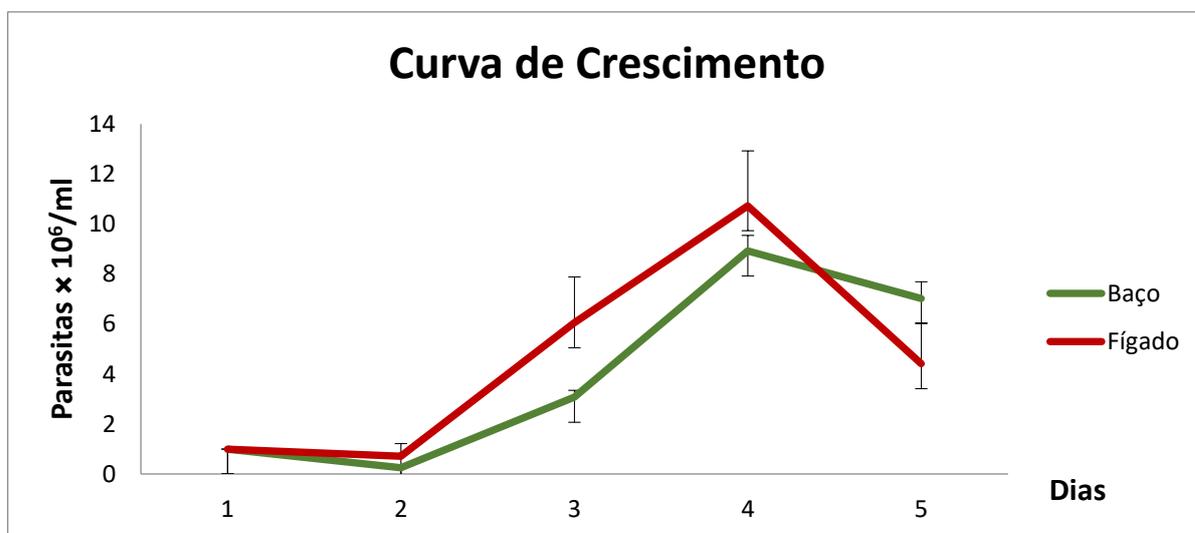
5 RESULTADOS

5.1. Análise Biológica

5.1.1 Cinética dos isolados

Realizamos a curva de crescimento do parasito, representando sua fase logarítmica e início de fase estacionária (Figura 1). O gráfico demonstra tratar-se de um parasito de rápido crescimento, porém de baixa sobrevivência em meio axênico sem complementação. Esse resultado também nos forneceu o tempo de passagem ideal para obtenção de cultura jovem e com parasitos viáveis e sem sinais de senescência, que foi de três dias.

Figura 1: Curva de crescimento com cinco dias de duração realizada em meio bifásico (NNN+Schneider com 10% SFB) com inóculo de 1×10^6 parasitas/ml. Curva realizada em duplicata, em três tubos em cada ensaio.



5.1.2 Testes de meio de cultura

Os ensaios de acompanhamento do desenvolvimento de ambas as populações parasitárias (baço e fígado) em cada um dos 5 meios de cultura axênico testados (DEMEM, EAGLE, TRPMI, RPMI 1640 e LIT; todos acrescidos de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), além da cultura de monocamada celular, apresentaram os mesmos resultados. Em nenhum deles houve sobrevivência das populações parasitárias que, a partir de um inóculo inicial de 10^6 parasitas/ml, começaram a morrer já no primeiro dia, sendo a maior parte das perdas observadas no segundo

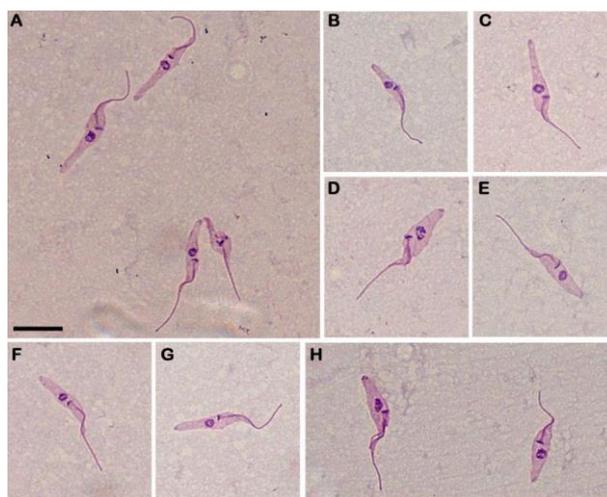
dia. A partir do terceiro dia, não foram observados parasitos móveis em nenhum dos meios de cultura testados.

5.2 Análise Morfológica

5.2.1 Microscopia de luz

Os esfregaços corados pelo Giemsa foram observados em Microscópio de Luz Olympus Carl Zeiss Axiostar Plus® sendo fotografados através da câmera Canon Powershot A650 IS® em aumento de 1000x (Figura 2). Essas imagens indicaram se tratar de forma epimastigota, com cinetoplasto localizado na região anterior do parasita junto ao núcleo. Durante todo o acompanhamento, apenas parasitos com morfologia semelhante à esta demonstrada na figura 2 foram observados. Formas degeneradas eram comumente observadas antes da definição do tempo de passagem, mas estas mesmas formas não mais apareciam quando a passagem das culturas era realizada a cada três dias. A cultura estabelecida era bastante homogênea em forma, mas não em tamanho dos parasitos.

Figura 2: Esfregaço de cultura axênica em fase logarítmica do isolado Fígado apresentando forma epimastigota.

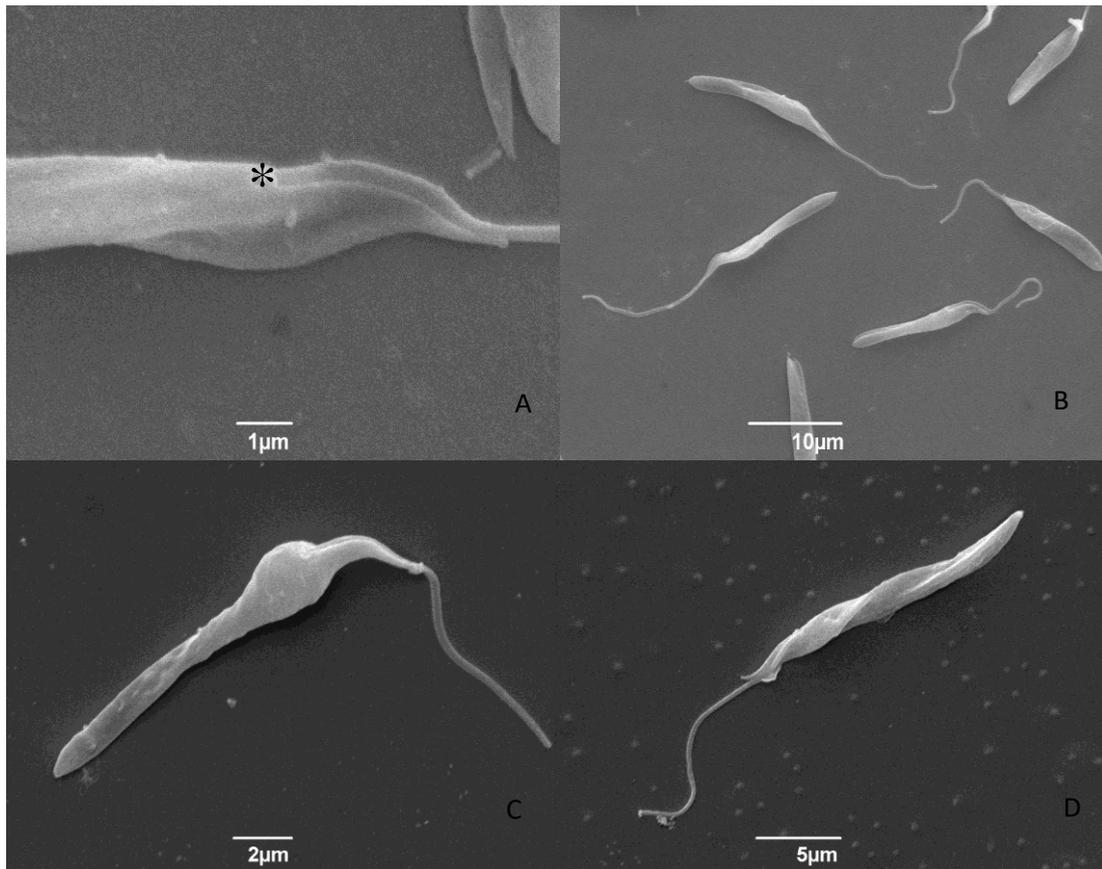


Esfregaço de cultura axênica corado pelo Giemsa em fase exponencial apresentando forma epimastigota. Em cada quadrante podemos observar as formas ora alongadas e delgadas, ora mais elipsóides. Aumento: 1000x

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfométrica não revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias das duas populações: comprimento total dos parasitos de $23,3 \pm 5,9 \mu\text{m}$ e $28,7 \pm 6,2 \mu\text{m}$; comprimento da porção livre do flagelo de $9,5 \pm 3,2 \mu\text{m}$ e $11,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$; e comprimento médio do corpo de $13,8 \pm 3,6 \mu\text{m}$ e $17,1 \pm 3,7 \mu\text{m}$ nas populações de baço e fígado, respectivamente. A análise das imagens da Microscopia de Varredura também nos possibilitou identificar que algumas formas distintas da população da cultura não se tratavam de outras formas evolutivas, mas sim de formas degeneradas (Figura 3). Estas formas foram observadas apenas no primeiro ensaio, uma vez que este foi realizado antes do estabelecimento do período correto de passagem determinado com as curvas de crescimento. Após a definição do perfil de crescimento em meio axênico realizamos o segundo ensaio, onde pudemos observar células com morfologia compatível com uma célula saudável, sem sinal de degeneração (membranas retorcidas ou com orifícios). Isso nos auxiliou na confirmação de que a morfologia observada em cultivo era de uma forma epimastigota, corroborando a ideia inicial de que, nos meios de cultura utilizados para manutenção e teste de viabilidade, os isolados Baço e Fígado apresentam apenas esta forma evolutiva.

Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas



Figuras A e B representando fase logarítmica da cultura axênica e figuras C e D representando formas degeneradas presentes em fase estacionária de cultura axênica evidenciando que estas populações não apresentam outra forma evolutiva em crescimento *in vitro*. Figura A apresentando detalhe da saída do flagelo (*) na lateral do corpo, evidenciando tratar-se de forma epimastigota. Figura B evidencia o polimorfismo apresentado pelas formas epimastigotas dessa população parasitária em meio axênico. Figura C mostra forma bastante globosa na região anterior e afilada na região posterior. Figura D mostra célula retorcida de fase estacionária.

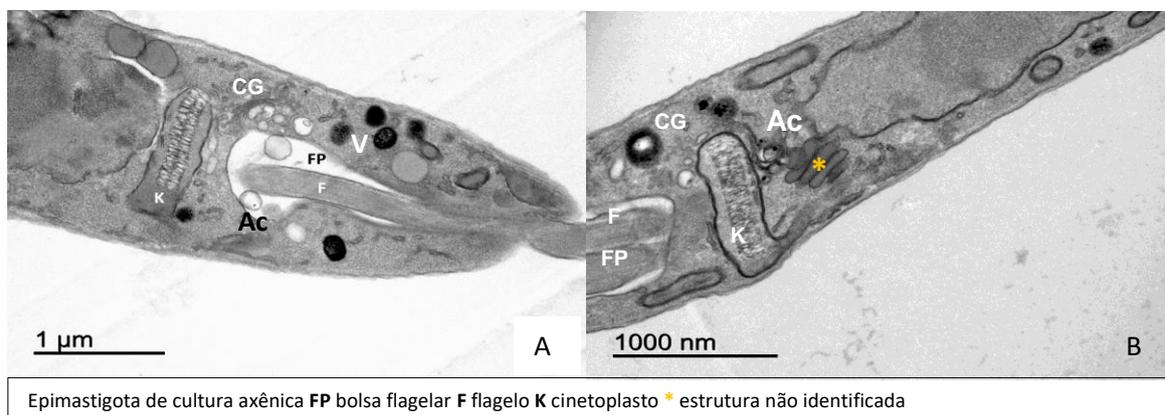
5.2.3. Microscopia de Eletrônica de Transmissão

As células de ambas as culturas (baço e fígado) apresentam corpo alongado, com núcleo na porção posterior, apresentando um único flagelo. O cinetoplasto apresenta morfologia semelhante a haste (κ – figura 4a), em região bem definida da mitocôndria, próximo a base do flagelo, compatível com forma epimastigota. A mitocôndria apresenta-se ramificada, aparecendo ao longo do corpo celular com dupla membrana e cristas mitocondriais. A estrutura do Complexo de Golgi (CG –

Figura 4a) é semelhante a encontrada em células de mamíferos, com um conjunto de cisternas empilhadas localizado próximo ao cinetoplasto e a saída do flagelo. Podemos observar diversas vesículas endossomais algumas apresentando conteúdo eletrondenso (V – Figura 4a) e outras sem conteúdo eletrondenso, semelhantes a acidocalcissomos (Ac – Figura 4a), posicionadas geralmente próximo a bolsa flagelar.

Foi também observada estrutura celular alongada, com membrana simples e conteúdo pouco eletrondenso, ora presente em pequena quantidade, ora amplamente distribuída pelo corpo celular, geralmente em conjuntos de 3 ou quatro, semelhante a um reservossomo/glicosomo (Figura 4b – asterisco).

Figura 4: Microscopia de Eletrônica de Transmissão mostrando a seção longitudinal de célula epimastigota de *Trypanosoma* sp. isolado de fígado do gambá



Seção longitudinal de célula epimastigota de fígado evidenciando bolsa flagelar (FP) e o flagelo (F). Em ambas as imagens, junto à bolsa flagelar observamos cinetoplasto com morfologia semelhante a haste. Na figura A observamos diversas vesículas arredondadas com conteúdo bastante eletrondenso; e outras sem conteúdo eletrondenso. Em figura B observamos estruturas em pilhas com membrana simples (marcado em asterisco) cuja função não está esclarecida. Junto ao cinetoplasto e ao núcleo observamos complexo de Golgi (CG) e pequenas vesículas com conteúdo eletrondenso na periferia, característico de acidocalcissomos.

5.3.Caracterização molecular dos isolados

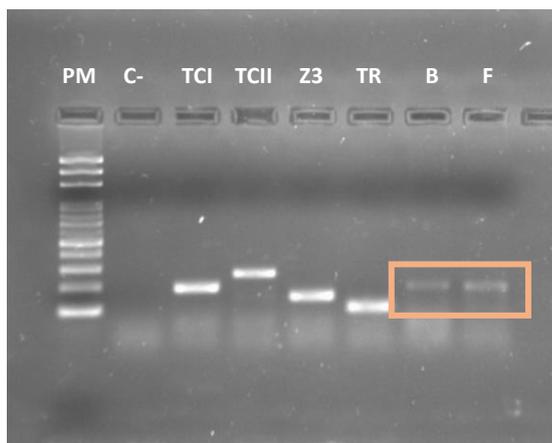
5.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Dos 4 alvos utilizados para a caracterização molecular, o PCR Multiplex para a região não-transcrita do gene do Miniexon apresentou resultados incongruentes e foi classificado como inconclusivo para os isolados analisados neste estudo. Como mostra a tabela 9, ambos isolados amplificaram uma região com peso molecular compatível ao esperado para *T. cruzi*, DTU TcI. Entretanto, em uma das reações não houve amplificação e as características biológicas que já haviam sido observadas anteriormente indicavam tratar-se de outro parasito (Tabela 9; Figura 5).

Tabela 9: Resultados obtidos do PCR-Multiplex para a região não-transcrita do gene do Miniexon

	Miniexon 1	Miniexon 2	Miniexon 3
Baço	<i>Não amplificou</i>	<i>TcI</i>	<i>TcI</i>
Fígado	<i>Não amplificou</i>	<i>TcI</i>	<i>TcI</i>

Figura 5: Gel do PCR-Multiplex para a região não-transcrita do gene do Miniexon

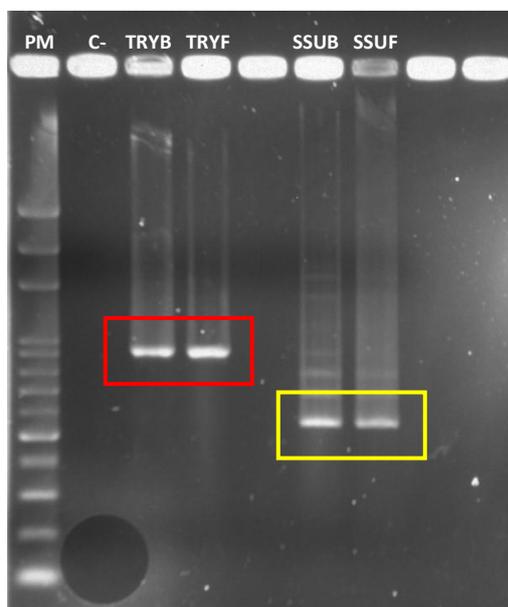


Legenda: PM - Peso molecular (100bp); C- Controle negativo; TCI - Controle positivo TcI; TCII - Controle positivo TcII; Z3 - Controle positivo Z3; TR - Controle positivo TR; B - Amostra Baço; F - Amostra Fígado.

Após o ensaio do miniexon foram realizados dois ensaios que usam como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo, mas utilizando técnicas

e regiões diferentes. O primeiro ensaio realizado para essa região foi um *Nested-PCR* com *Iniciador* externo (TryF-TryR) e interno (SSUF-SSUR), cujo produto final tem aproximadamente 600 pb (Figura 6). Foi realizada corrida em gel de agarose tanto do produto da primeira reação quanto da segunda reação para, caso houvesse contaminação ou qualquer outro problema, podermos identificar em que etapa isso ocorreu.

Figura 6: Gel do *Nested-PCR* para a subunidade ribossomal menor.



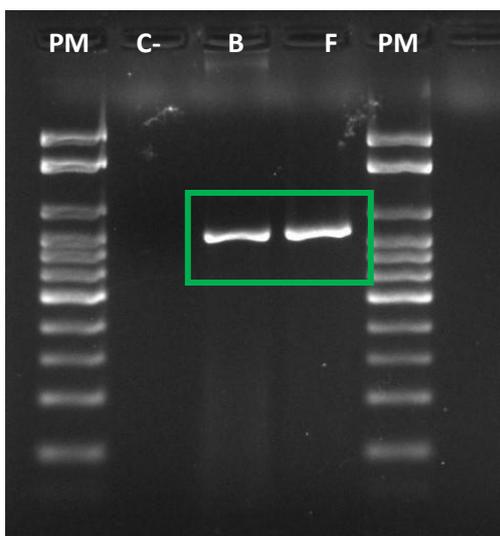
Legenda: PM – Peso molecular (100 pb); C- Controle negativo; TRYB - Produto dos iniciadores externos amostra Baço; TRYF – Produto dos iniciadores externos amostra Fígado; SSUB – Produto dos iniciadores internos amostra Baço; SSUF – Produto dos iniciadores internos amostra Fígado.

O gel mostra as bandas obtidas nas duas etapas (primeira etapa evidenciada pelo retângulo vermelho com aproximadamente 900pb e segunda etapa evidenciada pelo retângulo amarelo de aproximadamente 600pb), que foram compatíveis com os tamanhos de fragmentos esperados. O produto amplificado da segunda etapa dessa reação foi usado para purificação e reação de sequenciamento.

Um segundo ensaio para a unidade ribossomal menor foi realizado para uma região variável denominada V7-V8. Esta reação ocorre numa única etapa e ambas as amostras foram positivas. Assim como no ensaio anterior, o resultado da reação de PCR não é conclusivo por si só, sendo necessária a purificação e sequenciamento do produto amplificado da reação. Positividade da reação

evidenciada no retângulo verde onde aparecem bandas com altura entre 700 e 800pb. (Figura 7).

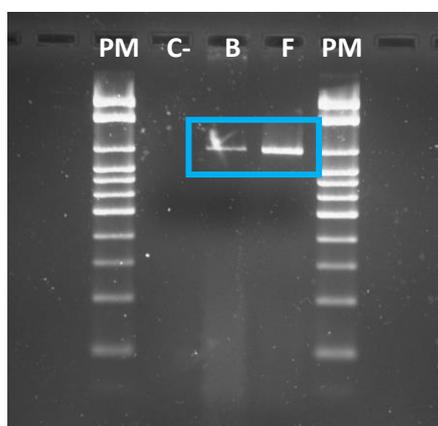
Figura 7: Gel do *PCR* para a região variável V7-V8 da subunidade ribossomal menor



Legenda: PM – Peso molecular (100 pb); C- - Controle negativo; B - Amostra Baço; F - Amostra Fígado.

Foi realizado também uma *PCR* para o gene conservado da Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase glicossomal (gGAPDH) que gerou um fragmento de aproximadamente 800 pb. A positividade da reação está evidenciada no retângulo azul onde aparecem bandas com altura entre 800 e 900pb (Figura 8).

Figura 8: Gel da *PCR* para o gene gGAPDH



Legenda: PM – Peso molecular (100 pb); C- - Controle negativo; B - Amostra Baço; F - Amostra Fígado.

5.4 Análise filogenética

Os produtos das PCR's para os alvos do gene ribossômico e do gene da enzima gGAPDH foram purificados e preparados para as reações de sequenciamento. As sequências resultantes de cada uma das amostras foram confrontadas com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank* através do algoritmo *Blastn* e as mais similares foram utilizadas para a construção de alinhamentos e, posteriormente, de árvores filogenéticas.

O alinhamento realizado entre as amostras Baço e Fígado mostrou 100% de similaridade entre elas, para os três alvos sequenciados (18S SSU, V7-V8 e gGAPDH) indicando tratarem-se da mesma espécie (Figuras 9-11). As sequências de retorno obtidas no *GenBank* mostraram um parentesco mais estrito com sequências de uma espécie de *Trypanosoma* recém descrito em morcegos neotropicais (*T. wauwau*) e de espécies de *Trypanosoma* detectados em marsupiais australianos.

Para o alvo 18S SSU foi realizada uma busca no banco de dados *GenBank* que retornou os isolados apresentados no quadro 1. Os hospedeiros são morcegos neotropicais provenientes da América Central e marsupiais das famílias Potoroidae e Macropodidae provenientes do Oeste e Sudeste da Austrália, tanto de animais silvestres como de cativos.

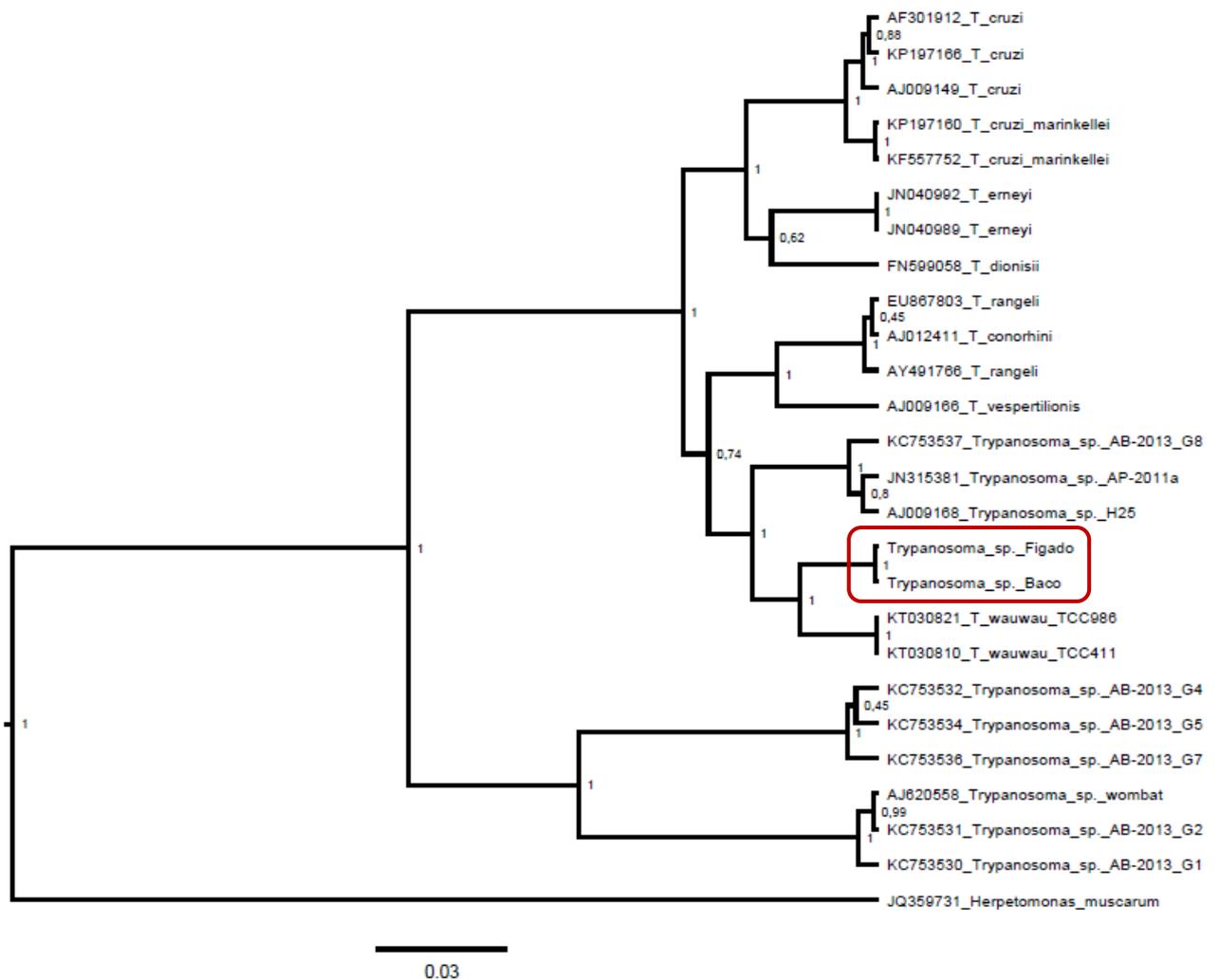
Quadro 1: Informação das sequências de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no *GenBank* para o alvo 18S SSU. Ponto de corte 95% de identidade.

Hospedeiro/Origem	Nome do isolado	Tecido de isolamento	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
 <i>Trachops cirrhosus</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. Neot 1 (RNMO 56/63)	Sangue	832	832	99%	0.0	96%	KT368795/ KT368796
 <i>Pterodotus</i> sp	<i>Trypanosoma wauwau</i>	Sangue	1170	1170	99%	0.0	95%	KT030862- KT030876
 <i>Bettongia penicillata</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. AB-2013 isolate G8 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; and 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	817	817	99%	0.0	96%	KC753537.1
 <i>Macropus giganteus</i> (Sudeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. MMAC/AU/97/H25 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	802	802	99%	0.0	95%	AF073876.1
 <i>Macropus giganteus</i> (Sudeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. 18S rRNA gene, isolate H25	Sangue	802	802	99%	0.0	95%	AJ009168.1
 <i>Bettongia penicillata</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. BRA2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	798	798	99%	0.0	95%	FJ823117.1
 <i>Possum*</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. AP-2011a isolate 64 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	797	797	99%	0.0	95%	JN315383.1
 <i>Bettongia lesueur</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. BDA1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	771	771	98%	0.0	95%	FJ823108.1

*Possum**: Nome genérico dado a marsupiais de pequeno e médio porte arborícolas na Austrália, Nova Guiné e Nova Zelândia.

Além destas sequências, foram utilizadas sequências de outros clados no intuito de melhor compreender a posição dos nossos isolados em relação aos demais tripanossomatídeos conhecidos na elaboração da árvore filogenética da porção variável do gene do ribossomo (Figura 9). No contexto das análises realizadas com esse fragmento do gene do ribossomo, podemos dizer que os isolados do nosso estudo pertencem a mesma espécie dentro do clado *cruzi* e são um grupo-irmão do clado dos tripanossomatídeos australianos. Além disso, formam um único clado com *Trypanosoma wauwau*, uma espécie recém-isolada de morcegos neotropicais das Américas do Sul e Central.

Figura 9: Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio 18S SSU para as amostras denominadas “Baco” e “Fígado”.



Também realizamos ensaios para a região variável do gene do ribossomo utilizando o ensaio V7-V8. Assim como para o 18S SSU, construímos uma árvore filogenética com as sequências de retorno com maior similaridade no algoritmo Blastn. O ponto de corte utilizado neste ensaio foi de 96%, aliado a mais duas sequências similares, mas usadas como grupo-externo. As sequências de retorno para este alvo pertencem as famílias Potoroidae, Macropodidae estão descritas no quadro 2.

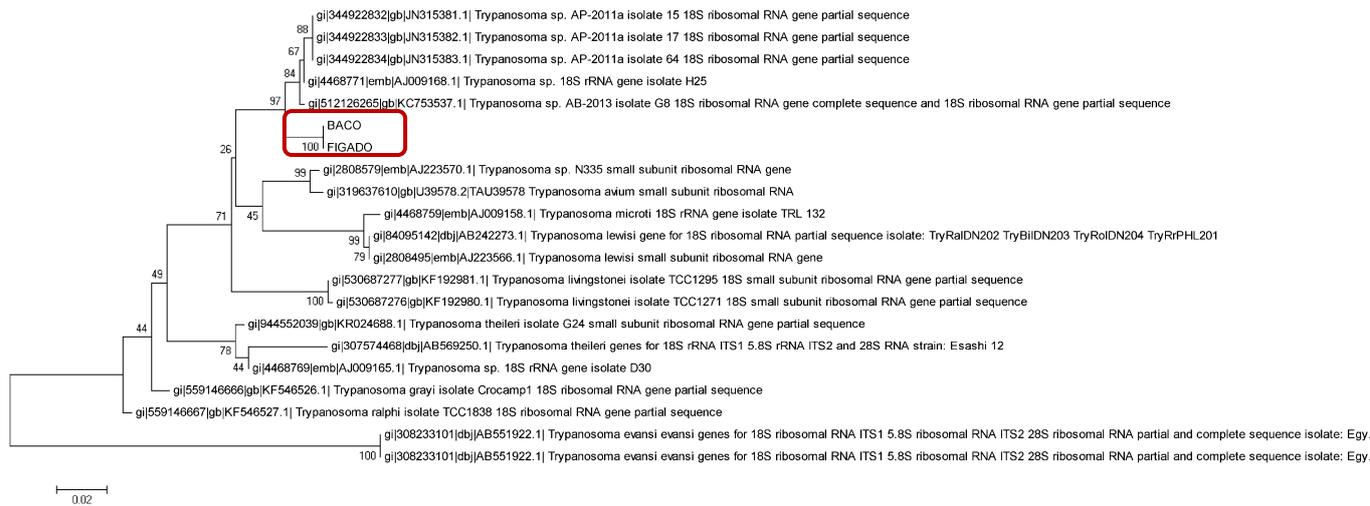
Quadro 2: Informação das sequencias de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no *GenBank* para o alvo V7-V8. Ponto de corte 96% de identidade.

Hospedeiro/Origem	Description	Tecido de isolamento	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Bettongia penicillatta</i> (Oeste da Australia)	<i>Trypanosoma</i> sp. AB-2013 isolate G8 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; and 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	1105	1105	100%	0.0	97%	KC753537.1
<i>Macropus giganteus</i> (Sudeste da Australia)	<i>Trypanosoma</i> sp. 18S rRNA gene, isolate H25	Sangue	1096	1096	100%	0.0	97%	AJ009168.1
Possum*	<i>Trypanosoma</i> sp. AP-2011a isolate 64 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	1085	1085	100%	0.0	96%	JN315383.1
Possum*	<i>Trypanosoma</i> sp. AP-2011a isolate 15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	1085	1085	100%	0.0	96%	JN315381.1
Possum*	<i>Trypanosoma</i> sp. AP-2011a isolate 17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sangue	1077	1077	100%	0.0	96%	JN315382.1
<i>Padda oryzivora</i> ou Calafate (Ásia?)	<i>Trypanosoma</i> sp. N335, small subunit ribosomal RNA gene	?	998	998	100%	0.0	94%	AJ223570.1
<i>Corvus frugilegus</i> ou Gralha-calva (Praga - República Tcheca)	<i>Trypanosoma avium</i> small subunit ribosomal RNA	Medula óssea	994	994	100%	0.0	94%	U39578.2

*Possum**: Nome genérico dado a marsupiais de pequeno e médio porte arborícolas na Austrália, Nova Guiné e Nova Zelândia.

A árvore filogenética foi construída utilizando as sequências de maior similaridade no algoritmo Blastn aliada a sequências representativas de tripanossomatídeos de outros clados (Figura 10). Para este alvo o número de sequências de comparação disponível era baixo e não foi possível comparar o nosso isolado com um maior número de isolados pertencentes a outros clados. Entretanto, conforme observado na árvore do 18S SSU, observamos o mesmo padrão com nossos isolados sendo da mesma espécie, além de serem um grupo-irmão dos tripanossomatídeos que ocorrem na Austrália.

Figura 10: Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio V7-V8 para as amostras denominadas “Baco” e “Fígado”.



Para o alvo gGAPDH utilizamos o mesmo padrão de busca por similaridade no algoritmo Blastn, entretanto haviam poucas sequências similares depositadas para este alvo. Por este motivo utilizamos o ponto de corte menor, de 93% de identidade. Mais uma vez, as maiores similaridades foram observadas com morcegos da América do Sul e com marsupiais australianos. As sequências de retorno estão descritas no quadro 3.

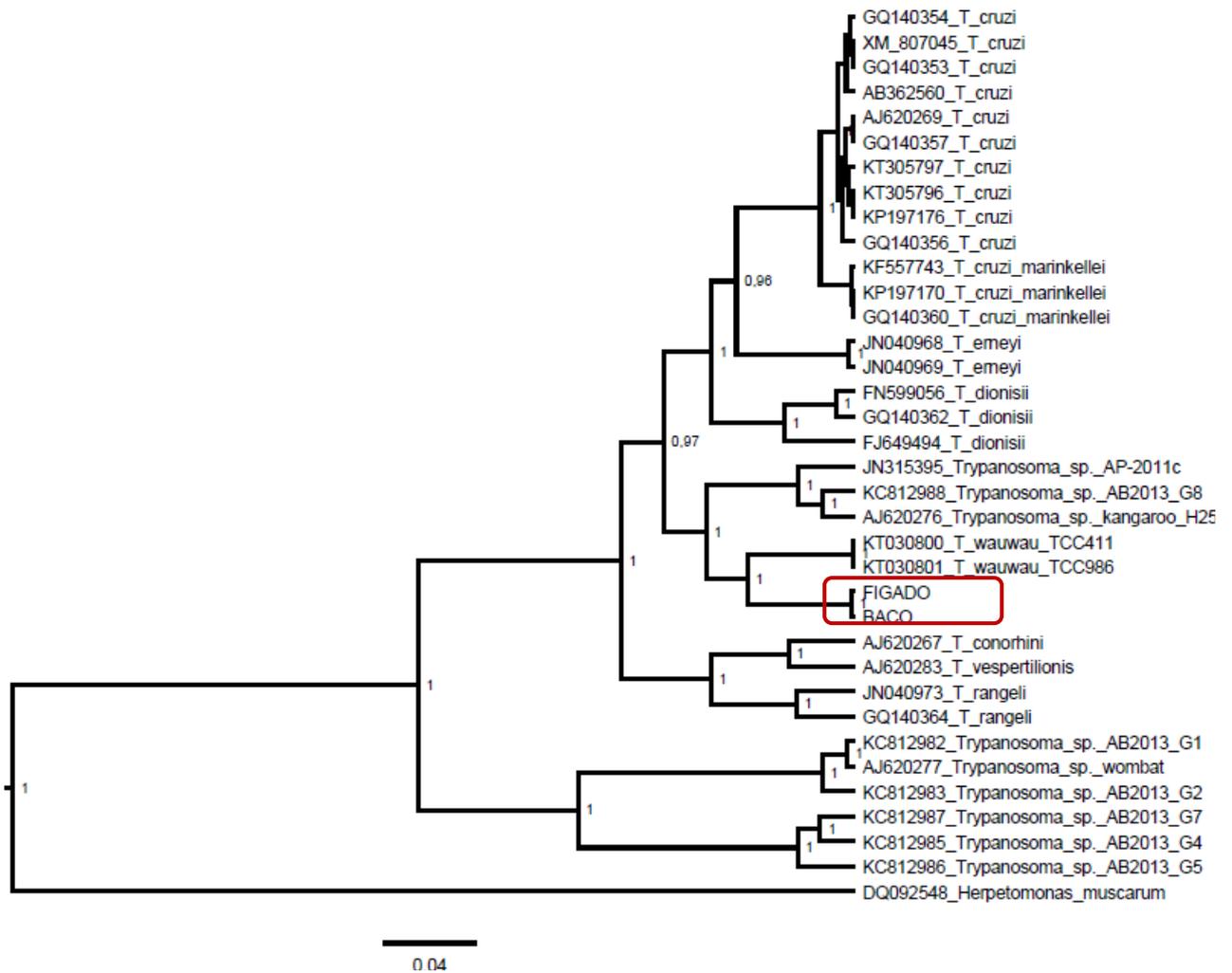
Quadro 3: Informação das sequencias de retorno obtidas dos isolados de maior similaridade no *GenBank* para o alvo gGAPDH. Ponto de corte 93% de identidade

Hospedeiro/Origem	Description	Tecido de isolamento	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
 <i>Artibeus lituratus</i> (Colômbia)	<i>Trypanosoma</i> sp. BACO46 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	Sangue	1170	1170	100	0.0	97%	KT368801
<i>Possum*</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. AP-2011c isolate 15 glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds	Sangue	1068	1068	96%	0.0	94%	JN315395
<i>Macropus giganteus</i> (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. kangaroo H25 partial gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, isolate kangaroo H25	Sangue	1062	1062	96%	0.0	94%	AJ620276
Woylie, banded hare wallaby, bodie (Oeste da Austrália)	<i>Trypanosoma</i> sp. AB-2013 voucher AB2013 G8 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	Sangue	1035	1035	96%	0.0	93%	KC812988
 <i>Pteronotus</i> sp. Porto Velho - RO - Brasil	<i>Trypanosoma wauwau</i>	Sangue	-	-	100%	0.0	91%	KT030799 - KT030806

*Possum**: Nome genérico dado a marsupiais de pequeno e médio porte arborícolas na Austrália, Nova Guiné e Nova Zelândia.

Para o gene gGAPDH tivemos um número muito maior de sequências de tripanossomatídeos de outros clados disponíveis para comparação. Esta árvore nos mostra que os isolados “Baço” e “Fígado” pertencem a mesma espécie, formam um clado com *T. wauwau* e são grupo irmão de isolados de Trypanosomas australianos.

Figura 11: Árvore filogenética construída utilizando o método Máxima Verossimilhança com 1000 repetições com base nas sequências obtidas através do ensaio gGAPDH para as amostras denominadas “Baço” e Fígado”.



A análise das árvores obtidas com cada um dos genes analisados e que apresentam diferentes padrões de evolução mostrou resultados semelhantes, dando robustez à nossa análise. Nossos dados contribuem também para demonstrar a fragilidade do resultado obtido pela concatenação de sequências de genes com

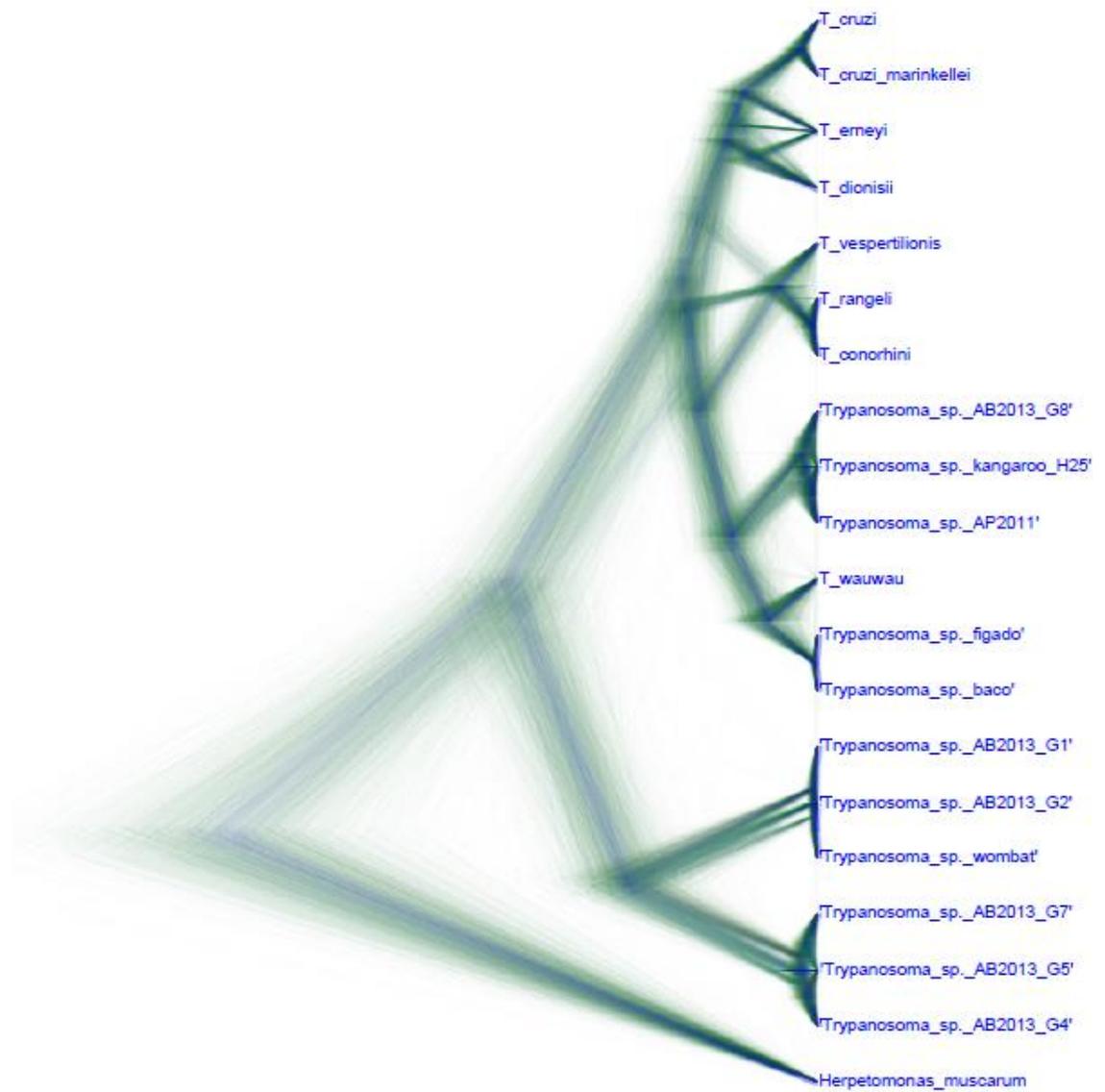
diferentes padrões de evolução e a análise bayesiana realizada pelo programa Beast, representadas respectivamente pelas figuras 12 e 13.

Figura 12: Árvore concatenada dos marcadores V7-V8 e gGAPDH:



Na figura 13 está representada a árvore de espécies realizada pelo programa *BEAST. Cada linha desenhada em verde representa uma das 1000 árvores possíveis geradas com os dados inseridos. Quanto mais forte e escuro fica o traçado, significa que mais linhas foram desenhadas naquele ponto e que aquele determinado agrupamento aconteceu mais vezes. Podemos observar nessa figura que existe bastante robustez no pertencimento dos isolados do nosso estudo ao mesmo clado que *T. wauwau*, sendo este um clado basal no clado cruzi e mais próximo do clado formado por isolados de *Trypanosoma* de marsupiais australianos.

Figura 13: Árvore de espécies realizada pelo programa *BEAST para os marcadores 18S SSU e gGAPDH:



6. DISCUSSÃO

A análise conjunta dos resultados obtidos com as caracterizações biológica e molecular, bem como a análise filogenética realizada possibilita a descrição de uma nova espécie de *Trypanosoma*. Esta espécie que descrevemos neste estudo ainda não foi formalmente nomeada e foi primeiramente isolada e caracterizada a partir de parasitos obtidos de culturas de baço e fígado de um *Didelphis aurita* proveniente da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Brasil.

Pequenos mamíferos têm sido descritos como importantes reservatórios de diversos tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. Nos últimos anos vários trabalhos têm investigado a importância desempenhada por estes animais na manutenção do ciclo silvestre de *Leishmania* spp. O papel dos marsupiais enquanto reservatório atrai uma maior atenção pelo seu hábito sinantrópico, podendo carrear, para o ambiente doméstico, espécies de *Leishmania* antes restritas ao ambiente silvestre ou iniciar um ciclo urbano em um local onde este não existia (Guerra et al 2006). Na pesquisa de *Leishmania* em animais silvestres são examinados tecidos como baço, fígado, medula óssea e pele, sendo estes fragmentos utilizados tanto para ensaios de biologia molecular, quanto isolamento em cultivo. Em nosso estudo, este novo tripanossomatídeo foi isolado de baço e fígado de um didelfídeo numa expedição que buscava isolar *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* e foram seguidos os protocolos de isolamento preconizados para cada um desses parasitas. Os tecidos e meios de isolamento são os já citados acima para *Leishmania* spp em meio bifásico com NNN+Schnneider+10% SFB, enquanto que para *Trypanosoma cruzi* utilizamos sangue, inoculando em meio bifásico NNN+LIT+10% de SFB.

O didelfídeo em questão apresentava infecção mista com uma população sanguínea de *T. cruzi* TcI (resultado prévio obtido através do ensaio do mini-éxon). Esse parasita foi isolado em meio bifásico NNN+LIT+10%SFB e foi observada morfologia compatível com *Trypanosoma cruzi* através do exame de esfregaços corados pelo Giemsa. Também foi realizada curva de crescimento dessa população parasitária, com duração de 18 dias e pico de crescimento no 12º dia. Como nossos isolados apresentaram crescimento de 5 dias até a fase estacionária, já nos mostrou serem populações diferentes e que esse marsupial apresentava uma infecção mista.

Uma hipótese é que esta infecção mista com *T. cruzi* tenha influenciado o curso da infecção pela nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita e que isso tenha resultado num aumento de sua população parasitária, permitindo seu isolamento, o que nunca havia acontecido antes nos estudos de nosso grupo e nem em relatos de outros estudos na literatura. Nessa suposição, a população de *T. cruzi* pode ter debilitado o gambá, influenciando sua capacidade de resposta imunológica e outras infecções, o que resultaria num aumento de populações parasitárias nestes órgãos vascularizados a ponto de serem detectadas em cultivo axênico. Outro ponto é que a detecção destas populações parasitárias foi realizada quando buscávamos o isolamento de *Leishmania* sp., e por conta disso utilizamos o meio de cultura Schneider acrescido de 10% de SFB. Caso esse didelfídeo apresentasse também uma infecção mista por *Leishmania* nos mesmos órgãos utilizados para cultivo, o crescimento *in vitro* desse parasita provavelmente teria suplantado a população de tripanossomas e estes, mesmo que observados num primeiro momento, não conseguiriam se estabelecer como cultura axênica. Além disso, se buscássemos neste trabalho apenas pelo diagnóstico de *Trypanosoma* spp. nestes animais, provavelmente apenas teria sido coletado o sangue do mesmo e esta nova espécie de *Trypanosoma* não seria detectada. Este, aliás, costuma ser o único tecido coletado durante expedições a campo onde busca-se o diagnóstico da infecção por *Trypanosoma* sp., como pode ser observado em todos os trabalhos com *Trypanosoma* australianos, por exemplo. O fato é que são múltiplas as variáveis que podem atuar como um filtro, selecionando as populações parasitárias que serão detectadas, tanto no animal como em condições experimentais (Devera; Fernandes; Coura 2003). Nosso sucesso no isolamento e caracterização desta nova espécie de *Trypanosoma* foi consequência de uma conjunção de fatores individuais, que não somos capazes de listar ou apontar aqueles mais importantes.

Cabe também ressaltar que ainda não conhecemos a biologia e ciclo de vida desta nova espécie de parasito, nem se a forma epimastigota que observamos em cultura é sua única forma de vida. Muito menos podemos inferir qualquer coisa em relação ao seu comportamento quando em co-infecção com outra espécie de *Trypanosoma* no mesmo hospedeiro, neste caso, o *T. cruzi*. Mesmo que esta nova espécie de *Trypanosoma* tenha a capacidade de invadir outros tecidos, como o sangue, por exemplo, o fato da população de *T. cruzi* estar presente pode ter impedido esta colonização. Por outro lado, por terem sido isolados de órgãos

altamente vascularizados, sendo um deles de hemocaterese (baço), as populações parasitárias presentes no baço e fígado podiam estar albergados em microvasos destes tecidos. Microvasos do baço é um sítio comum de encontro de *T. musculi*, por exemplo (Albright et al., 1999). Outra questão é o ambiente de sobrevivência e replicação desse parasita: espécies de *Trypanossoma* do subgênero *Schyzotrypanum* se reproduzem intracelularmente no hospedeiro vertebrado, a partir de formas amastigotas. *T. brucei*, por outro lado, se reproduz no hospedeiro mamífero sob a forma tripomastigota e tem vida exclusivamente extracelular. Na verdade, as espécies de *Trypanosoma* que se reproduzem nos hospedeiros mamíferos sob a forma epimastigota são todas do grupo do *T. lewisi* (Hoare, 1972).

Buscando avaliar sua capacidade de sobrevivência dentro de células fagocíticas, realizamos um ensaio de interação destes parasitos com macrófagos peritonias murinos. Neste ensaio, realizado nos tempos de 1, 24, 48 e 72h, observamos internalização do parasita após 24h de interação. No entanto, não foi observado estabelecimento da infecção, e os macrófagos da cultura foram capazes de destruir os parasitos, não sendo observadas sinal de parasitos nas células macrofágicas em 48 ou 72h. Este experimento foi realizado uma única vez e, portanto, apresentado nesta dissertação apenas como resultados complementares, o quais estão melhor descritos no Anexo II.

Outra questão que se coloca é acerca da estratégia de dispersão desta nova espécie de parasito na natureza. Por ser ainda uma primeira descrição, oriunda de um único hospedeiro, não sabemos se se trata de um parasito espécie-específico ou generalista. Não saberíamos ainda apontar qual seu mecanismo de transmissão na natureza, mas podemos hipotetizar que seja vetorial, vertical ou oral, como são os mecanismos descritos para outras espécies desta família. Em relação à transmissão vetorial, diferentes artrópodes estão envolvidos com a transmissão de espécies de *Trypanosoma* (Hoare, 1972). Imaginamos que dificilmente seu vetor seria um triatomíneo, envolvido na transmissão de *T. cruzi*, pois provavelmente já teria sido detectado em amostras de conteúdo intestinal em outros estudos. A busca por possíveis vetores deve ser iniciada a partir da investigação do conteúdo intestinal de ectoparasitas e outros invertebrados hematófagos que parasitam os *D. aurita* desta área, bem como invertebrados hematófagos associados a tocas usadas por esses animais. Cabe ressaltar que o simples encontro do parasito num destes invertebrados não os caracterizam como vetores, mas seria um primeiro indicativo

de qual(is) espécie(s) de vetor poderia estar envolvido. Este possível vetor poderia transmitir esta nova espécie de *Trypanosoma* por via inoculativa (salivaria), contaminativa (stercoraria) ou mesmo que a transmissão deste parasito seja garantida a partir do método de transmissão considerado ancestral, que é a via oral, quando os gambás predam este invertebrado infectado (Roque; Jansen *in* Galvão 2014). A transmissão vertical, embora menos comum, também é uma possibilidade que não pode ser descartada e explicaria a manutenção desta espécie de parasitos em um grupo específico de hospedeiros, como é observado em diferentes isolados já descritos em marsupiais da Austrália (Thompson 2014, Mc Innes 2010, Austen 2009, Noyes 1999).

Uma vez que os parasitos haviam sido isolados em meio Schneider, descrito como bastante eficaz para o cultivo axênico de *Leishmania*, mas muito raramente reportado em estudo com *Trypanosoma* sp., testamos a viabilidade dos parasitos, bem como a indução para outras possíveis formas parasitárias, em meios de cultura descritos para manutenção (LIT, RPMI) (Noyes et al 1999), isolamento (LIT, TRPMI) (Noyes et al 1999) ou indução de metaciclo-gênese (DMEM e RPMI) (Koerich et al 2002) de espécies de tripanossomatídeos. Em nenhum dos meios testados houve sobrevivência do parasita, ocorrendo morte de 100% da população após 48h em todos os meios citados. Também foi testada a viabilidade em cocultivo com células Vero, já que *T. brucei* não se desenvolve em meio axênico (Kaminsky; Zwegarth 1989) e esta poderia ser uma característica parcialmente (já que ele se desenvolve em meio Schneider) compartilhada com a espécie de *Trypanosoma* aqui descrita. Os parasitos em cocultivo com células Vero em meio RPMI com 20% de SFB apresentaram células túrgidas nas primeiras 24h, e posteriormente não foram observadas células parasitárias viáveis no sobrenadante. A cultura foi observada por mais 48h a fim de verificar a existência de qualquer invasão celular, o que não ocorreu. Assim, os isolados obtidos de baço e fígado apresentaram melhor crescimento em meio NNN+Schneider's+2% de urina humana, mantendo a forma epimastigota até a senescência. Não foi registrada nenhuma outra forma do parasito durante o cultivo em meio axênico.

Nas primeiras classificações de tripanossomatídeos os caracteres para distinção de espécies eram formas evolutivas, hospedeiros e biologia, com um método mais próximo à taxonomia de *Linnaeus* com medições de tamanho do corpo, cinetoplasto, flagelo, entre outras medidas (Hoare, 1972). Atualmente essas

medições não são mais caráter definidor, mas ainda são consideradas características a serem nominadas (Lima et al 2015). Nos isolados obtidos de baço e fígado as lâminas coradas com Giemsa apresentaram formas epimastigotas grandes e com cinetoplasto junto ao núcleo, como observado em parasitas como *Trypanosoma cruzi* e *T.c. marinkellei* (*Schizotrypanum*) (Lima et al 2012).

Atualmente a abordagem de taxonomia integrada utiliza dados de superfície externa (microscopia eletrônica de varredura) e ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão), além da abordagem filogenética. Para nossos isolados a análise de microscopia eletrônica de varredura possibilitou a identificação da forma evolutiva de meio de cultura axênico como sendo epimastigota pela localização da saída do flagelo. A análise morfométrica dessas imagens também evidenciou um intenso polimorfismo, com grande variação de comprimento e largura do corpo entre células do mesmo isolado. As células apresentaram aspecto delgado e alongado, com corpo levemente torcido, semelhante a *Trypanosoma livingstonei*, um tripanossomatídeo de morcego (Lima 2013).

A análise ultraestrutural possibilitou a visualização de estruturas comuns a várias espécies de tripanossomatídeos como presença de cinetoplasto, mitocôndria ramificada, vesículas de internalização e acidocalcissomos (Souza 2008). O diferencial que observamos em nossos isolados e que não encontramos paralelo na descrição de outros tripanossomatídeos, foi a presença de estruturas de membrana única, geralmente agrupadas em pilhas de três ou quatro. Analisando as estruturas observadas e caracterizadas e fazendo uma analogia com as estruturas e funções descritas em outros tripanossomatídeos, nossa hipótese é que se trata de reservossomos ou glicosomos. A confirmação desta hipótese depende de ensaios bioquímicos que verifiquem a presença, respectivamente, de corpos lipídicos ou de enzimas da via glicolítica.

A outra vertente da abordagem taxonômica integrada é a análise filogenética, que realizamos neste trabalho utilizando as sequências nucleotídicas dos produtos obtidos nas reações de PCR direcionadas à região parcial da subunidade menor ribossomal do gene 18S (alvos 18S SSU e V7-V8), e o marcador nuclear gliceraldeído – 3 – fosfato-desidrogenase glicosomal (gGAPDH). As análises individuais dos três alvos mostraram padrão semelhante entre si, diferindo apenas na topologia da árvore, que são resultantes das sequências de retorno obtidas através da análise de similaridade com sequências disponíveis no *GenBank*. Todas

elas evidenciaram que: (i) as populações de baço e fígado são de uma mesma espécie; (ii) que esta é uma espécie ainda não descrita de *Trypanosoma*; (iii) que esta nova espécie forma um clado com *T. wauwau*, espécie recentemente descrita em isolados provenientes de morcegos neotropicais (Lima et al 2015); e (iv) juntos formam um clado basal dentro do clado *cruzi* e filogeneticamente mais próximo do clado composto por tripanosomatídeos australianos.

Como é comum em diversos estudos filogenéticos, nós concatenamos as sequências para construção de uma única árvore com os dois genes. Essa árvore nos mostrou um padrão de distribuição das espécies dentro dos clados que foi completamente diferente daquele apresentado pelas árvores de genes construídas individualmente. Isso provavelmente é um artefato gerado pela diferença no padrão de evolução de cada gene, mostrando que é imprescindível avaliar esta diferença antes de unir sequências numa só árvore. No caso desses dois genes utilizamos o programa **Beast* e optamos pela construção de uma árvore de espécies. Segundo análise do próprio programa a evolução do gene ribossomal é cinco vezes (5x) mais lenta que a do gGAPDH, por isso a discrepância observada na árvore concatenada e devidamente corrigida na árvore de espécies.

A análise filogenética dos genes ribossomais e nuclear mostrou uma proximidade maior dos nossos isolados com o *T. wauwau* e, deste conjunto, com tripanosomatídeos de marsupiais da Austrália. Dados fósseis e geológicos sugerem que os marsupiais tenham se originado no que hoje chamamos América do Sul e tenham se dispersado diversas vezes entre América e Austrália enquanto ambos estavam unidos no Supercontinente-Sul. Isso explicaria em partes o porquê de tripanosomatídeos australianos serem filogeneticamente mais relacionados a outros tripanosomatídeos de fora da Austrália do que os de dentro do continente Australiano, se alinhando a outras teorias já existentes (Austen et al 2009, McInnes et al 2011, Thompson et al 2014).

No final de 2015 foi descrito um novo tripanosomatídeo de morcegos das Américas Central e do Sul que seriam semelhantes a tripanosomatídeos australianos (Lima et al 2015) e que, ao adicionarmos em nossas análises, verificamos que formam um mesmo clado com a espécie de *Trypanosoma* que estamos descrevendo. Segundo os autores, este achado do *T. wauwau* lançaria dúvidas sobre a origem do clado *cruzi* ser de morcegos do Velho ou do Novo Mundo, já que Lima descreve esse grupo como sendo de morcegos neotropicais das

Américas do Sul e Central e que se encontra em posição mais basal em relação ao H25 (Lima et al 2015) (tripanossomatídeo isolado de um canguru e que não teve espécie formalmente descrita em Noyes et al 1999).

Na “*Bat Seeding Hypothesis*” o ancestral comum do clado *cruzi* e de *T. rangeli* era um tripanossoma de morcego que se espalhou pelo mundo. Ao longo dessa dispersão, os tripanossomas de morcego foram sendo transmitidos entre diferentes hospedeiros, fazendo saltos (*host switching*) entre morcego-mamífero terrestre até que um deles teria originado o *T. cruzi* (Hamilton, Teixeira e Stevens et al 2012). Já a teoria do Super-contidente Sul se baseia na biogeografia de vicariância, onde os movimentos das grandes massas terrestres seriam responsáveis pela distribuição das espécies de seres vivos existentes. No caso dos tripanossomas, essa teoria diz que o clado *cruzi* teria se separado do clado *brucei* há aproximadamente 100 maa com a separação da África do que era a Gondwana. E a posição basal do H25 no clado *cruzi* teria relação com a expansão dos marsupiais em direção ao que seria a América do Sul, ocorrendo posterior expansão dos marsupiais na Austrália e, com isso, a diversificação de tripanossomatídeos (Stevens, 2001).

A nova espécie aqui descrita em *D. aurita* e disposta em uma posição mais basal que o H25 e outros tripanossomatídeos australianos formando um clado com a nova espécie de *Trypanossoma* (*T. wauwau*) descrita em morcegos Neotropicais das Américas do Sul e Central pode estar mostrando que ambas teorias estão corretas, mas que os processos nelas descritos ocorreram em tempos diferentes. Isto significa que estas teorias não seriam excludentes, como vêm sendo trabalhado pelos diferentes grupos que apoiam uma ou outra teoria, mas sim complementares. A nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita, juntamente com o *T. wauwau* seriam um elo perdido, o “*missing-link*”, entre as duas teorias que buscam explicar a história evolutiva dos *Trypanosoma*.

Neste cenário, provavelmente o *Trypanossoma* ancestral da nova espécie aqui descrita teria se estabelecido na América do Sul associado ao seu hospedeiro marsupial ancestral. Este hospedeiro infectado teria migrado (ou se mantido) e, posteriormente, irradiado enquanto os continentes ainda estavam unidos. A questão que ainda permanece em aberto é se este parasito teria depois se diversificado para outros mamíferos terrestres (parasito generalista) ou mantido apenas entre os marsupiais (espécie ou grupo específico). Cabe ressaltar que mesmo que os próximos isolados detectados desta nova espécie de parasito sejam encontrados

apenas em marsupiais, isso não necessariamente refletirá uma especificidade no início de seu caminho evolutivo. Várias espécies e grupos de mamíferos autóctones foram extintos após o “GABI”, como o caso dos grandes xenarthras, e com isso este parasito pode ter se mantido apenas entre os ancestrais marsupiais que se mantiveram, diversificaram e evoluíram para as espécies que hoje conhecemos.

O *T. wauwau* teria divergido deste parasito ancestral a partir de um *host-switching* para morcegos neotropicais e diversificado dentro deste grupo. Esta espécie teria depois se especiada neste grupo de mamíferos e atualmente este parasito não é capaz de invadir e se desenvolver em células de mamíferos e nem se mostrou infectivo quando inoculado em camundongos (Lima et al 2015). Cabe lembrar que estas características ainda não podem ser avaliadas para a nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita uma vez que apenas formas epimastigotas foram observadas, ao contrário do *T. wauwau* onde verificou-se sua diferenciação em formas tripomastigotas, epimastigotas e esferomastigotas. Novos processos de *host-switching* de parasitos ancestrais de *T. wauwau* para mamíferos terrestres teria ocorrido, como proposto na “*Bat Seeding Hypothesis*”, e uma dessas populações de *Trypanosoma* de morcegos teria posteriormente originado o *T. cruzi*.

Ainda avaliando as duas teorias propostas para explicar a origem do *T. cruzi*, acreditamos que a ausência de diversidade sulamericana usada como argumento por Hamilton e colaboradores (Hamilton, Teixeira e Stevens et al 2012) para refutar a teoria do supercontinente Sul pode ser resultado de subamostragem e/ou falta de utilização de técnicas adequadas de caracterização taxonômica. Os estudos usualmente realizados à campo utilizam “filtros biológicos” (como os meios de cultura, por exemplo) que acabam por selecionar as populações mais adaptadas àquelas condições artificiais. Além disso, o aumento da amostragem de mamíferos silvestres pode levar a um aumento da probabilidade de encontrar os parasitas menos frequentes, revelando uma diversidade ainda escondida.

Uma questão que ainda se coloca é como uma espécie de *Trypanosoma* tão ancestral teria sido capaz de permanecer escondido numa das espécies de marsupiais mais estudados das Américas? Gambás do gênero *Didelphis* compreendem alguns dos mamíferos mais estudados nas Américas frente a infecção por tripanossomatídeos de importância médica. Parte da explicação está no fato do número de espécies de tripanossomatídeos descritas estarem aumentando ano a ano através do uso de técnicas de PCR realizadas diretamente do sangue dos

hospedeiros silvestres. Por outro lado, estas técnicas são descritas há quase duas décadas, nosso grupo trabalha com este grupo de animais há muitos anos e nunca havíamos nos deparado com este parasito. A própria morfologia diferente da espécie de *Trypanosoma* aqui descrita poderia chamar a atenção de pesquisadores da área mesmo antes do advento das técnicas moleculares, mas não encontramos nenhum relato deste na literatura. Mais uma vez, fica claro o quanto ainda subestimamos a diversidade de parasitos que circulam entre os hospedeiros silvestres. Teorias e propostas de associações são sempre baseadas em subamostragem e sujeita a filtros biológicos promovidos pelas diferentes condições experimentais e de diagnóstico. Estas associações são importantes para acender a discussão sobre a diversidade dentro deste grupo, mas sempre devem ser tomadas com a devida cautela tendo em mente que ainda estamos longe de ter um *checklist* completo dos *Trypanosoma* que circulam nas Américas.

Segundo Poulin (2015) um checklist, que é um inventário de todas as espécies parasitas presentes num táxon maior (como peixes ou répteis), só está próximo de estar completo quando atende a três requisitos. Primeiro, através de uma rede bem amostrada, a proporção de conexões (*links*) possíveis que são efetivamente realizados entre as espécies parasitas e seus hospedeiros (conectância da rede, ou $L/(PxH)$) cai exponencialmente com o aumento do número de espécies hospedeiras ou parasitas por rede. Segundo, a rede parasita-hospedeiro, apresentada como checklist, é montada peça por peça ao longo do tempo: após a primeira associação ser reportada na literatura para uma dada região, o número de associações conhecidas irá crescer ao longo do tempo até, em teoria, o número de associações parasita-hospedeiro existente ter sido encontrada. Terceiro, após uma associação parasita-hospedeiro ter sido reportada na literatura pela primeira vez é mais provável que seja observada e reportada novamente nos anos seguintes. Assumindo que observação e relatórios de associações parasita-hospedeiro são frequência-dependentes, determinada na maioria das vezes pela abundância relativa dos hospedeiros e prevalência dos parasitas na região, uma relação positiva deve se desenvolver entre o quanto uma determinada associação é reportada e o tempo da sua descoberta original. As associações entre um dado parasito e seu hospedeiro (ou grupo de hospedeiros) mais comum seriam as primeiras a serem encontradas e, consequentemente, também deveriam ser as mais frequentemente reportadas.

Tendo em mente esses três princípios, baseado na posição filogenética desta nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita (em conjunto com *T. wauwau*) e considerando as duas teorias atualmente propostas para explicar a origem do *T. cruzi* (às quais podem ser complementares, e não excludentes) o clado basal formado por esta nova espécie e *T. wauwau* foram o elo perdido (o *missing-link*) na história evolutiva dos *Trypanosoma* Sul-americanos. As recentes descrições de novas espécies de *Trypanosoma* reforçam a teoria proposta por Poulin, de que o número de espécies novas de *Trypanosoma* ainda irá aumentar até o ponto em que a rede começar a se completar e possamos contar a história evolutiva desse grupo de maneira mais robusta.

7.CONCLUSÕES

- As populações parasitárias isoladas de baço e fígado de um *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro correspondem a uma nova espécie dentro do gênero *Trypanosoma*;
- Até o momento, apenas formas epimastigotas foram observadas e o único meio de cultura onde este parasito mantém-se viável é em meio Schneider acrescido de 10% SFB e 2% de urina humana;
- Em meio axênico, este parasito apresenta curva de crescimento com início e fim da fase logarítmica no 2º e 4º dia, respectivamente;
- A análise morfológica demonstrou formas exclusivamente epimastigotas, com variações morfométricas, organelas semelhantes a de outros tripanosomatídeos, à exceção de uma estrutura de membrana única, alongada, agrupadas em pilhas de 3-4 estruturas cuja caracterização ainda não está definida;
- A análise filogenética demonstrou que esta nova espécie forma, em conjunto com *Trypanosoma wauwau*, um novo clado, em posição mais basal dentro do clado *cruzi*;
- Este clado mais basal é o braço filogeneticamente mais próximo do clado que contém as espécies de *Trypanosoma* de marsupiais australianos;
- O clado formado pela nova espécie de *Trypanosoma* aqui descrita e *T. wauwau*, pode ser o elo perdido da história evolutiva dos tripanossomas Sul-americanos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta ICL, Costa AP, Nunes PH, Gondim MFN, Gatti A, Rossi Júnior JL, Gennari SM, Marcili A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (Lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Parasit Vectors* 2013; 6:349.
- Adams ER, Hamilton PB. New molecular tools for the identification of trypanosome species. *Future Microbiol* 2008; 3: 167-76.
- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitol* 2010; 26: 324-328.
- Albright JW, Mease RC, Lambert C, Albeight JF. *Trypanosoma musculi*: Tracking Parasites and Circulating Lymphoid Cells in Host Mice. *Exp. Parasitol.* 1999; 91:185–195.
- Aliaga C, Brenière SF, Barnabé C. Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect. Gene. Evol.* 2011; 11: 1155-58.
- Añez, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. IV - A reconsideration of its systematic position. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1982; 77:405-15.
- Austen JM, Jefferies R, Friend JA, Ryan U, Adams P, Reid SA Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n. sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (*Potorous gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*) *Parasitol.* 2009; 136: 783–792.
- Araújo CAC, Cabello P H, Jansen AM. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis*. *Acta trop* 2007; 101: 225-31.
- Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, Baptista C, Madeira MF. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with *Leishmaniasis* in Brazil: what is the real impact of canine *Leishmaniasis* control? *R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 419-23.
- Bacon CD, Silvestro D, Jaramillo C, Smith BT, Chakrabarty P, Antonelli A. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama *PNAS* 2015; 19: 6110-15.

- Beck RMD. An 'ameridelphian' marsupial from the early Eocene of Australia supports a complex model of Southern Hemisphere marsupial biogeography. *Naturwissenschaften* 2012; 99:715–29.
- Berthel, A. The Phylogeny and Biogeography of the Monito del Monte (*Dromiciops Gliroides*) and its Relatives Honors College 2013. (117).
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CSA, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. *Protist* 2013; 164: 129–52.
- Botero A, Cooper C, Thompson CK, Clode PL, Rose K, Thompson RCA, Morphological and Phylogenetic Description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: An Australian Wildlife Trypanosome within the *T. cruzi* Clade. *Protist* 2016; 167 (5):425-439.
- Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, Jansen AM, Triana-Chávez O. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasit Vectors* 2015; 8:482.
- Carreira JCA, da Silva AVM, Pereira DP, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil 2012. *Parasit Vectors*, 5:111.
- Carrillo JD, Forasiepi A, Jaramillo C, Sánchez-Villagra MR. Neotropical mammal diversity and the Great American Biotic Interchange: spatial and temporal variation in South America's fossil record. *Front. Genet.* 2015; 5:451.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen, A.M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. 1984 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 513-515.
- Deschamps P, Lara E, Marande W, Purificación López-García P, Ekelund F, Moreira D. Phylogenomic Analysis of Kinetoplastids Supports That Trypanosomatids Arose from within Bodonids. *Mol Biol Evol* 2011; 28(1):53–58.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be Called *cruzi*. Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after in Vitro Culturing and Mice Infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; Rio de Janeiro, 98: 1-12.
- Docampo R, Huang G. Calcium signaling in Trypanosomatid parasites. *Cell Calcium* 2015; 57:194–202.

- Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite* 2014; 21,38.
- Garrido VV, Dulgerian LR, Stempin CC, Cerbán FB. The Increase in Mannose Receptor Recycling Favors Arginase Induction and *Trypanosoma Cruzi* Survival in Macrophages. *Int J Biol Sci* 2011; 7:1257-72.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003; 98:435–42.
- Haag J, O'h Uigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91: 37-49
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9:81-6
- Hamilton PB, Stevens JR. Resolving relationships between Australian trypanosomes using DNA barcoding data. *Trends Parasitol* 2011; 27:99.
- Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol* 2012; 28: 136-141.
- Heled J, Drummond AJ. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol Biol Evol.* 2010; 27(3):570–580
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, UK 1972
- Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991, 85:477-9.
- Humberg RMP, Oshiro ET, Pires e Cruz MS, Ribolla PEM, Alonso DP, Ferreira AMT, Bonamigo RA, Tasso Jr. N, Oliveira AG. Short Report: *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral *Leishmaniasis*, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 87: 470–472.
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* 2015; 151: 1–15.
- Jansen AM, Leon LL, Machado GM, da Silva MH, Souza-Leão SM, Deane M. *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis marsupialis*: a parasitological and serological follow up of the acute phase. *Exp. Parasitol.* 1991; 73:249-59.

- Kaminsky R and, Zweygarth E. Feeder Layer-Free *In Vitro* Assay for Screening Antitrypanosomal Compounds against *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. evansi*. *Antimicrob Agents Chemother* June 1989; 33: 881-85.
- Koerich LB, Emmanuelle-Machado P, Santos K, Grisard EC, Steindel M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. *Parasitol Res.* 2002; 88:21-5.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CSA, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat-seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit Vectors* 2013; 6:221.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana Jr M, Pavan AC, Carranza JC, Lim BK, Campaner M, Takata CSA Camargo EP, Hamilton PB, Teixeira MG. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors* 2015; 158:657.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M et al. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) emeyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. *Protist*, 2012; 163:856–872.
- Madeira MF, Almeida ABPF, Barros JHS, Oliveira TSF, Sousa VRF, Alves AS, Miranda LFC, Schubach AO, Marzochi MCA. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. *J Parasitol.* 2014; 100:231-34.
- Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, De Paula AA, Faissal BNS, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MCA *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa:Kinetoplastida) isolated from intact skin of domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2009; 136: 411-23.
- Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96:397-402.
- Matthews KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 283-90.

- McInnes LM, Gillett A, Ryan UM, Austen A, Campbell RSF, Hanger J, Reid SA. *Trypanosoma irwini* n. sp. (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) from de koala (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitology* 2009; 136:875–85.
- McInnes LM, Hanger J, Simmons G, Reid SA Ryan UM. Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*) *Parasitology* 2011; 138:59–70.
- Mitchell KJ, Pratt RC, Watson LN, Gibb GC, Llamas B, Kasper M, Edson J, Hopwood B, Male D, Armstrong KN, Meyer M, Hofreiter M, Austin J, Donnellan SC, Lee MSY, Phillips MJ, Cooper A. Molecular Phylogeny, Biogeography, and Habitat Preference Evolution of Marsupials. *Mol. Biol. Evol* 2014; 31:2322–330.
- Monastyrska I, Klionsky DJ. Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(5-6):483-94.
- Nilsson MA, Churakov G, Sommer M, Tran NV, Zemann A, Brosius J, Scmitz J. Tracking Marsupial Evolution Using Archaic Genomic Retroposon Insertions. *Plos Biol* 2010; 8 (7).
- Noyes HA Stevens JR TeixeiraM Pheland 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.
- Poulin R, Besson AA, Morin MB, Randhawa HS. Missing links: testing the completeness of host-parasite checklists. *Parasitology* 2016; 143:114-22.
- Roque ALR and Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014; pp 75-87. *Zoologia: guias e manuais de identificação series.*
- Roque, ALR, Xavier SCC, Gerhardt, M, Silva MF, Lima VS, D’Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Vet. Parasitol* 2013; 193:1-7
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014; 3: 251–62.
- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol* 2007; 150: 283–90.

- Schallig HD, da Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic *Leishmaniasis* in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387-93.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplasts. *Mol Biol Evol* 2002; 19 (12): 2071-83.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22 (4): 168-74.
- Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Thompson RCA. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoridae). *Parasitology* 2008; 135:1329–35.
- Souza W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 313-25.
- Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:89-100.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 2008; 15: 226-32.
- Szöör B, Haanstra JR, Gualdrón-López M, Michels PAM. Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of Trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* 2014; 22:79–87.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731-39.
- Thompson CK, Botero A, Wayne AF, Godfrey SS, Lymbery AJ Thompson RCA. Morphological polymorphism of *Trypanosoma copemani* and description of the genetically diverse *T. vegrandis* sp. nov. from the critically endangered Australian potoroid, the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata* (Gray, 1837)). *Parasit Vectors* 2013; 6:121.
- Thompson CK, Godfrey SS, Thompson RCA. Trypanosomes of Australian mammals: A review. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014; 3: 57–66.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Velez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and

Leishmania (Leishmania) chagasi in Colombia. Am J Trop Med Hyg, 1994; 50:557-65.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GA, Lopez E, Gonzalez N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. Int. J. Parasitol. 2005; 35:225-33.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva, E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha A., Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 1051-54.

ANEXO I

Meios de cultura:

TRPMI com 10% Soro fetal bovino

- RPMI 1640 (GIBCOBRL) 500ml
- HEPES 2,38g
- Tryptose DIFCO 3,2g
- Solução de Hemina (0,01M em NaOH) 2,5mg/ml
- Solução aquosa 0,1mM de Piruvato e 0,2mM glutamina 6,0ml
- Soro Fetal Bovino 50,6ml

Preparo:

Solução de Hemina:

Adicionar em agitação a hemina à solução de NaOH 0,01M cuidadosamente para que não haja precipitação. Permanecer em agitação até completa dissolução.

Juntar todos os reagentes e agitar até completa homogeneização.

Esterilizar por filtração em bomba de vácuo com filtro de 0,22µm de porosidade.

Eagle com 10% Soro fetal bovino - Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) –

- Pesar 9,60 g de MEM (GIBCO 145000-083) e colocar em Erlenmeyer
- Colocar água desmineralizada até completar cerca de 900 mL. –

Modo de preparo:

Dissolver utilizando uma barra e um agitador magnético.

Ajustar o pH em 7.2 a 7.4.

Ajustar o volume até 100 mL com água destilada.

Filtrar o meio utilizando um filtro com 0,22µm de porosidade

Manter em refrigeração.

Para o uso, adicionar 10% do volume separado para uso de soro fetal bovino estéril.

Ex: Alíquota de uso de 200ml de meio:

Retirar 20ml de meio e adicionar 20ml de soro fetal bovino estéril

DMEM meio de Eagle modificado por Dulbecco (1000ml)

- DMEM: 10g
- NaHCO₃: 3,7 g
- Hepes: 2g
- Fungizona (0,1%): 1mL
- Penicilina e Streptomicina (1%) 10mL

Acertar o pH: 7,4

Modo de Preparo:

Misture os reagentes e corrija o pH

Filtrar o meio utilizando um filtro com 0,22µm de porosidade

Adicionar o soro fetal bovino de acordo com o volume de uso (10% do volume)

LIT – Liver Tryptose Infusion

- 4.0 g NaCl
- 0.4 g KCl
- 8.0 g Na₂HPO₄ ou 15.1 g Na₂HPO₄.7H₂O
- 5.0 g Tryptose
- 5.0 g Infusão de fígado (Liver Infusion Broth)
- 1 ml da Hemina dissolvida em 0.1 M de Trietanolamino (10 mg/ml) estéril

Modo de Preparo

Diluir o NaCl, KCl, Na₂HPO₄, triptose, infusao de figado e hemina em água deslilada completando o volume de 1 litro. Adicionar 20 ml da solução 20% de glicose e 10% de Soro Fetal Bovino; adicionar os antibioticos streptomicina (133 mg/litro) mais penicilina (59 mg/litro).

Filtrar o meio utilizando um filtro com 0,22µm de porosidade

ANEXO II

Dados do experimento preliminar de infecção em macrófago peritoneal murinho

Células utilizadas:

Para a realização dos ensaios de cocultivo celular foram utilizadas células de linhagem (*Vero*) e de animais em cultura primária (macrófagos peritoneais). As células *Vero* (células de rim de macaco-verde, *Cercopithecus aethiops*) foram utilizadas para a técnica de *Feeder-Layer* em monocamada em meio RPMI suplementado com 10% SFB. Já os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos *Swiss-Webster* (outbreed) fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-Fiocruz). Os protocolos de manejo e coleta de material foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (LW-37/13).

Análise da infectividade *in vitro*

Ambos os isolados foram avaliados quanto ao potencial infectivo para macrófagos peritoneais murinos e esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Mirian Pereira, do Laboratório de Ultra-Estrutura Celular do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

Camundongos adultos *Swiss webster* (outbreed) foram submetidos a eutanásia em câmara de CO², para a coleta de macrófagos. Após a assepsia na região abdominal com álcool 70°Gl, com o auxílio de duas pinças do tipo “dente de rato”, a parede abdominal foi aberta e foi exposto o peritônio, onde foi introduzido cerca de 10 mL de meio DMEM (sem soro). Após suave massagem nessa região, esse volume foi aspirado com a mesma seringa, acondicionado em gelo (para evitar a adesão do macrófago à parede do tubo). A cada coleta foi realizado o acompanhamento de contaminação através da observação de uma gota do aspirado entre lâmina e lamínula no aumento de 400 vezes. Após a coleta, o volume aspirado foi quantificado para o ajuste de 3×10^6 células/ml. A semeadura em placas foi realizada em lamínulas para cultura de 13mm de diâmetro em placas de 24 poços.

A incubação foi feita a 37°C em estufa com 5% de CO² durante 2 horas para adesão dos macrófagos à lamínula. Após esse período, as lamínulas foram lavadas

com DEMEM a 37°C para a retirada das células não aderidas. Em seguida foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) a 37°C de temperatura e atmosfera úmida com 5% de CO², aguardando 24h para a realização da infecção com os parasitas. Esse período é necessário para garantir que não houve contaminação no processo.

Os parasitos foram obtidos de cultura axênica em fase estacionária de crescimento. A exposição das células aos parasitos foi realizada em meio DMEM+5%SFB em volume suficiente para atingir a concentração de 10 parasitas por célula. Os macrófagos foram expostos em intervalos de tempo de 1, 24, 48 e 72h, sendo as lamínulas fixadas e coradas pelo Giemsa. Após esse período foram realizadas análises a cada 24h num total de 72 horas (24,48 e 72h). Em cada tempo, o meio de cultura foi retirado e os poços levemente lavados com PBS a 37°C para que todos os flagelados em suspensão fossem retirados. Foram feitas lâminas de esfregaço do sobrenadante para observação das formas evolutivas presentes.

A cada intervalo de tempo as lamínulas contendo as células aderidas foram transferidas para outra placa e fixadas em formalina tamponada por 24h para posterior coloração pelo Giemsa. Já os demais poços receberam novo volume de DMEM+5%SFB fresco após o fim das primeiras 24h. Todas as infecções *in vitro* foram realizadas em duplicata (adaptado de Andrade et al 2010, Fernandes 2006, Madeira 2009).

Análise da infectividade *in vitro*

a) Macrófagos peritoneais - Foram observados sinais de internalização e degradação do parasita através da presença de material granuloso basófilo em seu interior de vacúolos nos macrófagos. Não foram observados vacúolos contendo o parasita viável, bem como não houve desenvolvimento ou replicação do parasita nos tempos de exposição utilizados.

b) Vero - Foi realizado ensaio de exposição com células Vero semi confluentes em garrafas de 25cm². Foram inoculados parasitas de fase estacionária e deixados em contato com as células em meio RPMI 10%SFB por 48h. Não foram observados vacúolos, ou sinais de internalização do parasita, bem como não houve desenvolvimento ou replicação do mesmo. Durante este período foi observado que

no meio RPMI leva a uma alteração de osmolaridade da célula parasitária, com aumento de turgidez e posterior morte do parasita

Referências do Anexo II

Andrade LO, Galvão MCL, Meirelles MdeNSL, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Different tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2010; 105(6):834-37.

Fernandes AB, Neira I, Ferreira AT, Mortara RS. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. Parasitol Res 2006; 100:59–68.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, De Paula AA, Faissal BNS, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MCA. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa:Kinetoplastida) isolated from intact skin of domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology 2009; 136(4):411-23.