

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Estudo morfológico, biológico e caracterização molecular  
de duas novas espécies de *Trypanosoma* oriundos de  
carrapatos naturalmente infectados**

**CAROLINA MAROTTA RIBEIRO**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Estudo morfológico, biológico e caracterização molecular  
de duas novas espécies de *Trypanosoma* oriundos de  
carrapatos naturalmente infectados**

**CAROLINA MAROTTA RIBEIRO**

*Sob a Orientação do Professor*

**Adivaldo Henrique da Fonseca**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias  
Veterinária.

SEROPÉDICA, RJ

Março, 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M484e Marotta, Carolina, 1983-  
Estudo morfológico, biológico e caracterização  
molecular de duas novas espécies de Trypanosoma  
oriundos de carrapatos naturalmente infectados /  
Carolina Marotta. - 2017.  
118 f.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, 2017.

1. Trypanosoma rhipicephalis sp. nov. 2.  
Trypanosoma amblyommi sp. nov. 3. Carrapato. 4.  
Propagação in vitro. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da  
, 1953-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAROLINA MAROTTA RIBEIRO**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
no Curso do Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

**TESE APROVADA EM 08/03/2017.**



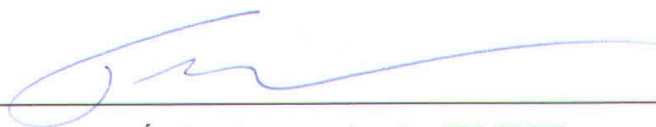
---

**ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA, Dr. UFRRJ**  
**(Orientador)**




---

**JULIANA HELENA DA SILVA BARROS, Dra. FIOCRUZ**



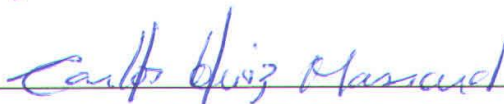
---

**FLÁVIO ALVES LARA, Dr. FIOCRUZ**



---

**ARGEMIRO SANAVRIA, Dr. UFRRJ**



---

**CARLOS LUIZ MASSARD, Dr. UFRRJ**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico esse trabalho à minha Mamãe,  
carinhosa e sábia, que não só me deu a vida, me  
ensina a viver...**

## **EPÍGRAFE**

**“ Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante. ”**

**Albert Shweitzer (Nobel da Paz, 1952).**

## AGRADECIMENTOS

Essa tese somente foi possível devido aos valorosos amigos, companheiros indispensáveis, aos quais agora agradeço.

Ao meu querido orientador Prof. Adivaldo Henrique da Fonseca pela sua vivência sempre a dividir, pela sua competência sempre a entusiasmar, pela extrema paciência em compartilhar sua vasta experiência com uma aluna que ainda tem tanto o que aprender. Sou sinceramente grata por ter se mantido um orientador confiante e pleno de presença em todas as etapas dessa tese. O seu estímulo companheiro em todas as horas, dividindo valiosas lições desde os momentos mais aprazíveis até os mais difíceis.

À Doutora Juliana Helena da Silva Barros e a Doutora Maria de Fatima Madeira da Fundação Oswaldo Cruz pela disposição sempre paciente de ensinar todos os assuntos questionados e pelo fundamental apoio essencial para a composição dessa tese.

Ao Doutor Flávio Alves Lara e ao Doutor Rubem Menna-Barreto do Instituto Oswaldo Cruz pelo essencial e indispensável auxílio, inestimável paciência, solícita atenção e vasta competência ao ensinar e elucidar dúvidas. Obrigada pela gentileza de dividir tanta experiência.

Agradeço a fundamental colaboração do Doutor Hermes Luz e do Professor Adevair Henrique da Fonseca e a direção do Parque Nacional de Itatiaia.

Aos estimados amigos e companheiros do Laboratório de Doenças Parasitárias, Adilton Pacheco de Oliveira, Cláudia Bezerra da Silva, Izabela Mesquita Araújo, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Juliana Ferreira dos Santos, Márcio Barizon Cepeda, Matheus Dias Cordeiro, Michele Bahia do Vale Silva, Paulo Cesar Magalhães Matos e Priscilla Nunes dos Santos pelas discussões sempre esclarecedoras e pela incessante ajuda em todas as etapas dessa tese. Sou grata a amizade e aos conselhos desses meus irmãos, que sempre foram ávidos em ajudar e pertinentes ao acrescentar.

A todos os professores, que tanto contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da UFRRJ por serem solícitos e competentes sempre presentes nos assuntos mais importantes.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPERJ, pelo apoio indispensável para concretização deste trabalho.

Ao total e irrestrito suporte de minha família, sempre disposta a me ajudar em tudo. Agradeço à minha mamãe Maria Marotta, incondicional em todas as ações, aos meus irmãos, Humberto Marotta e Rodrigo Marotta, pelo essencial e infindável apoio afetivo e construtivo, e aos meus animais Taz e Frodo pela inspiração e afeto. Obrigada ao meu namorado Thiago Sampaio pelo carinho incessante, apoio irrestrito, companheirismo com o qual convivo e divido doces e inestimáveis momentos da minha existência.

Em caráter maior, agradeço ao bom DEUS e a Nossa Senhora de Fátima, de quem sou devota, por sempre se manterem juntos de mim, iluminando minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Carolina Marotta Ribeiro é natural da cidade do Rio de Janeiro, nasceu no ano de 1983 e é filha de Maria Marotta, irmã de Humberto Marotta e Rodrigo Marotta. Coursou ensino fundamental no Colégio Imaculada Conceição em Botafogo, concluindo-o no Colégio Municipal Minas Gerais, na Urca. Coursou o ensino médio no Colégio Pedro II em São Cristóvão. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2002 tendo graduado em Medicina Veterinária em 2007. Em 2009, ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, tendo obtido o título de Mestrado em 2012. Ingressou no Doutorado, em 2013, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ. Nesta data apresenta e defende esta Tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.



## RESUMO GERAL

MAROTTA, Carolina Ribeiro. **Estudo morfológico, biológico e caracterização molecular de duas novas espécies de *Trypanosoma* oriundos de carrapatos naturalmente infectados.** 2017. 117p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são microrganismos unicelulares e flagelados que pertencem à família *Trypanosomatidae*. O presente estudo descreve pela primeira vez o encontro de dois isolados do gênero *Trypanosoma*, um infectando naturalmente o carrapato *Rhipicephalus microplus* e o outro infectando naturalmente o carrapato *Amblyomma brasiliense*. Ambos isolados foram caracterizados através de análises moleculares, morfométricas e biológicas. As culturas de *Trypanosoma* foram obtidas através do isolamento em linhagens celulares de IDE8 e mantidas meio de cultivo L15B, incubadas em estufas bacteriológicas a 30°C. Os isolados obtiveram um bom rendimento de propagação em meio L15B nas temperaturas de 30°C, 32°C e 34°C. A cultura permaneceu estável com mais de 14 passagens de propagação em cultura axênica com meio L15B à temperatura de 30°C. A criopreservação da cultura do isolado apresentou viabilidade após descongelamento pelo armazenamento em nitrogênio líquido. Foi realizada a curva de crescimento e análise das formas evolutivas dos isolados em meio axênico e nas linhagens celulares IDE8 e DH82. A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sa rDNA* comprovaram a autenticidade dessas novas espécies. As sequências nucleotídicas descritas foram depositadas no *Genbank*. A microscopia eletrônica de varredura e análise morfométrica revelaram ampla diversidade morfológica das duas espécies denominadas *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. cepa P1RJ e *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. cepa C1RJ. A citometria de fluxo associada à microscopia de fluorescência comprovou a internalização de ambos os isolados de *Trypanosomatídeos* em células das linhagens IDE8 e DH82 mesmo com a inibição da fagocitose celular. Aspectos relacionados à patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo e mecanismos de transmissão ainda são desconhecidos. Portanto, serão necessários mais estudos para o conhecimento de aspectos do ciclo biológico de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. e *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.

**Palavras chaves:** *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov., *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. , carrapato, propagação *in vitro*.

## ABSTRACT

MAROTTA, Carolina Ribeiro. **Morphological study, biological and molecular characterization of two new species of *Trypanosoma* derived from naturally infected ticks.** 2017. 117p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Parasites of the genus *Trypanosoma* are unicellular and flagellated microorganisms from the *Trypanosomatidae* family. This study describes for the first time the encounter of two isolates of the *Trypanosoma* genus naturally infecting *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma brasiliense* characterized through molecular, morphological and biological analyzes. *Trypanosoma* cultures were obtained by isolation in IDE8 cell lines and maintained in L15B culture environment, incubated at 30°C. The isolates obtained had a good yield spread in an L15B environment at temperatures of 30°C, 32°C and 34°C. The culture remained stable over 14 spread passages in axenic culture in L15B environment at a temperature of 30°C. Cryopreservation of the isolated culture presented viability after thawing due to liquid nitrogen storage. The curve of growth and analysis of the evolutionary forms of the isolates in the axenic environment and the cell lines IDE8 and DH82 were performed. The analysis of nucleotide sequences obtained with goals directed at the region *18S rDNA* and *24Sa rDNA* confirmed the authenticity of this new species. The nucleotide sequences described were deposited to Genbank. Scanning electron microscopy and morphometric analysis revealed a wide morphological diversity of the two described species. Flow cytometry associated with fluorescence microscopy confirmed the internalization of both Trypanosomatid isolates in cells from the IDE8 and DH82 lines even with the inhibition of cellular phagocytosis. Pathogenicity-related aspects, involvement in vertebrate hosts, epidemiology, evolutionary cycle and transmission mechanisms are still unknown. Therefore, more studies will be necessary for the knowledge of life cycle aspects of *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. and *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.

Keywords: *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov., *Trypanosoma amblyommi* sp. nov., tick, *in vitro* propagation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma epimastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	27
<b>Tabela 2</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma tripomastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	27
<b>Tabela 3</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma esferomastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	28
<b>Tabela 4</b>	Dados morfométricos ( $\mu\text{m}$ ) da forma evolutiva tripomastigota de diferentes <i>Trypanosomas</i> .	29
<b>Tabela 5</b>	Número de parasitos $\times 10^4/\text{mL}$ em cada dia de avaliação das curvas de crescimento de <i>T. rhipicephalis</i> nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.	39
<b>Tabela 6</b>	Percentual de células infectadas por <i>T. rhipicephalis</i> nas células IDE8, DH82 e controle.	43
<b>Tabela 7</b>	Percentual de infecção por <i>T. rhipicephalis</i> com e sem o tratamento por citocalasina nas células IDE8 e DH82.	46
<b>Tabela 8</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma epimastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>A. brasiliense</i> .	66
<b>Tabela 9</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma tripomastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>A. brasiliense</i> .	66
<b>Tabela 10</b>	Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) da forma esferomastigota do Tripanosomatídeo isolado de <i>A. brasiliense</i> .	67
<b>Tabela 11</b>	Número de parasitos $\times 10^4/\text{mL}$ em cada dia de avaliação das curvas de crescimento de <i>Trypanosoma amblyommi</i> nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.	73
<b>Tabela 12</b>	Percentual de infecção por <i>T. amblyommi</i> marcado com PKH67 nas linhagens IDE8, DH82 e controle.	80
<b>Tabela 13</b>	Percentual de infecção por <i>T. amblyommi</i> com e sem o tratamento por citocalasina nas linhagens IDE8, DH82 e controle.	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fotografia de <i>Tayassu pecari</i> (queixada) em bando, retirada durante uma coleta de amostras biológicas no Parque Nacional do Itatiaia, maio de 2015. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz.	04
<b>Figura 2</b>	Ninfa de <i>Amblyomma brasiliense</i> , (A) vista ventral: presença de tubérculos nos ângulos internos dos festões (setas), hipostômio curto com duas fileiras de dentículos (detalhe); (B) vista dorsal: presença de córnua (setas). Fotos cedidas: Paulo Cezar Magalhães.	05
<b>Figura 3</b>	Monocamada de células da linhagem IDE8, microscopia de contraste de fase invertida, objetiva de 40X.	13
<b>Figura 4</b>	Foto ilustrativa da secção da pata anterior de um carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> para extração da hemolinfa.	14
<b>Figura 5</b>	Fluxograma dos procedimentos para isolamento do Tripanosomatídeo oriundo de <i>R. microplus</i> .	15
<b>Figura 6</b>	Fotomicrografias de esfregaços de hemolinfa. Visualização de formas epimatigotas do Tripanosomatídeo e hemócitos de <i>Rhipicephalus microplus</i> corado por Giemsa, objetiva de 100X.	17
<b>Figura 7</b>	<i>Trypanosoma rhipicephalis</i> corados com o fluoróforo PKH67 verde. Microscopia de fluorescência, aumento de 400x.	20
<b>Figura 8</b>	Delineamento experimental das placas de cultivo dos ensaios de internalização, fagocitose e microscopia de fluorescência. CT= citocalasina D.	22
<b>Figura 9</b>	Aparelho de citometria FACSCalibur - Becton & Dickinson®, Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica, Pavilhão Cardoso Fonte da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.	23
<b>Figura 10</b>	Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, no Pavilhão Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.	24
<b>Figura 11</b>	Fotomicrografias de esfregaços de hemolinfa. Visualização de formas epimatigotas do Tripanosomatídeo e hemócitos de <i>Rhipicephalus microplus</i> corado por Giemsa, objetiva de 100X.	25
<b>Figura 12</b>	Gel de agarose a 2% apresentando amplificação de produtos gerados por Nested-PCR para o gene <i>18S rDNA</i> . Na primeira reação o tamanho do fragmento amplificado foi de 900 pb (1, 2) para os isolados de <i>Trypanosoma</i> (presente estudo) e <i>Trypanosoma</i> sp. (3). Na segunda reação o tamanho do fragmento amplificado foi de 700 pb (10,11) para os isolados de <i>Trypanosoma</i> (presente estudo) e <i>Trypanosoma</i> sp. (9). Controle negativo (4, 8). Controle positivo: <i>leishmania</i> sp. (5), <i>Trypanosoma caninum</i> (6, 7). Marcador de 100 pb (M).	30

<b>Figura 13</b>	Gel de agarose a 2% apresentando amplificação de produtos gerados por PCR para o gene <i>24Sa rDNA</i> . Fragmentos de 270 pb amplificados (1) para os isolados de <i>Trypanosoma</i> sp. (presente estudo) e <i>Trypanosoma</i> sp. (2). Controle negativo (5). Controle positivo (3,4). Marcador de 100 pb.	31
<b>Figura 14</b>	Árvore filogenética de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood – Modelo Kimura 2-parameter. Bootstrap: 1000.	32
<b>Figura 15</b>	Árvore filogenética de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> baseada na análise das sequências de 24S rDNA. Método Neighbor-Joining e Tamura-N.	33
<b>Figura 16</b>	Curva de crescimento em cultivo axênico de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .	34
<b>Figura 17</b>	Perfil das formas evolutivas em cultivo axênico de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .	34
<b>Figura 18</b>	Fotomicrografia da diversidade morfológica de Tripanosomatídeo isolado do <i>R. microplus</i> em cultivo axênico. Forma epimastigota aflagelar (A); forma em transição para tripomastigota (B, D, F); forma em divisão (C); epimastigota (E) e tripomastigota (G, H). Coloração Gimesa, 4º dia de cultivo.	35
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografia das formas evolutivas de Tripanosomatídeo isolado do <i>Rhipicephalus microplus</i> . Forma epimastigota aflagelar (A); forma epimastigota (B) e forma em divisão (C, D, E, F).	36
<b>Figura 20</b>	Curva de crescimento de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> na linhagem celular IDE8.	37
<b>Figura 21</b>	Curva de crescimento de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> na linhagem celular DH82.	38
<b>Figura 22</b>	Curvas de crescimento de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.	38
<b>Figura 23</b>	Perfil de formas evolutivas <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> em linhagem IDE8.	38
<b>Figura 24</b>	Perfil de formas evolutivas do <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> em linhagem DH82.	39
<b>Figura 25</b>	Citometria de fluxo mostrando a interação de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> com a linhagem IDE8.	41
<b>Figura 26</b>	Citometria de fluxo mostrando a interação de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> com a linhagem DH82.	42
<b>Figura 27</b>	Percentual de células infectadas por <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> nas células IDE8 e DH82.	43
<b>Figura 28</b>	Citometria de fluxo com e sem o tratamento de citocalasina na	44

infecção de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem IDE8.

- Figura 29** Citometria de fluxo com e sem o tratamento de citocalasina na infecção de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem DH82. 45
- Figura 30** Percentual de células infectadas por *Trypanosoma rhipicephalis* nas células IDE8 e DH82, com e sem o tratamento de citocalasina. 46
- Figura 31** Linhagem IDE8 corada com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm. 47/48
- Figura 32** Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm. 49/50
- Figura 33** Microscopia eletrônica das formas de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (C1RJ), cultura de 6 dias. 51
- Figura 34** Microscopia eletrônica da diversidade morfológica de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (P1RJ), cultura de 6 dias. 52
- Figura 35** *Tayassu pecari* adultos encontrados mortos na Cachoeira Itaporani, do Parque Nacional de Itatiaia. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz. 62
- Figura 36** (A) Infestação por *Amblyomma brasiliense* adultos na parte ventral do terço cranial do membro pélvico esquerdo, (B) larvas e ninfas na parte ventral de pavilhão auricular esquerdo. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz. 63
- Figura 37** Fluxograma dos procedimentos para isolamento do Tripanosomatídeo oriundo de *Amblyomma brasiliense*. 64
- Figura 38** Curva de crescimento do Tripanosomatídeo isolado do *A. brasiliense* em cultivo axênico. 68
- Figura 39** Análise de formas evolutivas do Tripanosomatídeo isolado do *A. brasiliense* em cultivo axênico. 68
- Figura 40** Fotomicrografia da diversidade morfológica do Tripanosomatídeo isolado do *Amblyomma brasiliense* em cultivo axênico. Forma epimastigota (A, B, D, E); forma em transição para tripomastigota (C) e forma em divisão (F, G). Coloração Gimesa, 4º dia de cultivo axênico. 69
- Figura 41** Fotomicrografia de Tripanosomatídeo isolado do *A. brasiliense*. Esferomastigota (A); forma em divisão (B, F); epimastigota (C) e forma em transição para tripomastigota (D, E, G). Coloração Gimesa, 6º dia de cultivo axênico. 70

<b>Figura 42</b>	Curva de crescimento de <i>Trypanosoma amblyommi</i> em células IDE8.	71
<b>Figura 43</b>	Curva de crescimento de <i>Trypanosoma amblyommi</i> em células DH82.	71
<b>Figura 44</b>	Perfil de crescimento de <i>Trypanosoma amblyommi</i> em IDE8, DH82 e cultivo axênico.	72
<b>Figura 45</b>	Perfil das formas evolutivas de <i>Trypanosoma amblyommi</i> na linhagem IDE8.	72
<b>Figura 46</b>	Perfil das formas evolutivas de <i>Trypanosoma amblyommi</i> na linhagem DH82.	73
<b>Figura 47</b>	Árvore filogenética de <i>Trypanosoma amblyommi</i> baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood –Modelo Kimura 2-parameter. Bootstrap: 1000.	75
<b>Figura 48</b>	Árvore filogenética de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> e <i>Trypanosoma amblyommi</i> baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood – Modelo Tamura-nei. Bootstrap: 1000.	76
<b>Figura 49</b>	Citometria de fluxo mostrando a infecção da linhagem IDE8 por <i>Trypanosoma amblyommi</i> marcado com PKH67.	78
<b>Figura 50</b>	Citometria de fluxo mostrando a infecção da linhagem DH82 por <i>Trypanosoma amblyommi</i> marcado com PKH67.	79
<b>Figura 51</b>	Percentual de infecção por <i>Trypanosoma amblyommi</i> nas linhagens IDE8, DH82.	80
<b>Figura 52</b>	Citometria de fluxo mostrando a internalização de <i>Trypanosoma amblyommi</i> com e sem a citocalasina na linhagem IDE8.	81
<b>Figura 53</b>	Citometria de fluxo mostrando a internalização de <i>Trypanosoma amblyommi</i> com e sem a citocalasina na linhagem DH82.	82
<b>Figura 54</b>	Percentual de infecção por <i>Trypanosoma amblyommi</i> com e sem o tratamento por citocalasina nas linhagens IDE8, DH82.	83
<b>Figura 55</b>	Linhagem IDE8 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por <i>Trypanosoma amblyommi</i> marcado com o fluoróforo PKH67 e observado em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala representa 50µm.	84/85
<b>Figura 56</b>	Linhagem IDE8 corada com DAPI e infectada com <i>Trypanosoma amblyommi</i> , marcado com o fluoróforo PKH67 e observada 48 horas pós-infecção em microscópio confocal, aumento de 630x. A barra de escala representa 50µm.	85
<b>Figura 57</b>	Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por <i>Trypanosoma amblyommi</i> marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala	86/87

representa 50µm.

- Figura 58** Microscopia eletrônica das formas de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (C1RJ), cultura de 6 dias. Forma epimastigota, bolsa flagelar (detalhe). Barra de escala 5µm. 88
- Figura 59** Microscopia eletrônica da diversidade morfológica de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (C1RJ), cultura de 6 dias. 89



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	2
2.2. Aspectos moleculares do Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	3
2.3. Queixada ( <i>Tayassu pecari</i> ).....	4
2.4. Carrapato <i>Amblyomma brasiliense</i> .....	4
2.5. Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	6
2.6. Cultivo de células de carrapato .....	6
CAPÍTULO I.....	8
ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> sp. nov. (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) ORIUNDO DE <i>Rhipicephalus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Local de execução das análises laboratoriais .....	12
2.2. Procedência das linhagens de células utilizadas no estudo .....	12
2.3. Manutenção e cultivo da linhagem de células IDE8 .....	12
2.4. Origem dos carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	13
2.5. Esterilização dos carrapatos .....	13
2.6. Isolamento de <i>Trypanosoma</i> .....	13
2.7. Purificação do isolado de <i>Trypanosoma</i> sp. ....	15
2.8. Criopreservação do isolado .....	15
2.9. Descongelamento dos isolados.....	16
2.10. Manutenção e monitoramento dos cultivos de <i>Trypanosoma</i> .....	16
2.11. Propagação em diferentes temperaturas e meios de cultivo celular .....	16
2.12. Análise do crescimento e das formas evolutivas em cultura axênica.....	16
2.13. Análise morfométrica .....	17
2.14. Manutenção e cultivo da linhagem de Células DH82 .....	18
2.15. Análise do perfil de crescimento em cultivo celular .....	18

2.16. Análises moleculares .....	18
2.16.1. Extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR).....	18
2.16.2. Sequenciamento e análise filogenética dos genes 18S rDNA e 24Sα rDNA .....	19
2.17. Internalização de <i>Trypanosomas</i> em linhagens celulares IDE8 e DH82.....	19
2.18. Avaliação de fagocitose de <i>Trypanosoma</i> em linhagens celulares IDE8 e DH82 .....	21
2.19. Microscopia de fluorescência.....	22
2.20. Microscopia eletrônica de varredura .....	23
3 RESULTADOS.....	25
3.1. Isolamento .....	25
3.2. Incubação em diferentes temperaturas e meios de cultivo .....	25
3.3. Análise morfológica do Tripanosomatídeo isolado de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	26
3.4. Análise molecular de Tripanosomatídeo isolado de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	30
3.5. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo axênico de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .....	34
3.6. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo celular de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .....	37
3.7. Internalização de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> em células IDE8 E DH82.....	39
3.8. Mecanismo de invasão celular de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .....	43
3.9. Microscopia de fluorescência de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .....	46
3.10. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Trypanosoma rhipicephalis</i> .....	50
4 DISCUSSÃO.....	53
5 DIAGNÓSTICO.....	57
CAPÍTULO II .....	58
ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Trypanosoma amblyommi</i> sp. nov. (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) ORIUNDO DE <i>Amblyomma brasiliense</i> (ACARI: IXIDIDAE) .....	58
RESUMO .....	59
ABSTRACT.....	60
1 INTRODUÇÃO .....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1. Origem dos carrapatos <i>Amblyomma brasiliense</i> .....	62
2.2. Isolamento do tripanosomatídeo de <i>Amblyomma brasiliense</i> .....	63

3 RESULTADOS .....	65
3.1. Isolamento .....	65
3.2. Incubação em diferentes temperaturas e meios de cultivo .....	65
3.3. Análise morfométrica de Tripanosomatídeo isolado de <i>Amblyomma brasiliense</i> .....	65
3.4. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo axênico de Tripanosomatídeo isolado de <i>Amblyomma brasiliense</i> .....	68
3.5. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas de <i>Trypanosoma amblyommi</i> em cultivo celular .....	70
3.6. Análise molecular .....	74
3.7. Internalização de <i>Trypanosoma amblyommi</i> em células IDE8 E DH82 .....	77
3.8. Mecanismo de invasão celular de <i>Trypanosoma amblyommi</i> .....	80
3.9. Microscopia de fluorescência de <i>Trypanosoma amblyommi</i> .....	83
3.10. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Trypanosoma amblyommi</i> .....	87
4 DISCUSSÃO .....	90
5 DIAGNÓSTICO .....	92
6 CONCLUSÃO GERAL .....	93
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
8 ANEXO .....	<u>100</u>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os tripanosomatídeos são organismos complexos, cuja classificação taxonômica sempre foi um desafio. Adicionada a ampla diversidade morfológica, representada pelas diferentes fases evolutivas e variabilidade genética. A família *Trypanosomatidae* inclui espécies que infectam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972, HAAG et al. 1998).

O estudo de uma nova espécie deve considerar o perfil molecular e aspectos relacionados à biologia, como o conhecimento de suas formas evolutivas que o parasito possa apresentar durante o seu ciclo biológico. Aspectos relacionados a patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo e mecanismos de transmissão.

No presente estudo, foram realizados o isolamento e a propagação de duas espécies de *Trypanosoma*, oriundas dos carrapatos *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma brasiliense*, naturalmente infectados. Foi também elaborada a caracterização molecular dessas duas novas espécies através do sequenciamento e análise filogenética dos genes *18S rDNA* e *24Sα rDNA*. Além da avaliação da viabilidade em diferentes meios de cultivo e temperaturas de incubação, análise morfométrica, monitoramento da diferenciação das formas evolutivas. Assim como a realização da curva de crescimento em cultivo axênico e nas linhagens de células de carrapato IDE8 e de macrófago DH82, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência para a avaliação da internalização e fagocitose celular e a microscopia eletrônica de varredura. O objetivo foi a descrição de duas novas espécies do gênero *Trypanosoma* oriundas de carrapatos naturalmente infectados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Trypanosoma*

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são microrganismos unicelulares e flagelados que pertencem à família Trypanosomatidae. Artrópodes hematófagos atuam como vetores biológicos e mecânicos das diferentes espécies dessa família, infectando uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972; HAAG et al., 1998).

As formas evolutivas presentes no ciclo biológico dos tripanosomatídeos são nomeadas de acordo com o formato do corpo, posição do cinetoplasto, em relação ao núcleo e o ponto de emergência do flagelo. A presença de uma estrutura circular denominada cinetoplasto, em todos os representantes dessa família caracteriza esse grupo. Além disso, o cinetoplasto é uma estrutura importante em estudos moleculares por conter uma massa condensada de DNA (RIOU & DELAIN, 1968).

O gênero *Trypanosoma* apresenta grande diversidade biológica ao longo do ciclo evolutivo. Classicamente as formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e esferomastigota são os estágios evolutivos descritos para as espécies desse gênero (HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976).

*Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* é um parasito cosmopolita de gado com alta incidência em todos os continentes, exceto na Antártida. Vetores de *T. theileri* são principalmente dípteros. Tabanídeos são considerados os vetores mais importantes. Infecções experimentais em laboratório demonstraram que a transmissão ocorre pela excreção de tripomastigotas metacíclicas nas fezes de tabanídeos, que ganham entrada para um novo hospedeiro, quer pela ferida da mordida do vetor ou abrasões da pele. Além disso, a infecção pode ocorrer por ingestão de fezes ou do próprio vetor pelo hospedeiro (BOSE & HEISTER, 1993).

Até a década de 60, os estudos sobre os tripanosomatídeos tinham como objetivos principais conhecer sua morfologia, hospedeiros, ciclo de vida, vetores modo de transmissão, infectividade e patogenicidade para animais de experimentação, além de estabelecer o cultivo desses protozoários *in vitro*. Nessa época, muitas espécies foram descritas e frequentemente mudadas de posição taxonômica, porque havia imprecisão na definição do gênero ou quando características biológicas e/ou moleculares. Com a microscopia eletrônica, foi possível evidenciar importantes características estruturas entre as espécies ou formas evolutivas dos tripanosomatídeos (SOUZA, 2008).

As abordagens biológicas a partir do cultivo *in vitro* são fundamentais para o conhecimento de características importantes do parasito como padrões morfológicos e perfis de multiplicação. A grande diversidade de meios de cultura pode fornecer informações nutricionais desses parasitos (SCHUSTER & SULLIVAN, 2002). O conhecimento da forma de multiplicação dos tripanosomatídeos é importante quando estudamos novas espécies. Algumas espécies do subgênero *Megatrypanum* como *T. theileri*, *Trypanosoma melophagium* e *Trypanosoma conorhini* a multiplicação é feita através da forma epimastigota em mamíferos (HOARE, 1972).

Estudos de interação celular podem oferecer informações de relações entre parasito e hospedeiro. Em um estudo com a espécie *Trypanosoma terrestres* os autores utilizaram monocamada de células Vero, C6/36 e SF9 e verificaram que apesar do crescimento parasitário não foi possível observar a invasão nessas células (ACOSTA et al., 2016). Madeira et al. (2009) demonstrou que o *Trypanosoma caninum* não foi capaz de infectar macrófagos murinos.

Foi descoberto o *Trypanosoma KGI* isolado de carrapato da espécie *Hemaphysalis hystricis* naturalmente infectados no Japão (THEKISOE et al., 2007). *Trypanosoma caninum* foi isolado a partir de uma cultura axênica da pele intacta de um cão doméstico capturado no Rio de Janeiro, Brasil, co-infectados com *Leishmania braziliensis* (MADEIRA, et al 2009). O sítio anatômico de onde o *T. caninum* tem sido isolado apresenta uma característica incomum para os parasitos pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. As amostras isoladas foram obtidas a partir do cultivo de pele íntegra. A patogenicidade desse parasito é um aspecto ainda a ser estudado. No entanto, o *T. caninum* parece não ser patogênico, tendo sido isolado na maioria das vezes de cães saudáveis (MADEIRA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011).

## 2.2. Aspectos moleculares do Gênero *Trypanosoma*

Estudos moleculares dos *Trypanosoma* posicionaram diversas espécies em grupos distintos dos subgêneros previamente definidos por parâmetros taxonômicos tradicionais (RODRIGUES et al., 2006).

Diversos marcadores genéticos têm sido empregados para o estudo molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma*. Para as regiões conservadas do genoma, tais como genes da pequena e grande subunidade do DNA ribossomal (*18S rDNA* e *24Sa rDNA*), são frequentemente usados para abordagem diagnóstica, principalmente para a identificação de novas espécies (LIMA et al., 2012; SIMO et al., 2013; VILLAREAL et al., 2013). O gene ribossômico (rDNA) é encontrado “*in tandem*”, ou seja, como unidades repetitivas sequencialmente, compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS - *ribosomal intergenic spacer*). Essas cópias passam por diversas etapas de processamento resultando em uma única unidade de transcrição, composta pelas moléculas da subunidade menor (18S ou SSU – *small subunit*) e da subunidade maior (5.8S e 24S ou LSU – *large subunit*). As regiões transcritas variáveis correspondem as regiões dos espaçadores transcritos externos (ETS - *external transcribed spacers*) e dos espaçadores transcritos internos (ITS – *internal transcribed spacers*), que são divididos em ITS-1 localizada entre as subunidades 18S e 5.8S e o ITS-2, entre 5.8S e 24S (DIETRICH et al., 1993). As sequências das subunidades 18S, 5.8S e *24S rDNA* apresentam variações evolutivas lentas, devido a pressão seletiva, em geral por inserções, deleções ou mutações, as sequências das regiões do *ITS rDNA* evoluem muito mais rapidamente, apresentando regiões variáveis tanto em tamanho como em sequência entre os organismos. As sequências da região do *ITS rDNA* são relativamente pequenas e rodeadas por segmentos altamente conservados nos quais os iniciadores para PCR (reação em cadeia da polimerase), os *primers*, são normalmente direcionados. O fato das sequências da região do *ITS rDNA* evoluírem muito mais rapidamente que as outras regiões do gene ribossômico, coloca essa região como um importante alvo para estudos que envolvem a variabilidade genética (LIMA et al., 2012). Sequências da subunidade do *18S rDNA*, têm sido as mais utilizadas devido a facilidade de amplificação por PCR e a presença de regiões conservadas que permitem alinhamentos confiáveis (PINTO et al., 2012). As sequências de *ITS-1* e *ITS-2 rDNA* têm sido usadas como marcadores genéticos para estudos de variabilidade nas comparações de indivíduos da mesma espécie ou entre espécies fortemente relacionadas (PULIDO et al., 1996).

O DNA do cinetoplasto (kDNA) além de ser uma estrutura altamente organizada, a ausência de recombinação e elevado polimorfismo fazem do kDNA um

importante alvo molecular no estudo das relações evolutivas entre os tripanosomatídeos. O kDNA representa cerca de 20-25% do total de DNA da célula e está organizado em uma rede formada pela concatenação de milhares de moléculas de DNA circulares, constituído pelos minicírculos e maxicírculos (LIU et al., 2005).

### 2.3. Queixada (*Tayassu pecari*)

*Tayassu pecari* é um mamífero ungulado da família *Tayassuidae* e no Brasil recebe entre outros, o nome vulgar de “queixada”. Trata-se de um mamífero da ordem *Artiodactyla* e sua distribuição nas Américas se estende desde o México até o nordeste da Argentina (MAYER; WETZEL, 1987). Segundo (REYNA-HURTADO et al., 2009), o queixada (figura 1) possui uma alta afinidade para locais com abundância de água, habitando a periferia de rios, áreas alagadas e charcos, principalmente durante o período seco do ano. Merece destaque sua proximidade com membro da família *Suidae* representada pelo porco doméstico (*Sus scrofa domesticus*) em sua versão selvagem e pelo Javali (*Sus scrofa scrofa*). *Tayassu pecari* pode atingir 1,10 m de comprimento, possui comportamento social gregário e forma grupos de tamanho variável, podendo atingir 300 indivíduos em florestas densas tropicais (FRAGOSO, 2004). A figura 1 registra exemplares da espécie nativos no Parque Nacional de Itatiaia, RJ.



**Figura 1.** Fotografias de *Tayassu pecari* (queixada) em bando, retirada durante uma coleta de amostras biológicas no Parque Nacional do Itatiaia, maio de 2015. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz.

### 2.4. Carrapato *Amblyomma brasiliense*

O carrapato *Amblyomma brasiliense* Aragão (1908) é endêmico na América do Sul, com relatos na Argentina, Paraguai e Brasil (GUGLIELMONE et al., 2003), (Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Pará e Espírito Santo) (ARAGÃO, 1936).

Espécie comum parasitando o porco-do-mato (*Tayassu tajacu*), também ocorre em menor número no queixada (*Tayassu pecari*), paca (*Agouti paca*), cotia (*Dasyprocta agouti*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e anta (*Tapirus terrestris*). Este carrapato foi encontrado também na ave jacu-pemba (*Penelope superciliaris*) (GUIMARÃES et al., 2001). Nas matas em que porcos-do-mato são abundantes, o homem é muito atacado por esta espécie, principalmente pelas suas larvas, mas ainda se desconhece sua capacidade vetorial de agentes patogênicos para seres humanos ou

mesmo para animais (ARAGÃO, 1936). Estudos relataram que larvas e ninfas de *A. brasiliense* estão entre os carrapatos mais agressivos para os seres humanos no Brasil (ARAGÃO, 1936).

Larvas de *A. brasiliense* têm a base do capítulo retangular, palpos curtos e idiossoma arredondado, coxa I com dois espinhos, sendo o externo mais longo que o interno e coxas II e III com um espinho. Ninfas (Figura 2) têm a base do capítulo retangular com córnua pontiaguda, idiossoma oval, coxa I com dois espinhos evidentes, sendo o externo mais longo que o interno, coxas II e III com um espinho curto em cada uma e coxa IV com um espinho muito pequeno, presença de tubérculos quitinosos na superfície interna da borda posterior do idiossoma. Estas características, associadas à quetotaxia e porotaxia, poderão tornar possível a identificação dos estágios imaturos de carrapatos do gênero *Amblyomma* (MARTINS et al., 2008).

Morfologicamente, os machos possuem a coxa I com dois espinhos, coxas II e III com dois tubérculos, coxa IV com espinho externo e um interno reduzido a um pequeno tubérculo, escudo castanho claro, com manchas amareladas e festões prolongados por lâminas quitinosas, salientes, não incisadas. O sulco marginal não ultrapassa o segundo festão e o hipostomio apresenta dentição 3/3 (GUIMARÃES et al., 2001).

Por seu lado, as fêmeas possuem tubérculos quitinosos nos ângulos internos dos festões, base dorsal do gnatossoma retangular com os ângulos posterolaterais salientes, tubérculos quitinosos em todos os festões, exceto no situado ao centro, escudo com bordo escuro e centro acobreado, espinhos da coxa I curtos, o interno correspondendo à metade do comprimento do externo (GUIMARÃES et al., 2001).

Estudos mostraram que esta espécie de carrapato possui um ciclo de vida de aproximadamente um ano em condições de laboratório (20°C, 90% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) e que tais condições seriam essenciais para o seu desenvolvimento, com sensibilidade à variações de temperatura e de umidade (SANCHES et al., 2008).



**Figura 2.** Ninfas de *Amblyomma brasiliense*, (A) vista ventral: presença de tubérculos nos ângulos internos dos festões (setas), hipostômio curto com duas fileiras de denticulos (detalhe); (B) vista dorsal: presença de córnua (setas). Fotos cedidas: Paulo Cezar Magalhães.



## 2.5. Carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ixodídeo responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária de regiões tropicais e subtropicais e transmite hematozoários, principalmente dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*. Este carrapato é um ectoparasito hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Sua incidência é maior em grandes rebanhos da América, África, Ásia e Austrália, sendo considerado o carrapato de maior impacto em perda econômica nos rebanhos da América do Sul (BARROS-BATESTTI et al., 2006). Desde de 2002, *R. microplus* se tornou a nomenclatura para o carrapato *Boophilus microplus* de acordo com estudos taxonômicos (BARKEL & MURRELL, 2003).

A presença de uma projeção caudal no macho e espinhos na coxa I bem desenvolvido nas fêmeas são características diferenciais presentes em *R. microplus*. Possuem capitulo curto, palpos ligeiramente mais curtos que o hipostômio. Pode apresentar dentição 5/5 ou 4/5, ausência de festões, placas espiraculares ovais em ambos os sexos, no macho quatro placas adenais bem desenvolvidas (BARROS-BATESTTI et al., 2006).

## 2.6. Cultivo de células de carrapato

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo são chamadas de culturas primárias. Na maioria dos casos células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias, elas podem ser repetidamente subcultivadas por semanas e meses. Tais células se proliferarão em linhagem de células (ALBERTS et al., 2002). Linhagens contínuas de células já foram estabelecidas a partir de várias espécies de carrapatos ixodídeos e argasídeos e representam uma importante ferramenta para o isolamento e propagação de patógenos (PASSOS et al., 2012).

O primeiro estabelecimento de cultura de células embrionárias foi do carrapato *Hyalomma asiaticum*, realizado por Shatkin et al. (1977). No ano seguinte Pudney et al. (1973) estabeleceram o segundo cultivo com ovos de *Rhipicephalus microplus*. Foram observados por esses autores as formas celulares fibroblastóides e epitelióides após semanas de cultivos.

A maioria das células de carrapato em cultivo cresce rapidamente em três dimensões, geralmente não se aderem fortemente, podem sobreviver por longos anos com mudanças regulares do meio de cultivo e com realização de subculturas (BELL-SAKYI et al., 2007). O meio mais utilizado para cultivo *in vitro* de células de diversas espécies de ixodídeos é o *Leibovitz's* L-15 suplementado com soro fetal bovino e caldo de triptose fosfato. Em 1985, o meio L-15 foi modificado pela adição de minerais, vitaminas, aminoácidos, ácido 2-cetoglutarico e glicose formando o *Leibovitz's* L-15B (MUNDERLOH et al., 1994). Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo de células de carrapato, foi estabelecida a primeira linhagem através de tecidos de carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* (VARMA et al., 1975).

A maioria das linhagens celulares de carrapatos existentes foi estabelecida de células embrionárias, usando metodologias simples e sem selecionar tipos celulares específicos. O cultivo celular de carrapatos é uma importante ferramenta para estudar a interação entre células desses artrópodes e patógenos transmitidos por eles, pois poderá ajudar a

definir a natureza complexa da relação hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007). A elucidação da importância de mecanismos de propagação de patógenos serve de base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e medidas eficazes de prevenção.

## CAPÍTULO I

### **ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) ORIUNDO DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

## RESUMO

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são microrganismos unicelulares e flagelados que pertencem à família *Trypanosomatidae*. O presente estudo descreve pela primeira vez o encontro de um isolado do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente *Rhipicephalus microplus* caracterizada através de análises moleculares, morfométricas e biológicas. A cultura de *Trypanosoma* foi obtida através do isolamento, em linhagem celular de IDE8, a partir da hemolinfa de carrapatos da espécie *R. microplus* naturalmente infectados. A cultura foi mantida meio de cultivo L15B, incubada em estufa bacteriológica a 30°C. O isolado denominado de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. cepa P1RJ teve um bom rendimento de propagação em meio L15B nas temperaturas de 30°C, 32°C e 34°C. A cultura permaneceu estável com mais de 14 passagens de propagação em cultura axênica com meio L15B à temperatura de 30°C. A criopreservação da cultura do isolado apresentou viabilidade após descongelamento pelo armazenamento em nitrogênio líquido. Foi realizada a curva de crescimento e análise das formas evolutivas do isolado em meio axênico e nas linhagens celulares IDE8 e DH82. A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sa rDNA* comprovaram a autenticidade dessa nova espécie. As sequências nucleotídicas descritas foram depositadas no *Genbank*. A microscopia eletrônica de varredura e análise morfométrica revelaram ampla diversidade morfológica da espécie descrita. A citometria de fluxo associada à microscopia de fluorescência comprovou a internalização do isolado de *Trypanosomatídeo* isolado em células das linhagens IDE8 e DH82 mesmo com a inibição da fagocitose celular. Aspectos relacionados à patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo e mecanismos de transmissão ainda são desconhecidos. Portanto, serão necessários mais estudos para o conhecimento de aspectos do ciclo biológico de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov.

**Palavras chaves:** *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov., carrapato, propagação *in vitro*.

## ABSTRACT

Parasites of the genus *Trypanosoma* are unicellular and flagellated microorganisms from the *Trypanosomatidae* family. This study describes for the first time the encounter of an isolate of the *Trypanosoma* genus naturally infecting *Rhipicephalus. microplus* characterized through molecular, morphological and biological analyzes. *Trypanosoma* cultures were obtained by isolation in IDE8 cell lines from a hemolymph of the *R. microplus* species ticks infected and maintained naturally in L15B culture environment, incubated at 30°C. The isolate from *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. strain P1RJ had a good yield spread in an L15B environment at temperatures of 30°C, 32°C and 34°C. The culture remained stable over 14 spread passages in axenic culture in L15B environment at a temperature of 30°C. Cryopreservation of the isolated culture presented viability after thawing due to liquid nitrogen storage. The growth curve and analysis of the evolutionary forms of the isolates in the axenic environment and the cell lines IDE8 and DH82 were performed. The analysis of the nucleotide sequences obtained with targets directed to the *18S rDNA* and *24Sα rDNA* region confirmed the authenticity of this new species. The described nucleotide sequences were deposited to *Genbank*. Scanning electron microscopy and morphometric analysis revealed a wide morphological diversity of the two described species. Flow cytometry associated with fluorescence microscopy confirmed the internalization of both Trypanosomatid isolates in cells from the IDE8 and DH82 lines even with the inhibition of cellular phagocytosis. Pathogenicity-related aspects, involvement in vertebrate hosts, epidemiology, evolutionary cycle and transmission mechanisms are still unknown. Therefore, more studies will be necessary for the knowledge of life cycle aspects of *T. rhipicephalis*.

**Keywords:** *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov., tick, *in vitro* propagation.

# 1 INTRODUÇÃO

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são microrganismos unicelulares e flagelados que pertencem à família *Trypanosomatidae*. Dentre as diferentes espécies existentes na natureza, *Trypanosoma cruzi* é sem dúvida a que apresenta maior importância em saúde pública, sendo o agente etiológico da doença de Chagas, zoonose transmitida por triatomíneos no continente americano (PEREIRA & NAVARRO, 2013). *Trypanosoma rangeli* é outra espécie que circula entre os animais e seres humanos, sendo também transmitida por triatomíneos (SILVA et al., 2004). No Brasil, existe ainda espécies transmitidas mecanicamente pela picada de moscas hematófagas aos animais, como é o caso de *Trypanosoma vivax* para os bovinos (OSÓRIO et al., 2008) e *Trypanosoma evansi* para os equinos, camelos, bovinos, bubalinos, suínos, caninos, elefantes e outras espécies animais em áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre, causando doenças que levam a perdas econômicas, inclusive causando a morte dos animais (HERRERA et al., 2004).

Embora a maioria das espécies de *Trypanosoma* seja transmitida por insetos hematófagos, os carrapatos parecem ser também prováveis vetores de algumas espécies desse gênero (MORZARIA et al., 1986; THEKISOE et al., 2007). No Brasil, é frequentemente encontrado parasitando hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* um tripanosomatídeo com as características morfológicas semelhantes à *Trypanosoma theileri*, uma espécie descrita como não patogênica aos bovinos e que usualmente é transmitida por tabanídeos (MARTINS et al., 2008).

O presente estudo descreve pela primeira vez o encontro de um isolado do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente *R. microplus* caracterizada através de análises moleculares, morfométricas, citometria de fluxo, análise das formas evolutivas, curva de crescimento, em condições axênicas e celulares, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de execução das análises laboratoriais

O isolamento e a manutenção em cultivo de *Trypanosoma* sp. foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ. As análises morfológicas e moleculares da espécie foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. A microscopia de fluorescência foi realizada no Laboratório de Microbiologia Celular, Pavilhão Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. A citometria de fluxo foi realizada na Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica, Pavilhão Cardoso Fonte da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, no Pavilhão Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### 2.2. Procedência das linhagens de células utilizadas no estudo

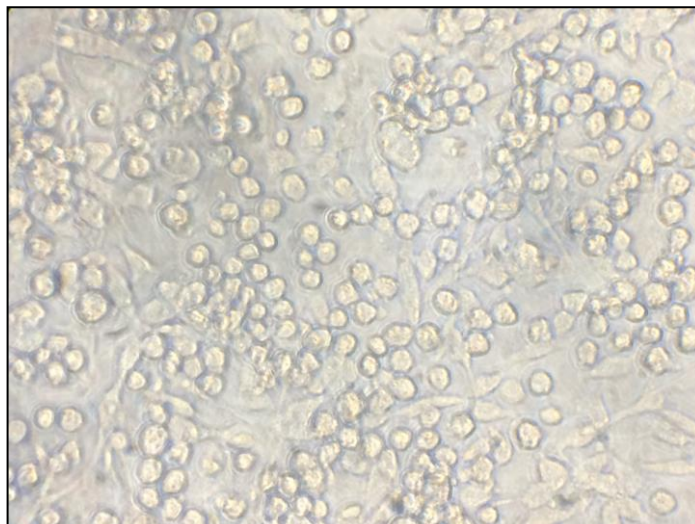
A linhagem de célula embrionária do carrapato *Ixodes scapularis* IDE8 (MUNDERLOH et al., 1994) utilizada no presente estudo foi procedente do “The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, BIOBANK” – <http://tickcells.roslin.ac.uk/>. Esta linhagem foi oficialmente introduzida no Brasil por doação pela Dra. Lesley Bell Sakyi.

A segunda linhagem utilizada no estudo foi a linhagem de macrófago DH82 obtida de um caso de histiocitoma foi procedente do Laboratório de Doença Parasitárias da UFRRJ.

### 2.3. Manutenção e cultivo da linhagem de células IDE8

As células foram mantidas em situação de rotina no LDP com meio *Leibovitz's* L-15B (Sigma®), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), 10% de caldo de triptose fosfatada (Sigma®), 0,1% de lipoproteína bovina concentrada (MP Biomedicals®), 1% de L-Glutamina (200 mM) (Sigma®) e 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL) (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 6,6 - 6,8 e posteriormente esterilizado em filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm.

A linhagem foi mantida em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> em estufa bacteriológica a 30°C. As culturas foram monitoradas com auxílio de um microscópio de contraste de fase invertido. Os repiques foram feitos após a formação de monocamada confluenta de células (Figura 3) na superfície do frasco de cultura. As renovações do meio de cultura foram realizadas semanalmente com a substituição de aproximadamente 2/3 do meio.



**Figura 3.** Monocamada de células da linhagem IDE8, microscopia de contraste de fase invertida, objetiva de 40X.

#### **2.4. Origem dos carrapatos *Rhipicephalus microplus***

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas de infestação natural em bovinos oriundos da bovinocultura, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ.

#### **2.5. Esterilização dos carrapatos**

Dentro do fluxo, o *pool* de carrapatos vivos foi transferido para um Becker pequeno e em seguida submersos por álcool 70% por um minuto. Após a remoção do álcool 70% com auxílio de uma pipeta Pasteur os carrapatos foram submersos em solução de hipoclorito de sódio diluído em água ultrapura estéril (1:50) por 30 segundos. Em seguida, nova submersão em álcool 70% por 1 minuto. Na etapa seguinte foi adicionar detergente (Rioex®) até cobrir os carrapatos por 30 segundos. Após a retirada do detergente os carrapatos foram deixados submersos em álcool 70% durante um minuto. Foi adicionada solução de água ultrapura estéril com penicilina estreptomicina e anfotericina B ao *pool* de carrapatos e deixados submersos por um minuto. Em seguida, os carrapatos foram secos em gaze estéril e transferidos com auxílio de pinça estéril para placa de Petri estéril sendo acondicionados até o uso para o isolamento do *Trypanosoma*.

#### **2.6. Isolamento de *Trypanosoma***

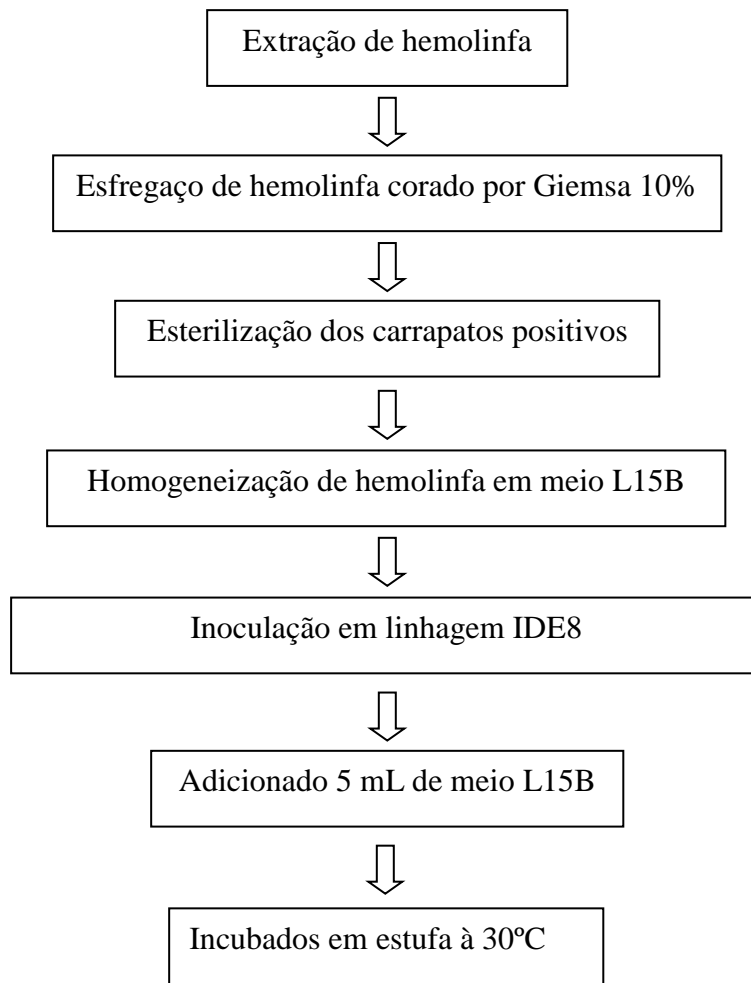
Os carrapatos coletados foram mantidos em estufa incubadora tipo BOD (demanda bioquímica oxigênio) no laboratório até o procedimento de isolamento dos parasitos. A hemolinfa foi obtida através da secção do primeiro par de patas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, em sua porção distal (Figura 4). Foi possível



observar o parasito no esfregaço a partir do 12º dia após início da postura. A presença do protozoário foi detectada em esfregaços de uma gota de hemolinfa corados em Giemsa a 10% (Figura 5). O esfregaço foi feito em 24 carrapatos, sendo positivos apenas 3 teleóginas, que posteriormente foram submetidas a esterilização em capela de fluxo laminar, dos carrapatos positivos e posterior inoculação de hemolinfa em meio de cultivo. Utilizou-se pipeta *Pasteur* contendo 0,5 mL de meio L15B para obter a hemolinfa e homogeneização com o meio de cultura e transferidos para um frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo uma monocamada homogênea da linhagem celular IDE8 (MUNDERLOH et al., 1994). Em seguida foi adicionado 5 mL de meio de cultura e mantidos em estufa a 30<sup>0</sup>C. O crescimento do microrganismo em cultura *in vitro* foi detectado com auxílio de esfregaços corados pelo método de Giemsa no 7º dia pós cultivo. A cultura foi acompanhada semanalmente com auxílio de exames citológicos. A troca de meio de cultura e repiques foram realizados semanalmente.



**Figura 4.** Foto ilustrativa da secção da pata anterior de um carrapato *Rhipicephalus microplus* para extração da hemolinfa.



**Figura 5.** Fluxograma dos procedimentos para isolamento do Tripanosomatídeo oriundo de *R. microplus*.

## 2.7. Purificação do isolado de *Trypanosoma* sp.

Para a obtenção de cultura axênica o isolado foi ressuspenso por rinsagem para deslocamento do frasco e separação das células e transferida para um Falcon estéril de 15 mL para a centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo Falcon estéril de 15 mL e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 8 mL de PBS (*phosphate buffered saline*). Após uma nova centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos o *pellet* formado por *Trypanosoma* foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultivo L15B e transferido para frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> e incubado a 30 °C em estufa.

## 2.8. Criopreservação do isolado

Após a estabilização do cultivo os isolados foram congelados em DMSO a 10% como criopreservante. Para o congelamento, o isolado foi ressuspenso e transferido para

uma Falcon estéril de 15 mL e centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de meio de cultura L15B. Foi acrescentado gota a gota 2 mL da solução gelada de 1,6 mL de meio de cultura com 400 µL de DMSO filtrado, homogeneizado lentamente, para a obtenção de um congelamento lento. A solução foi transferida para 4 criotubos com 1 mL em cada. Os criotubos foram identificados e colocados em Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing container, com isopropanol 100% no fundo e levado ao freezer – 80 °C por no mínimo 90 minutos, para que alcance a temperatura de – 80 °C na proporção de -1 °C/minuto. Posteriormente os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido (-196 °C).

## **2.9. Descongelamento dos isolados**

Os criotubos contendo os isolados criopreservados em DMSO a 10% foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho maria a 32 °C. Em fluxo laminar foram inoculados em frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> com meio L15B e incubados a 30 °C.

## **2.10. Manutenção e monitoramento dos cultivos de *Trypanosoma***

As culturas de *Trypanosoma* foram mantidas em linhagens celulares de IDE8 e culturas axênicas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, com meio de cultivo L15B e incubadas em estufas bacteriológicas a 30 °C.

As culturas foram monitoradas com auxílio de um microscópio de contraste de fase invertido e exames citológicos por esfregaço de gota do sobrenadante da cultura coradas pelo método de Giemsa 10%. Os repiques foram feitos após a formação de monocamada confluyente de células na superfície do frasco de cultura. Repiques do cultivo em 1:10 e as renovações do meio de cultura foram realizadas semanalmente, com a substituição de aproximadamente 2/3 do meio.

## **2.11. Propagação em diferentes temperaturas e meios de cultivo celular**

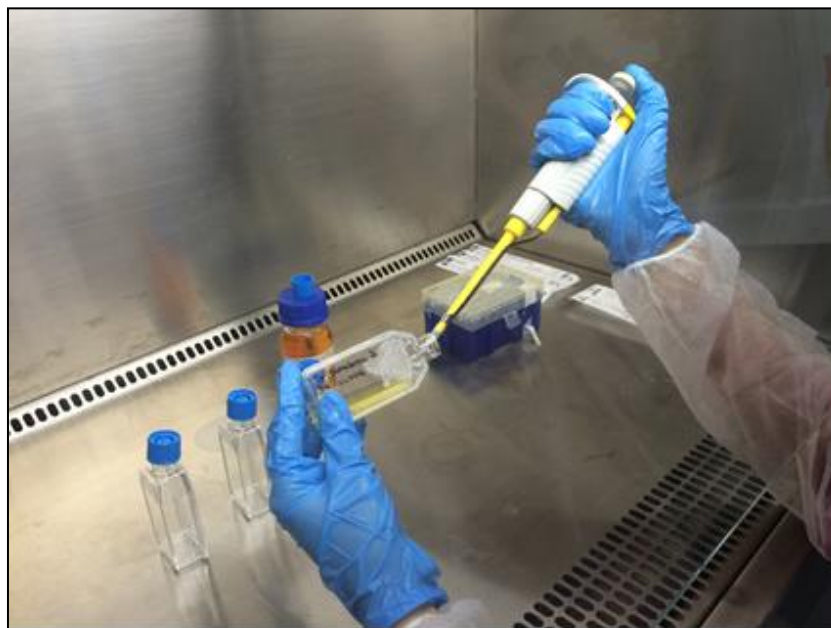
Foi também testada a propagação dos isolados nos seguintes meios de cultura: MEM, DMEM, M199, BHI, BHI suplementado com ágar sangue e *Schneider's insect Medium*. Os isolados foram submetidos as seguintes temperaturas de incubação: 26 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C e 37 °C.

## **2.12. Análise do crescimento e das formas evolutivas em cultura axênica**

Foi avaliado o perfil de crescimento do isolado a partir de cultura jovem, com 4 dias após repique e elevado percentual das formas epimastigotas típicas. Foram contadas em câmara de Neubauer para a determinação da concentração dos parasitos e cálculo do inóculo inicial na concentração de 1 x 10<sup>4</sup> parasitos/mL e posterior transferência para culturas axênicas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com meio de

cultivo L15B (Figura 6). A curva de crescimento foi realizada a 30°C em triplicata. Alíquotas de 10 µL eram coletadas em um intervalo de 48 horas até o 30º dia pós inoculação (DPI) para a quantificação em triplicata através da média dos quatro quadrantes das extremidades da câmara de Neubauer, multiplicada pelo fator de diluição (1:10) e pelo fator da câmara e análise da forma evolutiva através de esfregaço corado pelo método de Giemsa a 10% e preparados por *pools* destas triplicatas.

A análise das formas evolutivas foi realizada através da confecção de esfregaços corados pelo método de Giemsa a 10% de cada dia de avaliação da cinética de acompanhamento com a avaliação de 50 a 100 formas evolutivas.



**Figura 6.** Foto ilustrativa mostrando o inóculo de cultivo axênico para a cinética de acompanhamento, a partir do dia 0.

### 2.13. Análise morfométrica

A morfometria foi realizada em 40 parasitos de cada forma evolutiva, selecionadas aleatoriamente, através do *software Cell D´* no Laboratório de Bioimagem Multiusuário do CPGCV/UFRRJ. As medições foram realizadas de acordo com Hoare (1972), avaliando-se o comprimento total do parasito (da extremidade anterior a posterior), comprimento do flagelo livre, diâmetro do núcleo, diâmetro do cinetoplasto, a distância da extremidade posterior a metade do diâmetro do núcleo (posterior - núcleo), a distância da extremidade posterior a metade do diâmetro do cinetoplasto (posterior - cinetoplasto), distância da metade do diâmetro do núcleo a metade do diâmetro do cinetoplasto (núcleo - cinetoplasto), distância da metade do diâmetro do núcleo a extremidade anterior (núcleo -anterior). Análise estatística foi descritiva realizada através do *software GraphPad Prism 5.0*.

## **2.14. Manutenção e cultivo da linhagem de Células DH82**

As células foram mantidas em situação de rotina no LDP com meio Eagle Modificado por Dulbecco DMEM (Sigma®), suplementado com 15% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), 1% de L-Glutamina (200 mM) (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 6,6 - 6,8 e posteriormente esterilizado em filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm.

As linhagens foram mantidas em frascos de cultura com filtro de 25 cm<sup>2</sup> em estufas bacteriológicas a 37°C e suplementadas com CO<sub>2</sub> a 5%. As culturas foram monitoradas com auxílio de um microscópio Nikon Japan Diaphot de contraste de fase invertido. Os repiques foram feitos a cada quatro dias após a formação de monocamada confluyente de células na superfície do frasco de cultura.

## **2.15. Análise do perfil de crescimento em cultivo celular**

Para a realização desta etapa foram utilizadas culturas de *Trypanosoma* mantidas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, com meio de cultivo L15B e incubadas em estufas bacteriológicas a 30°C. Foi utilizada a linhagem de célula embrionária IDE8 do carrapato *Ixodes scapularis* (MUNDERLOH et al., 1994).

Foram feitas avaliações das diferenciações das formas evolutivas de *Trypanosoma* do sobrenadante de um co-cultivo e a avaliação do potencial infeccioso das diferentes formas evolutivas. Para a avaliação do sobrenadante em co-cultivo foram utilizadas em triplicatas, culturas de células da linhagem IDE8 mantidas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com camada confluyente de células. Um inóculo na concentração de 1 x 10<sup>4</sup> parasitos/mL de um cultivo axênico foi realizado na linhagem celular e incubado a 30 °C.

Em intervalos de aproximadamente 48 horas em um período de 30 dias alíquotas do sobrenadante das culturas celulares foram quantificadas em triplicata em câmara de Neubauer e avaliada a diferenciação das formas evolutivas através de esfregaços confeccionados a partir de um *pool* destas triplicatas corados pelo método de Gimesa a 10%, observadas através de microscopia ótica, aumento de 100x com imersão. Foram avaliadas as diferentes formas evolutivas epimastigotas menos afiladas e com flagelo pequeno, epimastigota típica, tripomastigotas e esferomastigotas. A morfometria foi realizada do comprimento total do parasito (da extremidade anterior a posterior), comprimento do flagelo livre das formas epimastigotas, selecionadas aleatoriamente. Adicionado a medição do cinetoplasto dividindo a distância a partir da extremidade posterior para os núcleos pela distância a partir do cinetoplasto para os núcleos. As fotomicrografias foram obtidas através do *software* Motic Image Pls 2.0.

## **2.16. Análises moleculares**

### **2.16.1. Extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR)**

Amostras da cultura foram submetidas à extração do DNA usando o kit Qiagen® Qiamp seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA

foram analisadas através de espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®).

A caracterização molecular dos isolados foi realizada com a amplificação de um fragmento do gene *18S rDNA* (SMITH et al. 2008) através de Nested PCR, utilizando os *primers* externos TRY927F (5'-GAAACAAGAAACACGGGAG-3') e TRY927R (5'-CTACTGGGCAGCTTGGA-3') que amplificam um fragmento esperado de aproximadamente 900 pb. Os *primers* internos usados foram SSU561F (5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3') e SSU561R (5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3') amplificando um fragmento de aproximadamente 700 pb. A reação ocorreu usando a concentração de 1,6 pmol dos *primers*, 2 mM de dNTP, 1,4U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1X e 2 µL de DNA extraído, obtendo-se um volume final de 25 µL.

O outro gene utilizado para a avaliação molecular foi o gene *24Sα rDNA* (SOUTO et al. 1999), utilizando os *primers* D75 (5'-GCAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') e D76 (5'-GGTTCTCTGTTGCCCTTTT-3') amplificando um fragmento de aproximadamente 300 pb. A reação ocorreu usando a concentração de 10 pmol dos *primers*, 2,5 mM de dNTP, 1,4 U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1x e 1µL de DNA extraído, obtendo-se um volume final de 25 µL.

A ciclagem de PCR foi realizada em termociclador Applied Biosystems® utilizando o seguinte protocolo para a primeira e segunda reação como alvo o gene *18S rDNA*: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, seguido por 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por um minuto e 15 segundos e extensão final a 72°C por cinco minutos. E para o gene *24Sα rDNA* de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguido por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos, e extensão final a 72°C por dez minutos.

Eletroforese em gel de agarose a 2% corrida a 90 W por 30 minutos. O gel foi corado por brometo de etídeo e visualizado no transiluminador com luz UV seguido da foto documentação.

### **2.16.2. Sequenciamento e análise filogenética dos genes 18S rDNA e 24Sα rDNA**

O produto da PCR foi purificado pelo Kit QIAquick® PCR Purification Kit seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, o DNA foi sequenciado, utilizando uma concentração de *primer* a 3,2 pmoles, em plataforma capilar pelo método de Sanger no equipamento ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies®) e comparado utilizando a ferramenta Nucleotide BLAST.

As análises filogenéticas com alvo molecular para os genes *18S rDNA* e *24Sα rDNA* foram realizadas através do programa Mega 6, utilizando o teste Maximum Likelihood e o modelo de Tamura-Nei e Kimura-2.

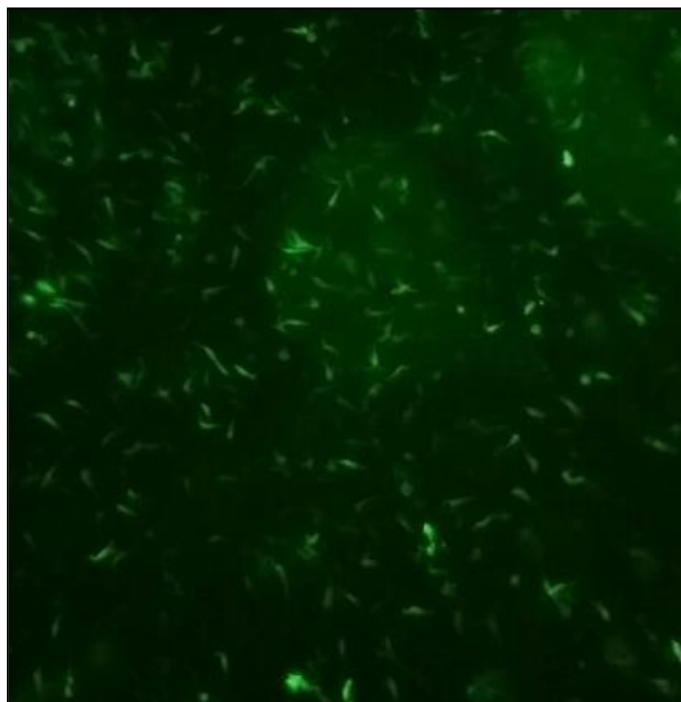
### **2.17. Internalização de *Trypanosomas* em linhagens celulares IDE8 e DH82**

Frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> com cada uma das duas linhagens celulares em estado de confluência foram submetidos à rinsagem para descolamento do frasco e

separação das células. As amostras foram contadas em câmara de Neubauer para determinação da concentração das células e posterior transferência para placas de cultura. As duas linhagens celulares foram semeadas em duas placas de cultura de 24 poços a uma concentração de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/mL em meio L15B com um volume de 500 $\mu$ L da solução de células por poço. As placas com as linhagens IDE8 e DH82 foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C e a 37 °C suplementada a 5% de CO<sub>2</sub>, respectivamente. Foi preparada uma placa de 24 poços extra com todas as linhagens sob a mesma concentração para servir de controle não infectado.

O isolado foi submetido a um marcador fluorescente de membrana (PKH67 Green- Sigma®), um corante de cor verde que se liga às regiões lipídicas da membrana celular (Figura 7). O protocolo foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Para a coloração *Trypanosoma* sp. mantidos em cultivo no meio L15B foram contadas em câmara de *Neubauer* para determinação de suas concentrações. Em uma capela de fluxo laminar, transferiu-se 1mL de cada espécie de *Trypanosoma* à concentração de aproximadamente  $2 \times 10^7$  parasitos/mL para tubos estéreis de 1,5 mL do tipo Eppendorf®, que foram centrifugados por 6000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, retirou-se os sobrenadantes e os pellets foram ressuspendidos em 1mL de solução salina balanceada de Hanks' (HBSS - Life Technologies®). Os tubos foram centrifugados à mesma rotação e pelo mesmo tempo e os sobrenadantes retirados. Em outro tubo, preparou-se a solução de 1 mL de diluente C + 4  $\mu$ L do corante PKH (componentes do kit PKH67). Foi adicionado 1mL desta solução a 1mL da solução de *Trypanosoma* e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo homogeneizado a cada 1 minuto. Após a incubação a solução foi transferida para um Falcon e interrompeu-se a coloração com a adição de 2 mL de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®) e incubado por um minuto à temperatura ambiente. Novamente o material foi centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspenso em 10 mL de HBSS e centrifugado por 5 minutos. Após repetido este procedimento de lavagem por mais duas vezes o pellet foi ressuspenso em meio L15B.



**Figura 7.** *Trypanosoma* sp. corados com o fluoróforo PKH67 verde. Microscopia de fluorescência, aumento de 400x.

Para inoculação de *Trypanosoma* nas linhagens de células IDE8 e DH82, os meios de cultivo das células foram retirados dos poços e as células de um poço controle de cada linhagem foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo próprio para contagem em câmara de Neubauer. No momento em que as linhagens estavam sob concentração de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/mL, foram colocados 1mL de meio próprio para cada linhagem celular.

Foram inoculados 25  $\mu$ L de solução de *Trypanosoma* marcado com PKH67 verde em cada um dos poços, totalizando aproximadamente  $2 \times 10^7$  parasitos/poço. O volume final de cada poço foi de 1 mL. As placas com as linhagens IDE8 e DH82 foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e a 37°C suplementada a 5% de CO<sub>2</sub>, respectivamente, ao abrigo da luz.

Após 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas de inoculação nas células, os meios de cultivo foram retirados dos poços por aspiração suave e os poços foram lavados gentilmente duas vezes com HBSS para retirada de *Trypanosoma* livres (Figura 8). Depois desse procedimento, as células foram ressuspensas gentilmente por rinsagem com 1 mL de HBSS/poço e colocadas em tubos Eppendorf® de 1,5 mL para centrifugação por 6000 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado, os pellets foram ressuspensos em 300  $\mu$ L de solução de paraformoldeído de 1%. Os tubos foram acondicionados sob refrigeração a 4°C, ao abrigo da luz. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de células que serviram de controle não infectado.

O aparelho utilizado para a leitura da citometria de fluxo foi o FACSCalibur - Becton & Dickinson®, no canal FL1-H, com leitura de 10.000 eventos, na Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica, Pavilhão Cardoso Fonte da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. E a análise dos resultados foi feita no *software Cellquest*. O índice de associação foi expresso como o percental de células fluorescentes.

## **2.18. Avaliação de fagocitose de *Trypanosoma* em linhagens celulares IDE8 e DH82**

Foram usadas  $2 \times 10^7$  parasitos/mL de uma cultura axênica com predominância de formas epimastigotas típicas para inóculo inicial em duas placas de cultivo 24 poços, com as linhagens celulares IDE8 e DH82 mantidas em meio L15 B e incubadas a 30°C e em meio DMEM incubadas 37°C suplementada a 5% de CO<sub>2</sub>, respectivamente, ao abrigo da luz.

Após a solubilização da citocalasina D de 100  $\mu$ g/mL em etanol, os poços receberam a solução de citocalasina D na diluição de 1  $\mu$ g/mL em meio de cultivo e foram incubados por 1 hora. Em seguida, os poços foram lavados com HBSS e inoculados os *Trypanosomas* corados por PKH67 em meio de cultivo. Após a inoculação de *Trypanosomas* a avaliação foi feita após 4 horas de incubação. As formas que não aderiram à monocamada celular foram removidas após duas lavagens com HBSS. As células foram ressuspensas gentilmente por rinsagem com 1mL de HBSS/poço e colocadas em tubos Eppendorf® de 1,5mL para centrifugação por 6000 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado, os pellets foram ressuspensos em 300  $\mu$ L de solução de paraformoldeído a 1%. Os tubos foram acondicionados sob refrigeração a 4°C, ao abrigo da luz. Formam analisadas amostras não infectadas e infectadas sem a citocalasina D que serviram de controles.



O aparelho utilizado para a leitura da citometria de fluxo foi o FACSCalibur - Becton & Dickinson®, no canal FL1-H (Figura 9) com leitura de 10.000 eventos, na Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica, Pavilhão Cardoso Fonte da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A análise dos resultados foi feita no *software Cellquest*. O índice de associação foi expresso como o percentual de células fluorescentes.

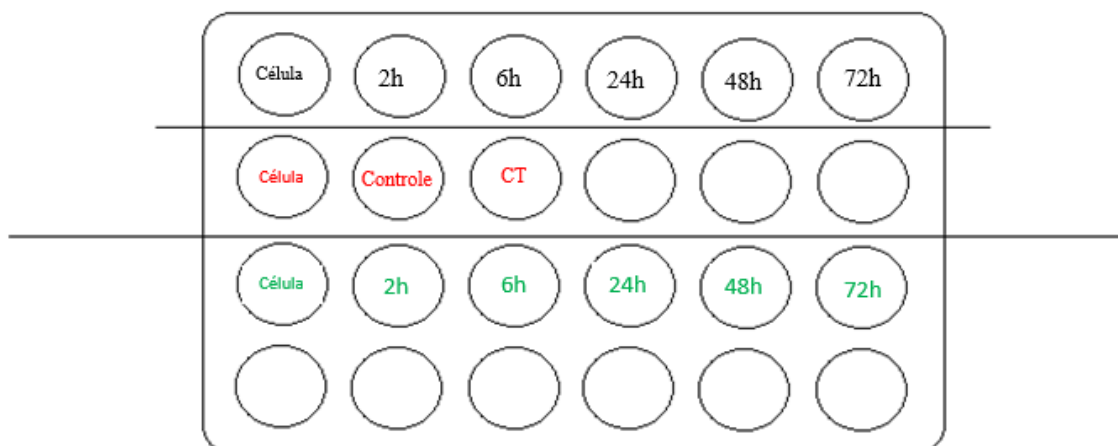
Uma das maiores preocupações nos ensaios de fagocitose foi distinguir parasitos realmente internalizados daqueles apenas ligados às células. Para isto, utilizou-se a microscopia de fluorescência para diferenciar a fixação da internalização.

## 2.19. Microscopia de fluorescência

Para visualização por microscopia de fluorescência, as linhagens de células IDE8 e DH82 foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços (Figura 8) contendo lamínulas de vidro estéreis e *Trypanosoma* foram marcados com o fluoróforo PKH67 verde (Sigma®). Utilizou-se o mesmo protocolo da citometria para marcação e para a inoculação destes nas linhagens de células. Após 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas de inoculação nas células, os meios de cultivo foram retirados dos poços por aspiração suave e os poços foram lavados gentilmente duas vezes com HBSS para retirada de *Trypanosoma* livres.

Depois desse procedimento, adicionou-se um volume de 500 µL de uma solução de paraformaldeído a 4% em cada poço para fixação do material durante 30 minutos. Decorrido este tempo, a solução de paraformaldeído foi retirada e os poços foram lavados gentilmente com HBSS. Foi utilizado o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para marcação do DNA nuclear das células numa concentração de 1:1000, onde foram adicionados 500 µL dessa solução em cada poço e incubados por cinco minutos em temperatura ambiente. A solução foi retirada e os poços lavados gentilmente com HBSS. As lamínulas foram mantidas dentro dos poços em 500µL de HBSS e as placas foram acondicionadas sob refrigeração a 4°C ao abrigo da luz.

Para a leitura, as lamínulas foram retiradas dos poços e sobrepostas com uma gota de Mountant Permafluor (Thermo scientific®) em lâminas de vidro para visualização no microscópio de fluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss®), no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - RJ.



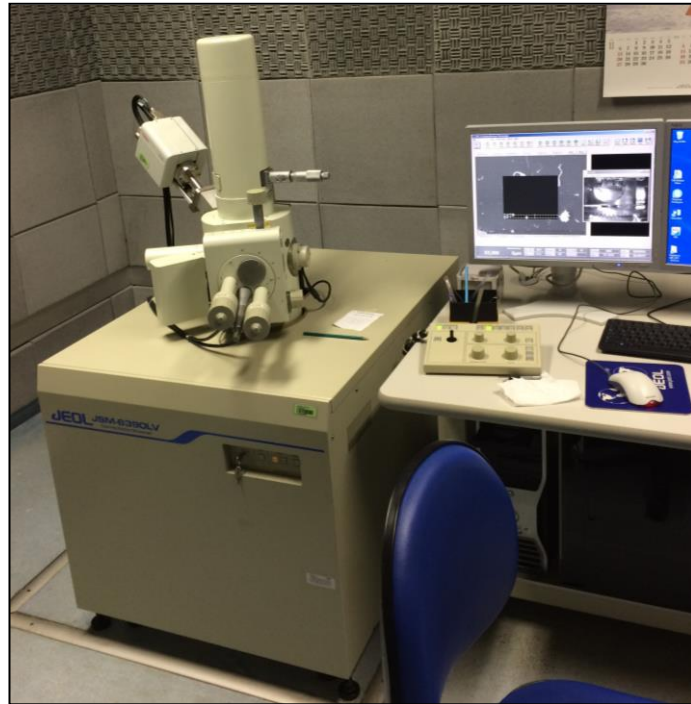
**Figura 8.** Delineamento experimental das placas de cultivo dos ensaios de internalização, fagocitose e microscopia de fluorescência. CT= citocalasina D



**Figura 9.** Aparelho de citometria FACSCalibur - Becton & Dickinson®, Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica, Pavilhão Cardoso Fonte da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

## **2.20. Microscopia eletrônica de varredura**

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada a partir de um cultivo axênico de quatro dias após o repique e na concentração de  $2 \times 10^7$  células/mL. Após lavagem em PBS, os parasitos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 40 min a 25°C. A pós-fixação foi realizada em solução tetróxido de ósmio a 1% contendo 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5 mM de cloreto de cálcio por 20 min a 25°C, seguida pela etapa de desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 100% e 100%). Para microscopia eletrônica de varredura, após as etapas de fixação, pós-fixação e desidratação descritas acima, os parasitos foram aderidos em lamínulas recobertas com poli-*L*-lisina, secos em ponto crítico com CO<sub>2</sub>, metalizados com ouro (20 nm) e examinada no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV (Figura 10) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, no Pavilhão Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

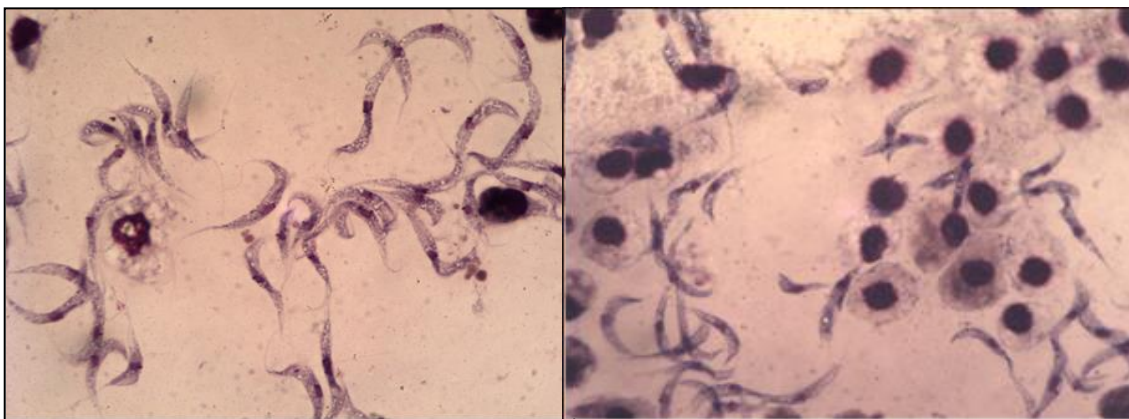


**Figura 10.** Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, no Pavilhão Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento

Dentre as 24 teleóginas de *R. microplus* avaliadas foi possível observar formas epimastigotas de *Trypanosoma* na hemolinfa de três espécimes (Figura 11). Após o inóculo em monocamada de cultura de célula IDE8 o aparecimento das formas típicas de *Trypanosoma* se deu a partir do 7º DPI.



**Figura 11.** Fotomicrografias de esfregaços de hemolinfa. Visualização de formas epimastigotas do Tripanosomatídeo e hemócitos de *Rhipicephalus microplus* corado por Giemsa, objetiva de 100X.

As culturas permaneceram estáveis com mais de 14 passagens de propagação em cultura axênica com meio L15B à temperatura de 30 °C. A criopreservação do isolado apresentou viabilidade após descongelamento pelo armazenamento em nitrogênio líquido.

#### 3.2. Incubação em diferentes temperaturas e meios de cultivo

Não foi possível a propagação do isolado nos seguintes meios de cultura: MEM, DMEM, M199, BHI, BHI suplementado com ágar sangue, *Schneider's insect Medium*. Parasitos letárgicos foram observados a partir do segundo dia de cultivo e 100% de formas degeneradas foram visualizadas a partir do quarto DPI.

O isolado não apresentou viabilidade de propagação em cultivo axênico quando submetidos as temperaturas de 26°C, 28°C e 37°C. Parasitos letárgicos a partir do segundo dia de cultivo e 100% de formas degeneradas foram visualizadas a partir do quarto DPI. Já a incubação a 30°C, 32°C e 34°C demonstrou viabilidade de propagação com formas evolutivas apresentando boa motilidade e crescimento.

### **3.3. Análise morfométrica do Tripanosomatídeo isolado de *Rhipicephalus microplus***

Foram observadas variações morfométricas entre as diferentes formas evolutivas. As medidas biométricas das formas evolutivas epimastigotas foram apresentadas na Tabela 1 e das formas tripomastigotas foram descritas na Tabela 2. As formas epimastigotas apresentaram maior média de comprimento do corpo (32,44  $\mu\text{m}$ ) e a formas esferomastigotas, a menor média de comprimento total do corpo (16,13  $\mu\text{m}$ ). O comprimento do flagelo nas formas tripomastigota (5,72  $\mu\text{m}$ ) apresentou o valor médio menor quando comparada com a forma esferomastigota 11,66  $\mu\text{m}$  (Tabela 3) e epimastigota (6,90  $\mu\text{m}$ ). O comprimento do flagelo na forma tripomastigota de *Trypanosoma* sp. apresentou menor valor médio (5,72  $\mu\text{m}$ ) comparado os valores de referência de diferentes espécies de *Trypanosoma* descritos na Tabela 4.

**Tabela 1.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas epimastigotas do Tripanosomatídeo isolado de *Rhipicephalus microplus*.

	Comprimento Total	Posterior - cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo - anterior	Flagelo livre	Posterior - núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	32,44	13,29	1,74	13,34	6,90	11,90	1,90	1,21
Valor máximo	43,68	18,17	11,12	23,39	12,50	16,59	2,99	2,19
Valor mínimo	21,21	4,83	0,62	8,38	2,23	4,71	0,93	0,50
Desvio padrão	4,13	2,57	1,60	2,97	2,67	2,17	0,43	0,36

**Tabela 2.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas tripomastigotas do Tripanosomatídeo isolado de *Rhipicephalus microplus*.

	Comprimento Total	Posterior - cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo - anterior	Flagelo livre	Posterior - núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	29,34	11,06	2,02	11,80	5,72	11,62	1,81	1,02
Valor máximo	45,89	23,90	5,27	20,32	12,08	23,14	2,45	1,70
Valor mínimo	19,87	3,72	0,93	6,21	1,74	3,02	0,99	0,37
Desvio padrão	5,37	3,94	1,77	2,97	2,47	3,55	0,35	2,29

**Tabela 3.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas esferomastigotas do Tripanosomatídeo isolado de *Rhipicephalus microplus*.

	Comprimento Total	Posterior - cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo - anterior	Flagelo livre	Posterior-núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	16,13	2,39	1,71	2,81	11,66	2,16	2,07	1,06
Valor máximo	28,67	5,67	2,83	8,12	24,25	4,48	4,30	1,82
Valor mínimo	6,99	0,65	0,56	1,57	3,57	0,86	0,93	0,54
Desvio padrão	0,50	1,22	0,60	1,33	5,25	0,97	0,77	0,31

**Tabela 4:** Dados morfométricos ( $\mu\text{m}$ ) das formas evolutivas tripomastigotas de diferentes *Trypanosoma*.

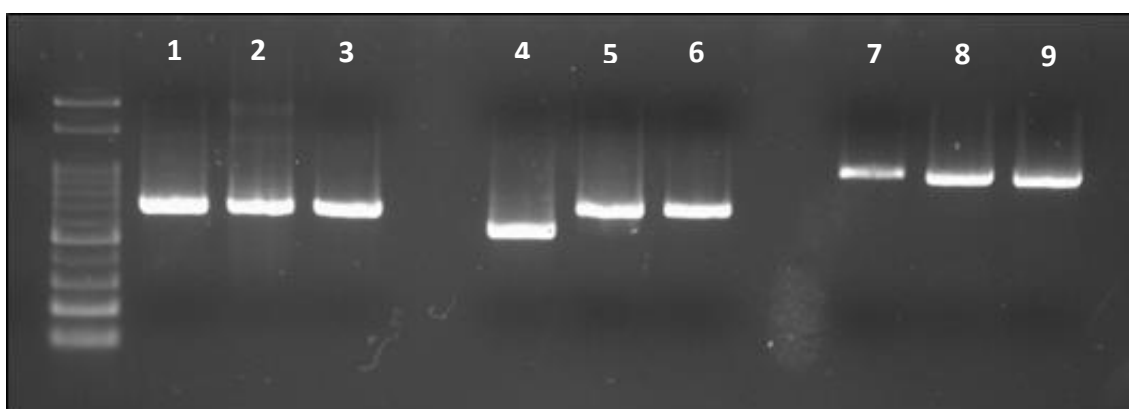
	CT	PC	CN	NA	FL	PN	PN/NA	N	Referência
<i>Trypanosoma vivax</i>	18.73 $\pm$ 3.80	1.02 $\pm$ 1.16	6.10 $\pm$ 1.29	5.40 $\pm$ 1.63	6.15 $\pm$ 2.38	7.18 $\pm$ 1.18	1.50 $\pm$ 0.52	ND	Ramirez et al. (1997)
<i>Trypanosoma evansi</i>	27.94 $\pm$ 2.63	1.46 $\pm$ 0.67	7.66 $\pm$ 0.76	7.30 $\pm$ 1.12	11.28 $\pm$ 1.68	9.50 $\pm$ 1.02	1.32 $\pm$ 0.18	2.55 $\pm$ 0.46	Elshafie et al. (2013)
<i>Trypanosoma theileri</i>	62.5 $\pm$ 5.7	ND	ND	ND	20.8 $\pm$ 4.7	ND	ND	ND	Wink (1979)
<i>Trypanosoma caninum</i>	43.0 $\pm$ 6.9 (29.5–52.4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Madeira et al. (2009)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	38.4 $\pm$ 6.7 (24.0–48.3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Madeira et al. (2009)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	19.0 $\pm$ 2.4 (14.4–22.2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Madeira et al. (2009)

CT: Comprimento total, PC: Posterior - cinetoplasto, CN: Cinetoplasto-núcleo, NA: Núcleo-anterior, PN: Posterior-núcleo, FL: Flagelo livre, (PN/NA) índice nuclear, N: Núcleo. Média  $\neq$  Desvio Padrão (valor mínimo – valor máximo).



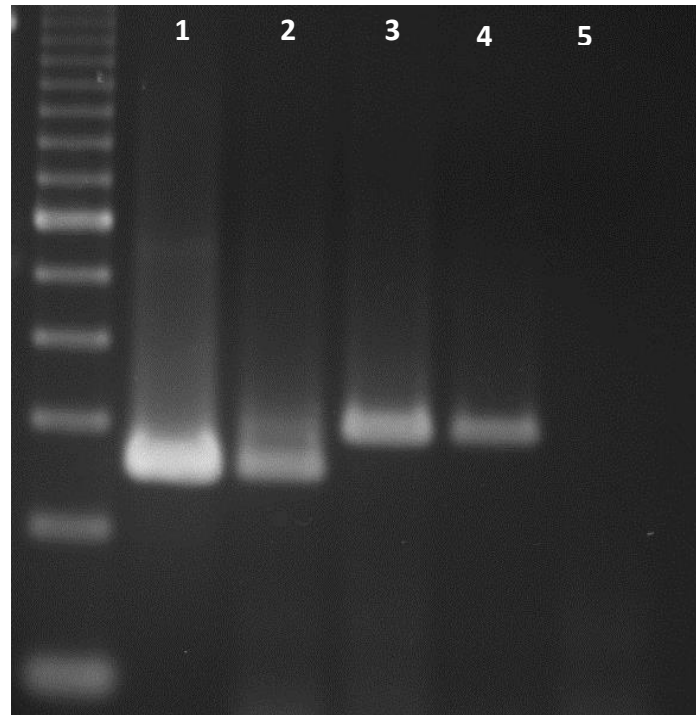
### 3.4. Análise molecular de Tripanosomatídeo isolado de *Rhipicephalus microplus*

A partir da PCR para os genes *18S rDNA* (Figura 12) e *24Sα rDNA* (Figura 13), obteve-se um fragmento de aproximadamente 658 pb e 262 pb, respectivamente. Após o sequenciamento, as sequências obtidas a partir dos genes acima foram analisadas a fim de determinar a similaridade com outras espécies no *Nucleotide Blast GenBank*. A sequência parcial do gene *18S rDNA* apresentou similaridade de 92% com *Trypanosoma KGI* (número de acesso AB281091) analisando 100% da query sequece. Apresentou também 99% de similaridade (com e-value 1e-111) que alinhou com 48% da sequência (query coverage 48%) de *Trypanosoma ralphi* (número de acesso KP768296), *Trypanosoma* sp. Cepa 1100 (número de acesso EU596260) e *Trypanosoma grayi* (número de acesso AJ005278).



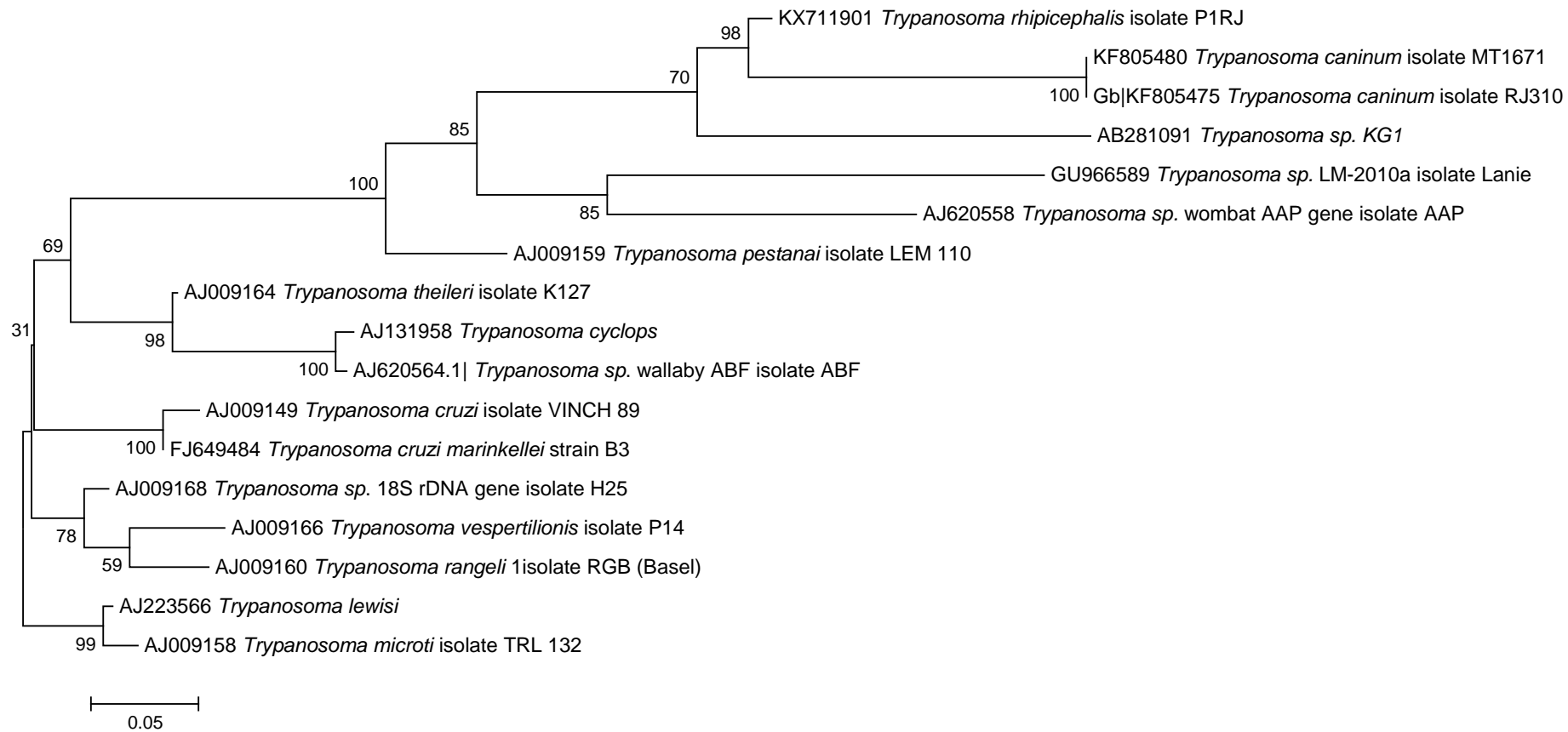
**Figura 12.** Gel de agarose a 2% apresentando amplificação de produtos gerados por Nested-PCR para o gene *18S rDNA*. Na primeira reação o tamanho do fragmento amplificado foi de 900 pb (1, 2) para os isolados de *Trypanosoma* (presente estudo) e *Trypanosoma* sp. (3). Na segunda reação o tamanho do fragmento amplificado foi de 700 pb (10,11) para os isolados de *Trypanosoma* (presente estudo) e *Trypanosoma* sp. (9). Controle negativo (4, 8). Controle positivo: *leishmania* sp. (5), *Trypanosoma caninum* (6, 7). Marcador de 100 pb (M).

Para o gene *24S rDNA* houve similaridade de (query coverage 62%) 96% com *Trypanosoma rangeli* cepa BL711 (número de acesso JN016743), 96% (query coverage 65%) com o isolado de *Trypanosoma grossi* AKHA (número de acesso AB175624) e 94% (query coverage 65%) com o isolado de *Trypanosoma pestanaei* (número de acesso KR527480).

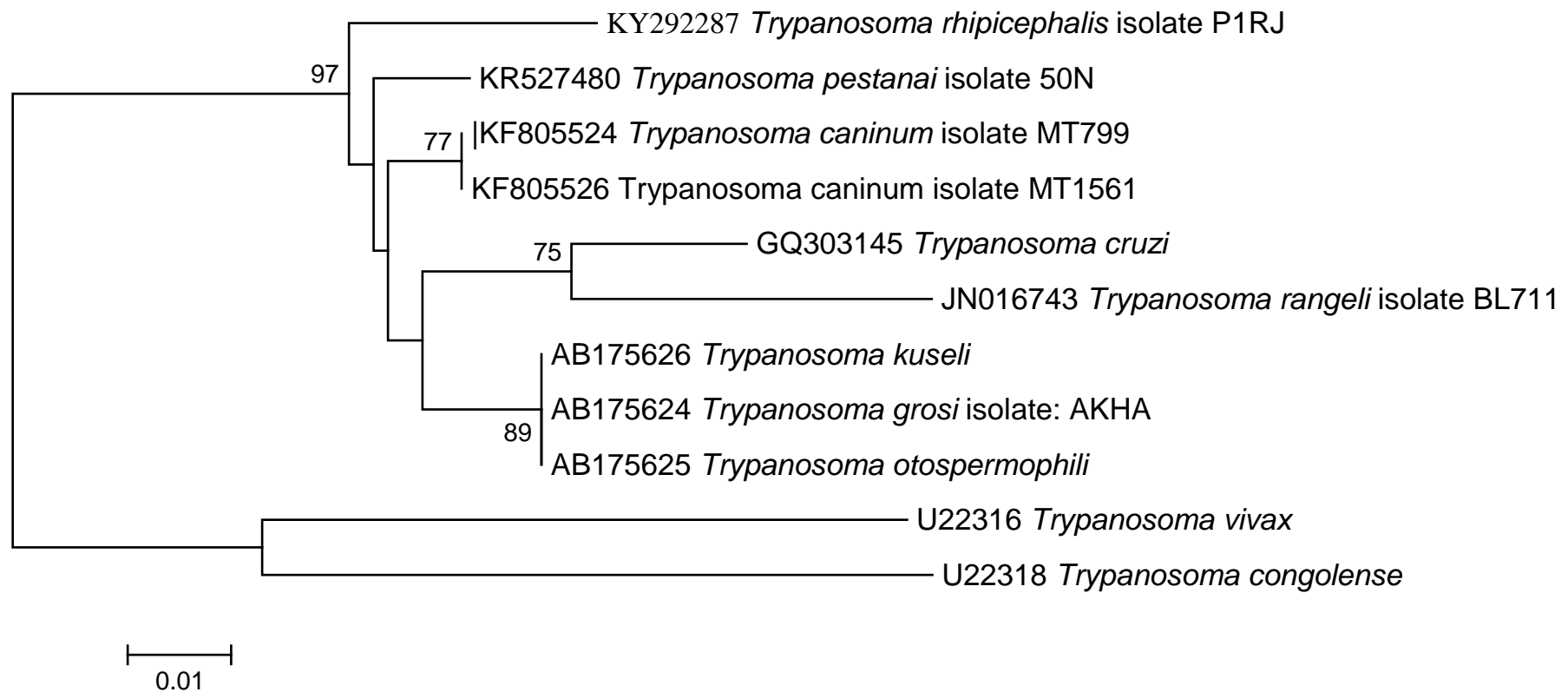


**Figura 13.** Gel de agarose a 2% apresentando amplificação de produtos gerados por PCR para o gene *24Sα rDNA*. Fragmentos de 270 pb amplificados (1) para os isolados de *Trypanosoma* sp. (presente estudo) e *Trypanosoma* sp. (2). Controle negativo (5). Controle positivo (3,4). Marcador de 100 pb.

Sequências do *GenBank* foram alinhadas com o *software* Mega e construído uma árvore filogenética. A análise molecular revelou clara separação da espécie de *Trypanosoma* estudada das outras espécies do gênero *Trypanosoma*, independente do alvo molecular utilizado, com valores de *Bootstrap* de 98 e 97 para árvores construídas com sequências dos alvos *18S rDNA* e *24Sα rDNA* respectivamente (Figuras 14 e 15). As sequências nucleotídicas descritas foram depositadas no *GenBank* sob número de acesso KX711901 e KY292287 e a espécie foi denominada de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. cepa P1RJ.



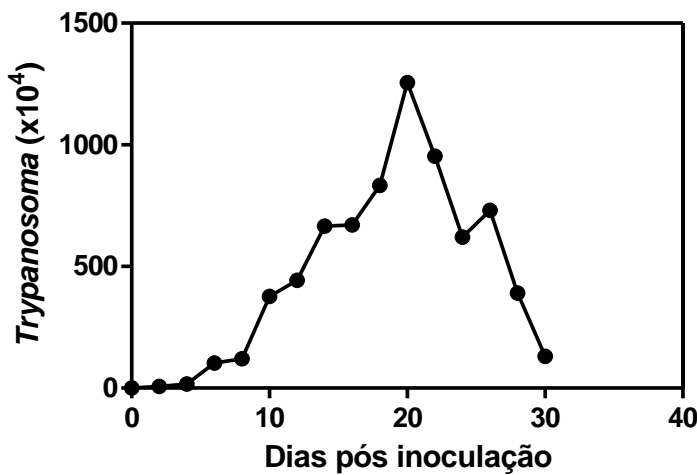
**Figura 14.** Árvore filogenética de *Trypanosoma rhipicephalis* baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood – Modelo Kimura 2-parameter. *Bootstrap*: 1000.



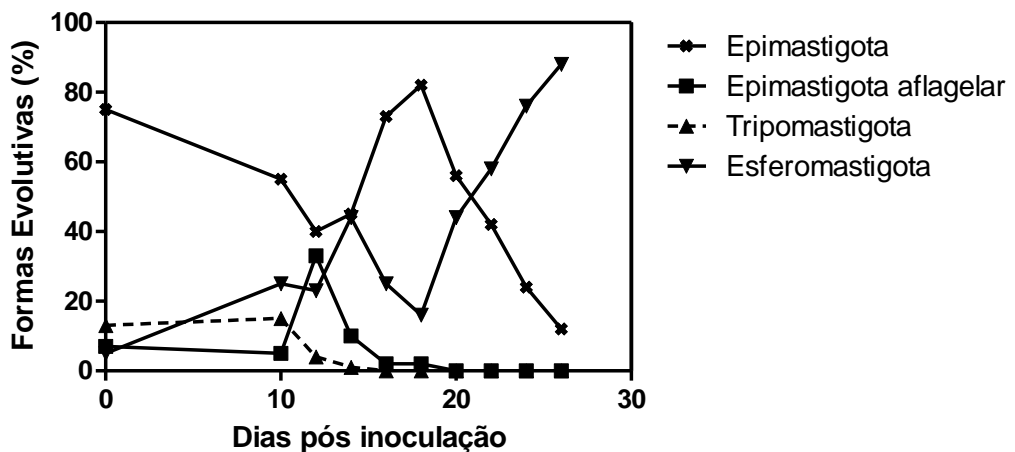
**Figura 15.** Árvore filogenética de *Trypanosoma rhipicephalis* baseada na análise das sequências de 24S rDNA. Método Neighbor-Joining e Tamura-N.

### 3.5. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo axênico de *Trypanosoma rhipicephalis*

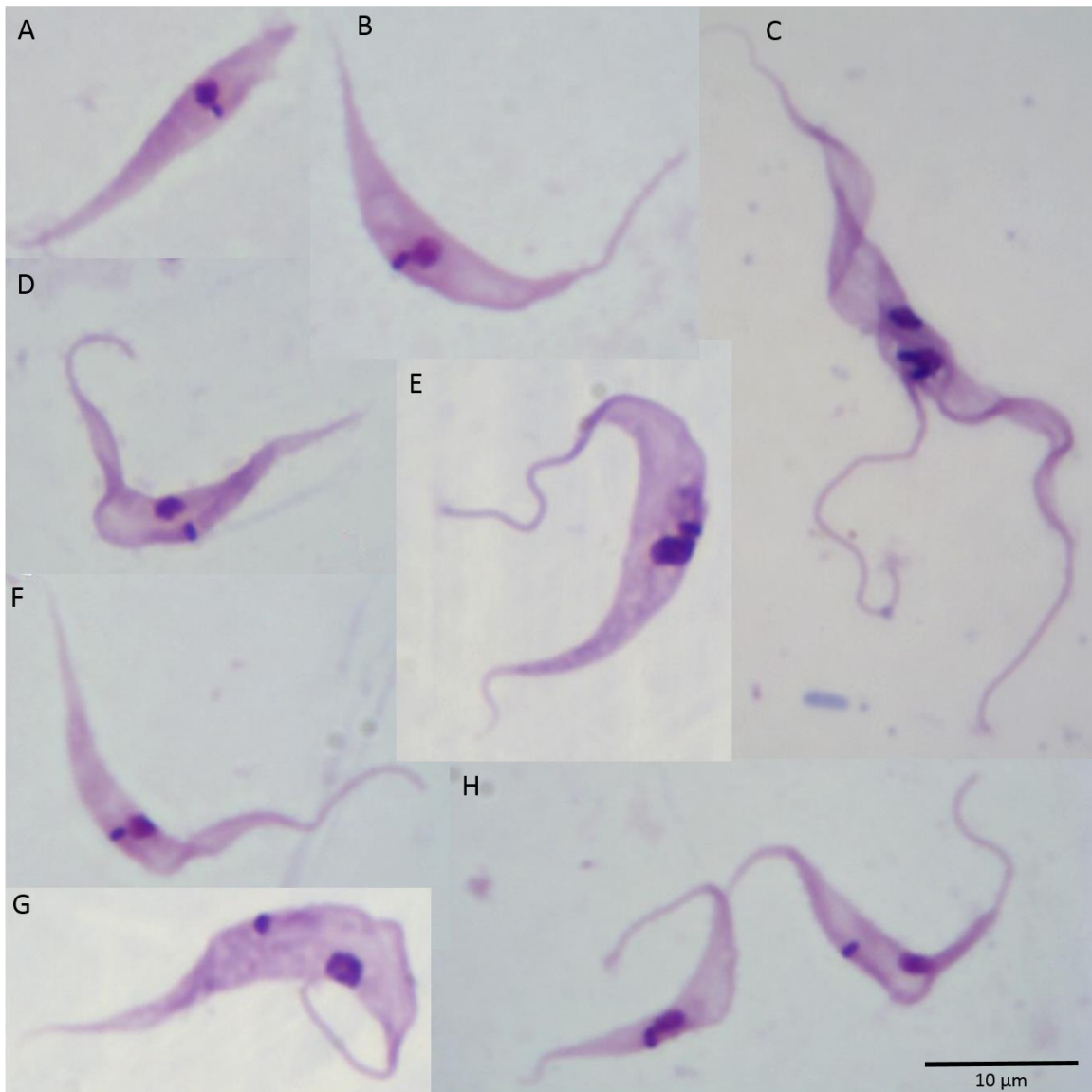
A curva de crescimento obtida em cultivo axênico (Figura 16) iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1 \times 10^4$  parasitos/mL com 75% de formas epimastigotas típicas com corpo alongado e extremidade posterior bem afilada, 13% de formas tripomastigotas, 7% de formas epimastigotas sem flagelo e de menor comprimento do corpo comparado com a forma epimastigota clássica (Figura 17) e 5% das formas visualizadas foram esferomastigotas. O isolado apresentou o pico de crescimento até o 20° DPI com uma média predominante de epimastigotas clássicas. Foi visualizado um pico das formas esferomastigotas do 22° até o dia 26° DPI. As Figuras 18 e 19 ilustram as formas evolutivas de *T. rhipicephalis*.



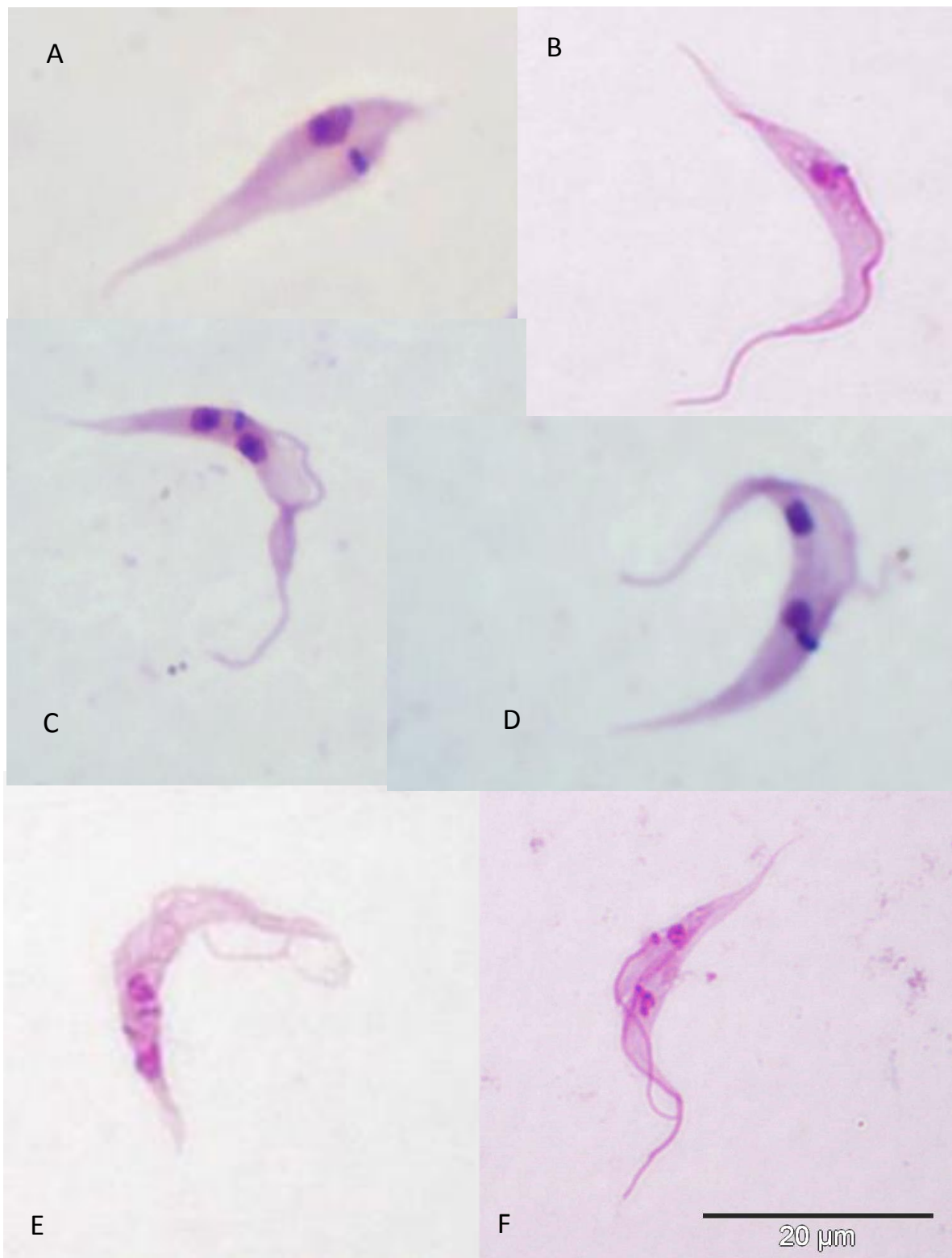
**Figura 16.** Curva de crescimento em cultivo axênico de *Trypanosoma rhipicephalis*.



**Figura 17.** Perfil das formas evolutivas em cultivo axênico de *T. rhipicephalis*.



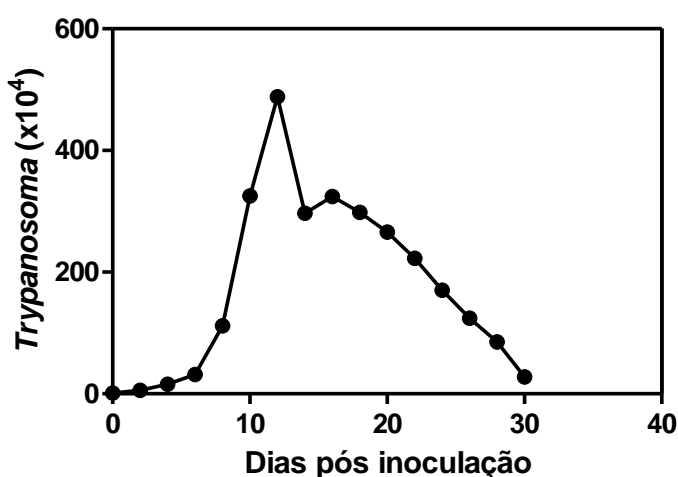
**Figura 18.** Fotomicrografia da diversidade morfológica de *Trypanosoma rhipicephalis* isolado do *Rhipicephalus microplus* em cultivo axênico. Forma epimastigota aflagelar (A); forma em transição para tripomastigota (B, D, F); forma em divisão (C); epimastigota (E) e tripomastigota (G, H). Coloração Gimesa, 4º dia de cultivo.



**Figura 19.** Fotomicrografia das formas evolutivas de *Trypanosoma rhipicephalis* isolado do *Rhipicephalus microplus*. Forma epimastigota aflagelar (A); forma epimastigota (B) e forma em divisão (C, D, E, F).

### 3.6. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo celular de *Trypanosoma rhipicephalis*

A curva de crescimento obtida em cultivo na linhagem IDE8 foi avaliada até o 32° DPI (Figuras 20) e iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1 \times 10^4$  parasitos/mL com 80% de formas epimastigotas típicas com corpo alongado e extremidade posterior bem afilada, 10% de formas tripomastigotas, 10% de formas epimastigotas sem flagelo e de menor comprimento do corpo comparado com a forma epimastigota clássica (Figura 23). O isolado apresentou o pico de crescimento até o 12° DPI com uma média predominante de epimastigotas clássicas. Foi visualizado o predomínio em toda a curva das formas epimastigotas. A partir do 32° DPI foi observado o predomínio de formas degeneradas.

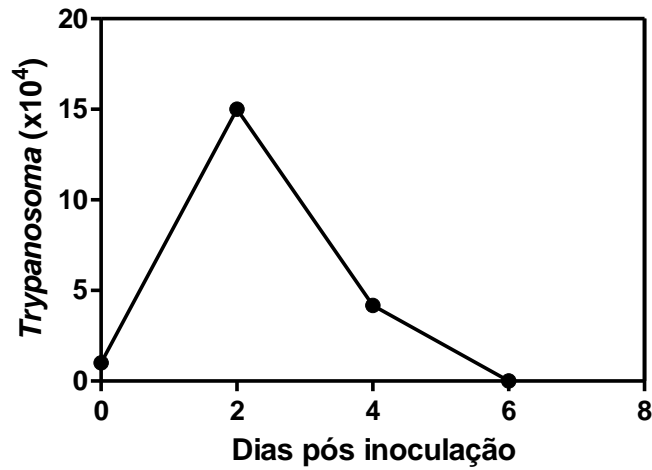


**Figura 20.** Curva de crescimento de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem celular IDE8.

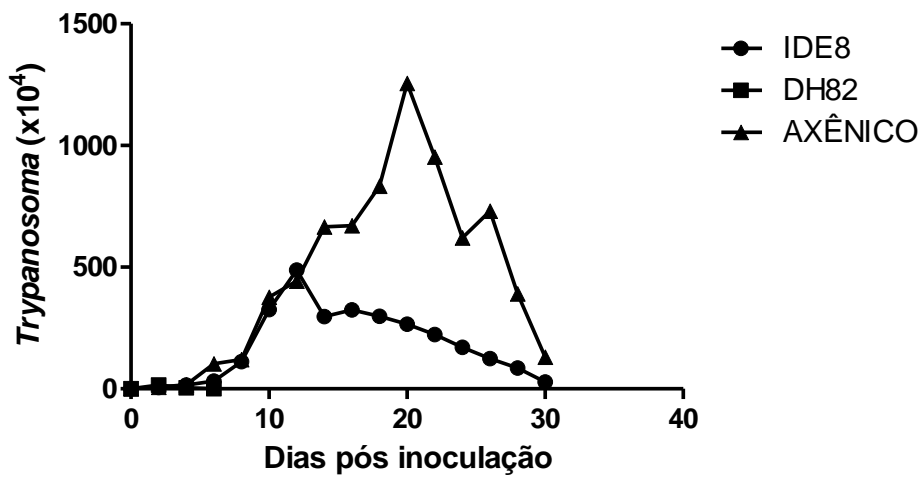
A curva de crescimento realizada até o 6° DPI obtida em cultivo na linhagem DH82 (Figura 21) iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1 \times 10^4$  parasitos/mL com 80% de formas epimastigotas típicas com corpo alongado e extremidade posterior bem afilada, 10% de formas tripomastigotas, 10% de formas epimastigotas sem flagelo e de menor comprimento do corpo comparado com a forma epimastigota clássica (Figura 24). O isolado apresentou o pico de crescimento até o 2° DPI. Foi visualizado o predomínio em toda a curva das formas epimastigotas.

A curva de crescimento foi maior na linhagem IDE8 em comparação com as curvas de crescimento na linhagem DH82 e cultivo axênico (Figura 22 e Tabela 5). O número de parasitos  $\times 10^4$ /mL em cada dia de avaliação das curvas de crescimento de *T. rhipicephalis* nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico foram descritos na tabela abaixo.

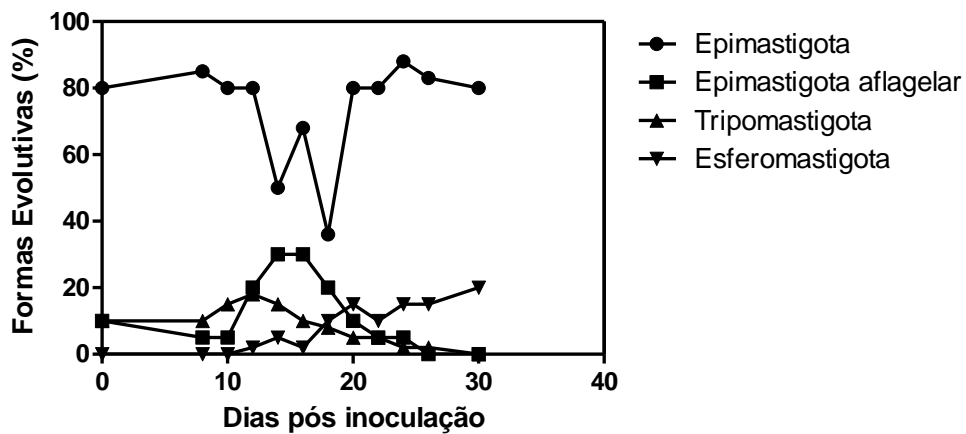




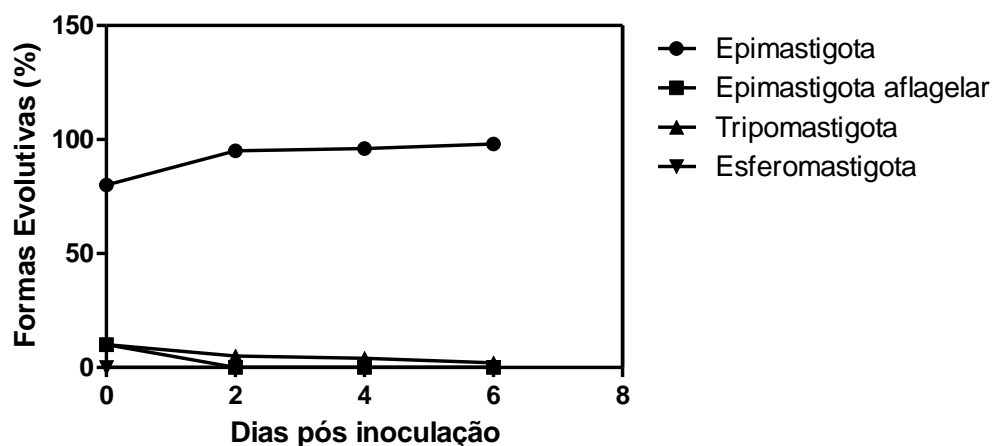
**Figura 21.** Curva de crescimento de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem celular DH82.



**Figura 22.** Curvas de crescimento de *Trypanosoma rhipicephalis* nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.



**Figura 23.** Perfil de formas evolutivas *Trypanosoma rhipicephalis* em linhagem IDE8.



**Figura 24.** Perfil de formas evolutivas do *Trypanosoma rhipicephalis* em linhagem DH82.

**Tabela 5.** Número de parasitos  $\times 10^4/\text{mL}$  em cada dia de avaliação das curvas de crescimento de *Trypanosoma rhipicephalis* nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.

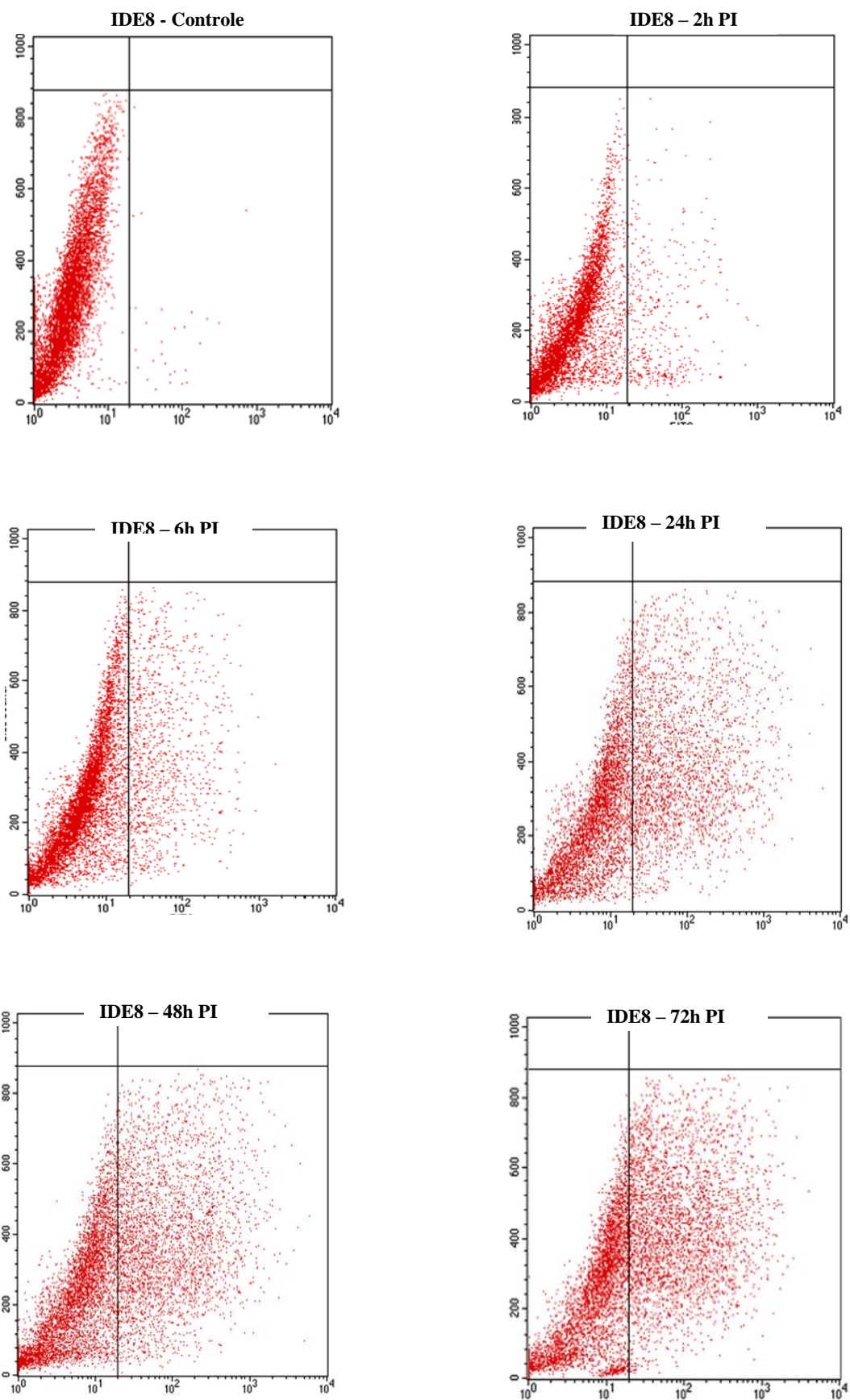
Dias Pós-infecção	Cultivo axênico	IDE8	DH82
0	1,0	1,0	1,0
2	6,6	5,8	15,0
4	16,6	15,8	4,1
6	103,3	31,6	0
8	120,0	111,7	-
10	376,6	325,0	-
12	443,0	488,3	-
14	666,0	296,6	-
16	670,0	324,1	-
18	833,0	298,3	-
20	1256,0	265,8	-
22	953,0	222,5	-
24	620,0	170,0	-
26	730,0	124,1	-
28	390,0	85,0	-
30	130,0	27,5	-

### 3.7. Internalização de *Trypanosoma rhipicephalis* em células IDE8 E DH82

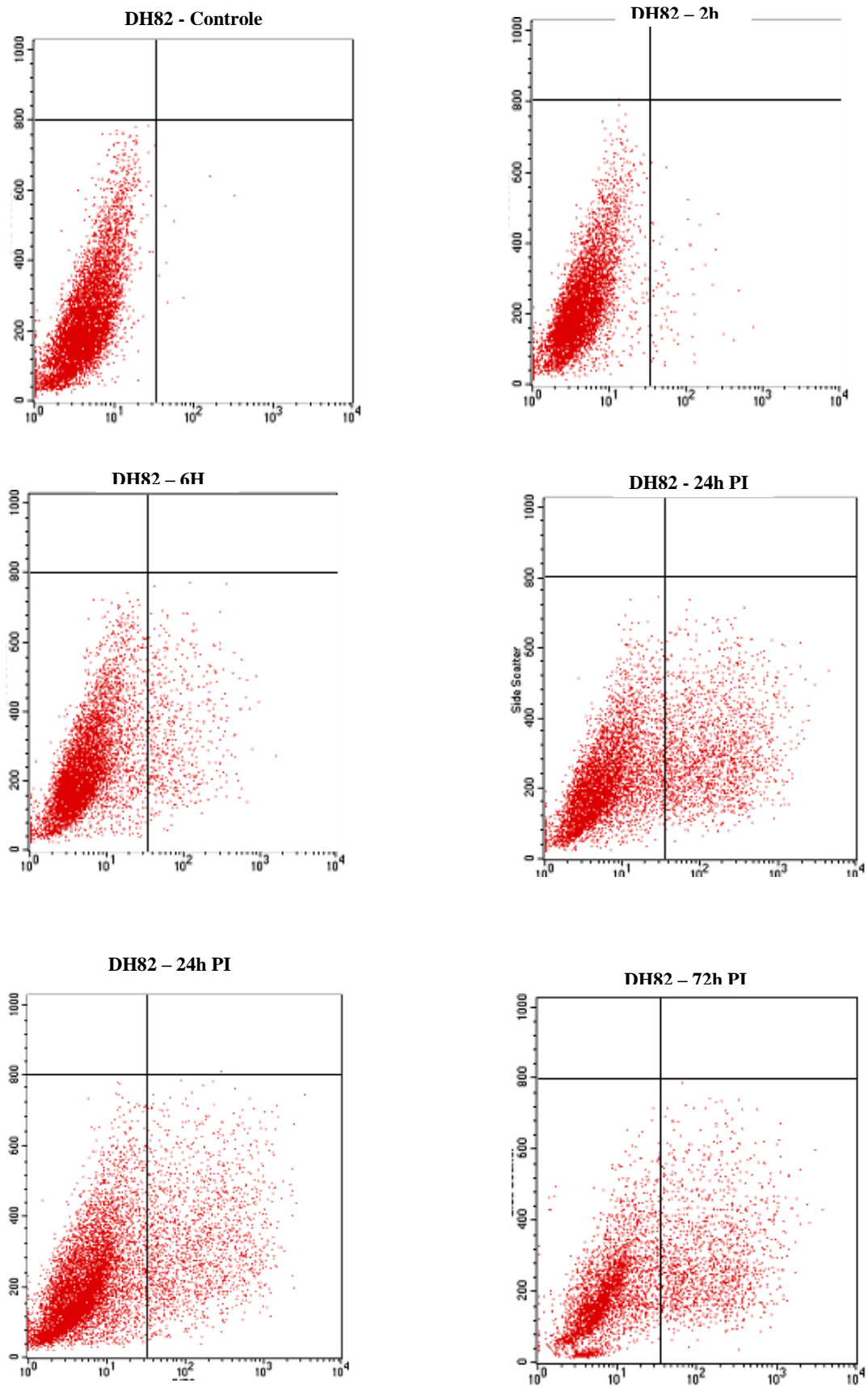
Através da citometria de fluxo foi quantificada a interação de *T. rhipicephalis* com as linhagens IDE8 (Figura 25) e DH82 (Figura 26). Na Tabela 6 e Figura 27 estão registrados os percentuais de infecção nas duas linhagens celular.

Foram visualizados diferentes percentuais de infecção nas linhagens de células IDE8 e DH82 avaliadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *T. rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67. Sendo o percentual de células

infectadas superior e crescente em todos os tempos de avaliação na linhagem de células IDE8. Foi realizado um controle com células não infectadas de cada uma das linhagens. Os percentuais de células infectadas por *T. rhipicephalis* nas linhagens IDE8 e DH82 foram descritos na Tabela 6. Após 24 horas de infecção foi possível observar, através da microscopia de fluorescência, em ambas as linhagens celulares diversas células muito infectadas. Já com 48 horas pós-infecção um decréscimo no percentual de infecção foi observado na linhagem DH82. Na linhagem IDE8 todos percentual de infecção celular foi crescente e superior em todos os tempos avaliados. Após 72 horas do inóculo os percentuais de infecção foram superiores a todos percentuais avaliadas duas linhagens celulares.



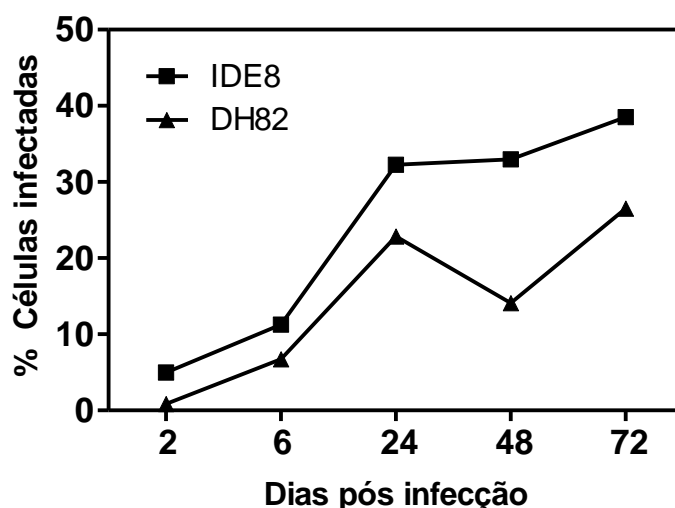
**Figura 25.** Citometria de fluxo mostrando a interação de *Trypanosoma rhipicephalis* com a linhagem IDE8.



**Figura 26.** Citometria de fluxo mostrando a interação de *Trypanosoma rhipicephalis* com a linhagem DH82.

**Tabela 6.** Percentual de células infectadas por *Trypanosoma rhipicephalis* nas células IDE8, DH82 e controle.

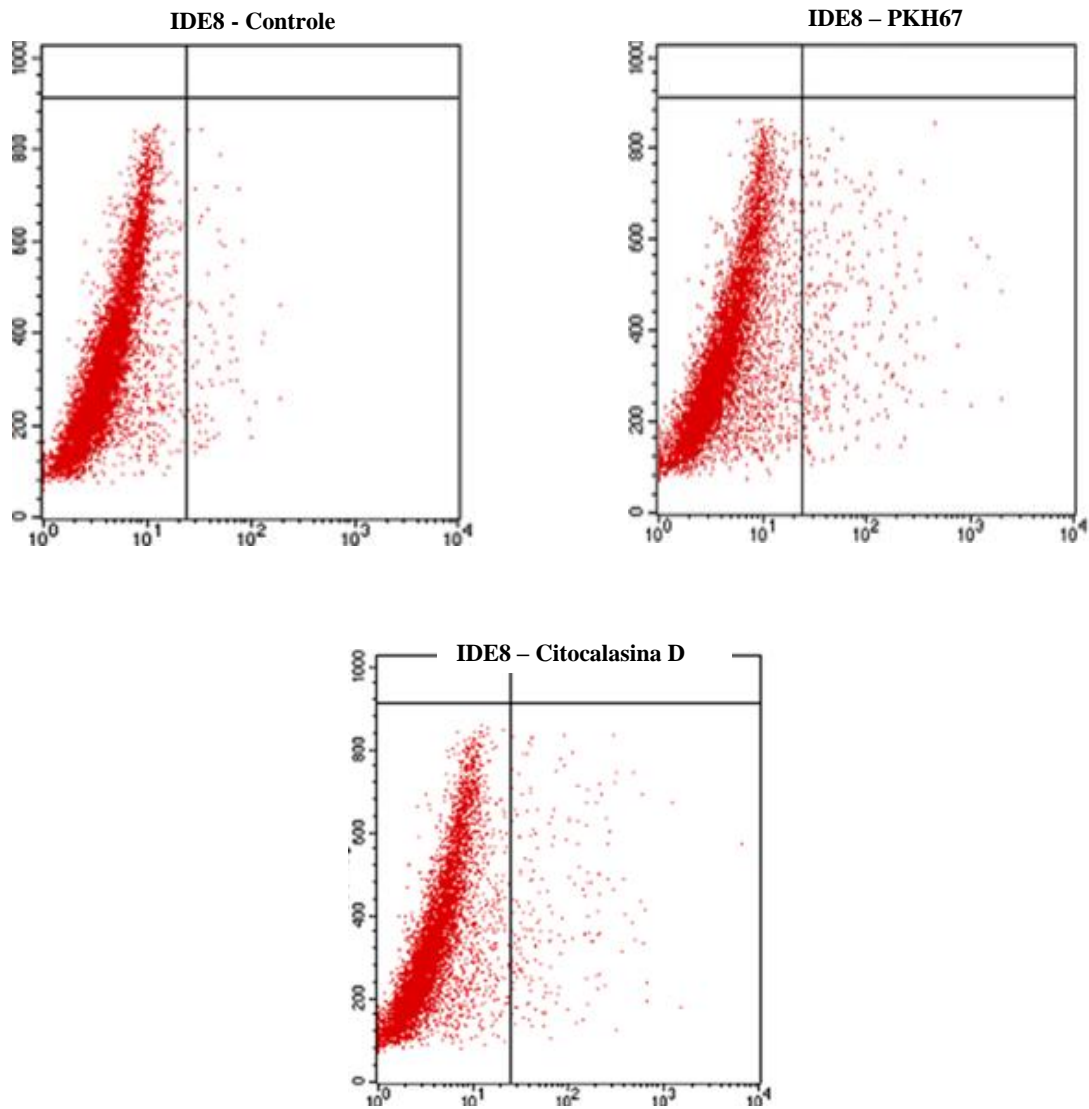
	Controle	2h PI	6h PI	24h PI	48h PI	72h PI
<b>IDE8 infectadas</b>	0.09%	4.96%	11.27%	32.28%	32.99%	38.53%
<b>DH82 infectadas</b>	0.05%	0.85%	6.74%	22.84%	14.09%	26.53%



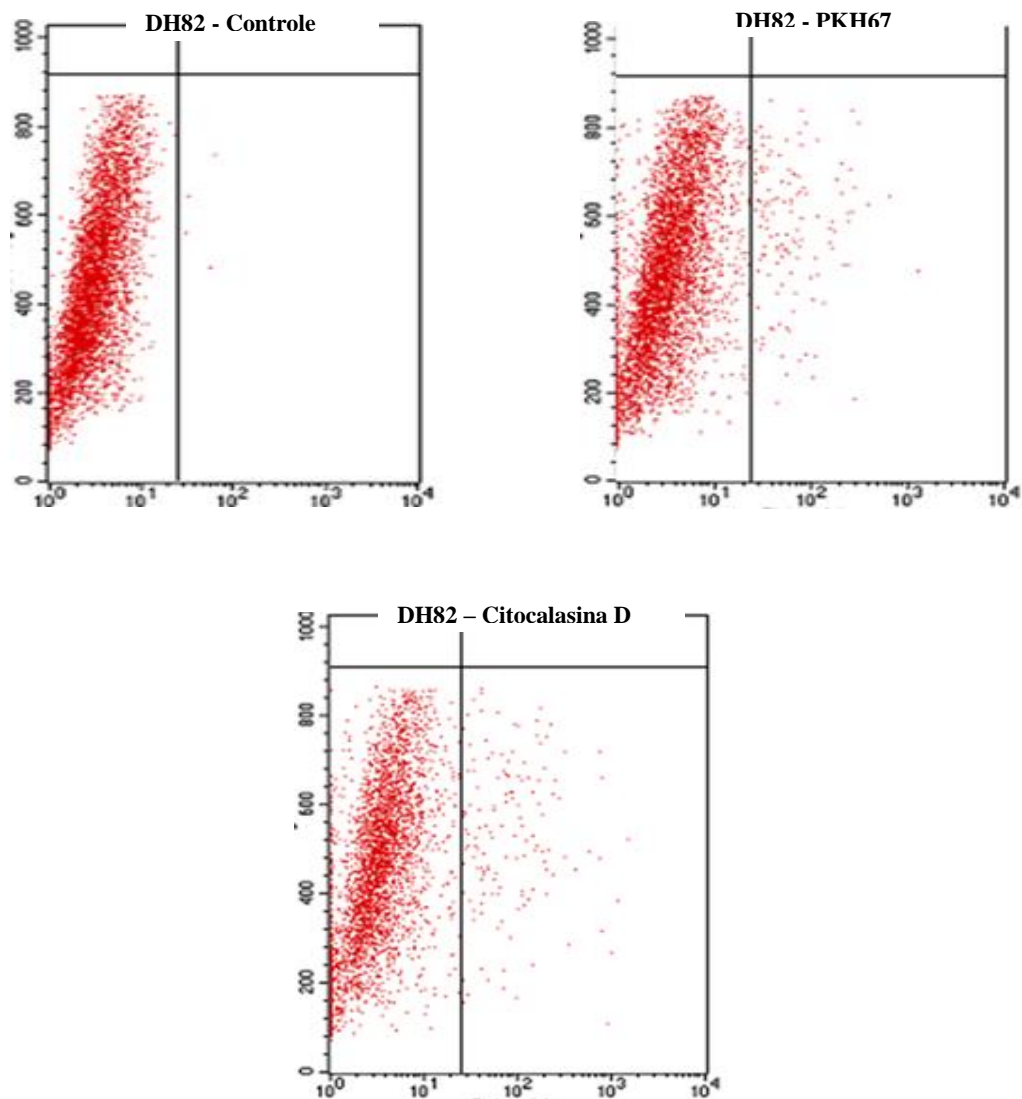
**Figura 27:** Percentual de células infectadas por *Trypanosoma rhipicephalis* nas células IDE8 e DH82.

### 3.8. Mecanismo de invasão celular de *Trypanosoma rhipicephalis*

Foi quantificada, com auxílio da citometria de fluxo a interação de *T. rhipicephalis* às linhagens IDE8 (Figura 28) e DH82 (Figura 29) com e sem a inibição da fagocitose através da citocalasina D. Foram visualizados diferentes percentuais de infecção nas linhagens de células IDE8 e DH82 avaliadas 4 horas pós-infecção por *T. rhipicephalis* com e sem o uso da citocalasina D (Tabela 7 e Figura 30). Foi detectada infecção celular mesmo com a inibição da fagocitose e a sua internalização visualizada nas microscopias de fluorescência Figuras 31 e 32.



**Figura 28.** Citometria de fluxo com e sem o tratamento de citocalasina D na infecção de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem IDE8.

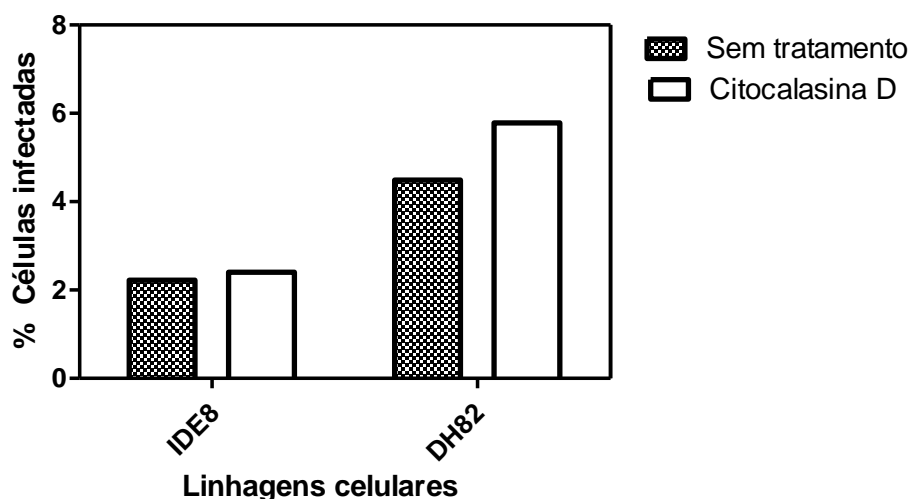


**Figura 29.** Citometria de fluxo com e sem o tratamento de citocalasina D na infecção de *Trypanosoma rhipicephalis* na linhagem DH82.



**Tabela 7.** Percentual de infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* corados com o fluoróforo PKH67 e com o tratamento por citocalasina D nas células IDE8 e DH82.

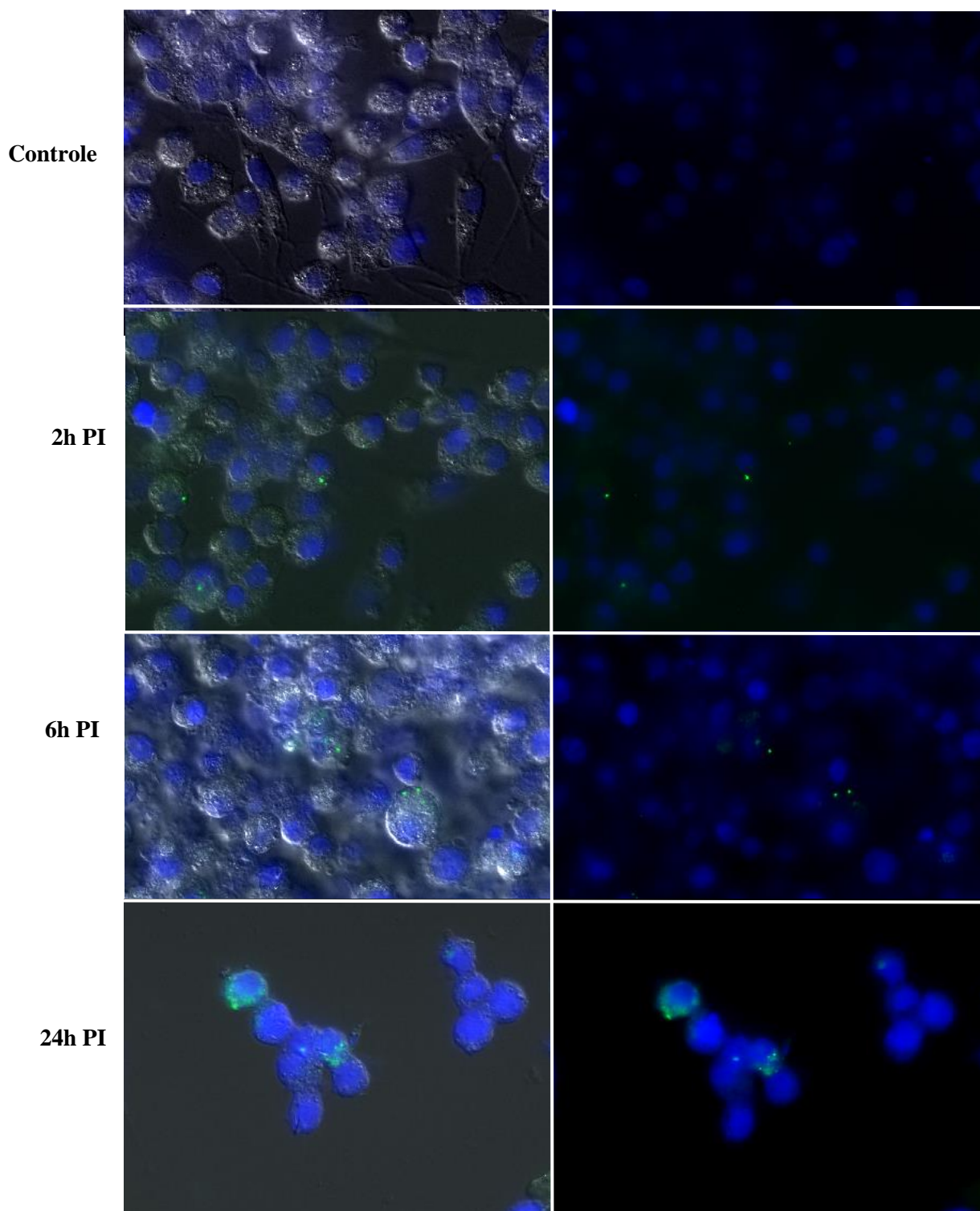
	Controle	PKH67	Citocalasina D
IDE8	0,06%	2,43%	1,89%
DH82	0,04%	2,41%	3,76%



**Figura 30.** Percentual de células infectadas por *Trypanosoma rhipicephalis* nas células IDE8 e DH82, com e sem o tratamento de citocalasina D.

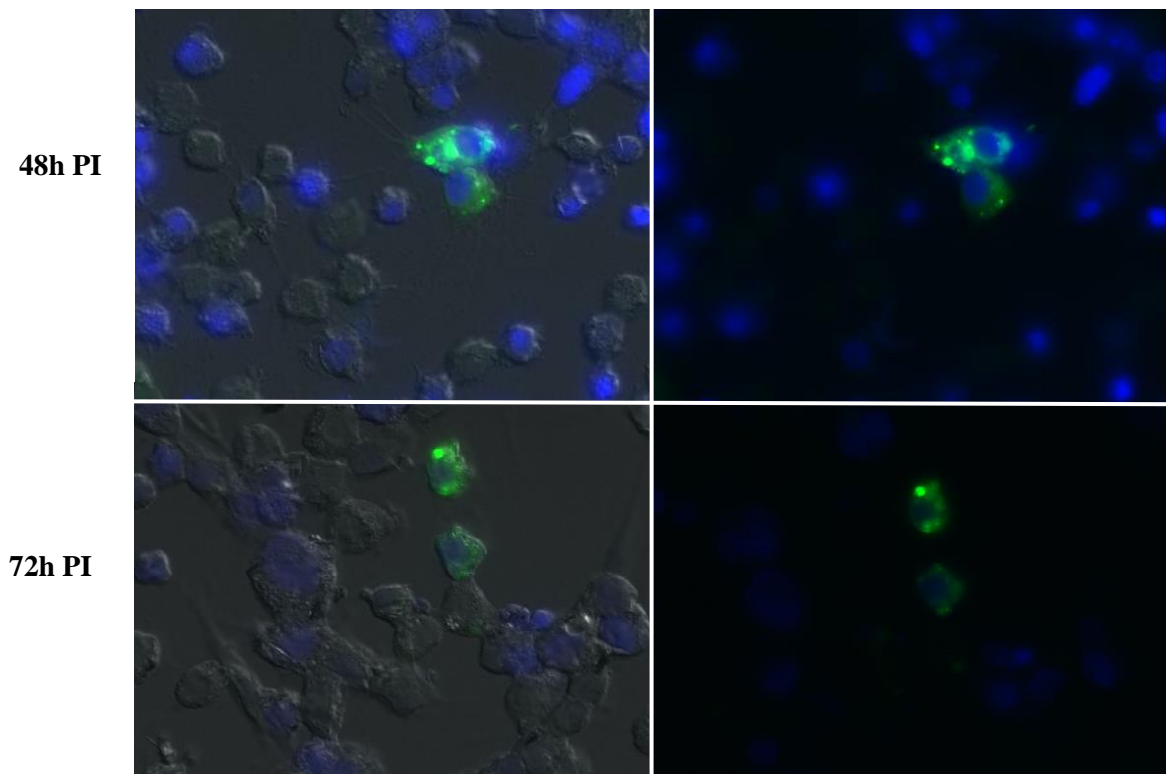
### 3.9. Microscopia de fluorescência de *Trypanosoma rhipicephalis*

Foram observadas em microscópio de fluorescência, células infectadas das linhagens IDE8 e DH82 coradas com DAPI e infectadas por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 a partir de duas horas da infecção (Figuras 31 e 32). Células com vários Tripanosomas internalizados foram visualizadas a partir de 24 horas de infecção nas duas linhagens presentes no estudo. Foram observadas células em sofrimento e perda acentuada da confluência das monocamadas a partir de 72 horas pós infecção.

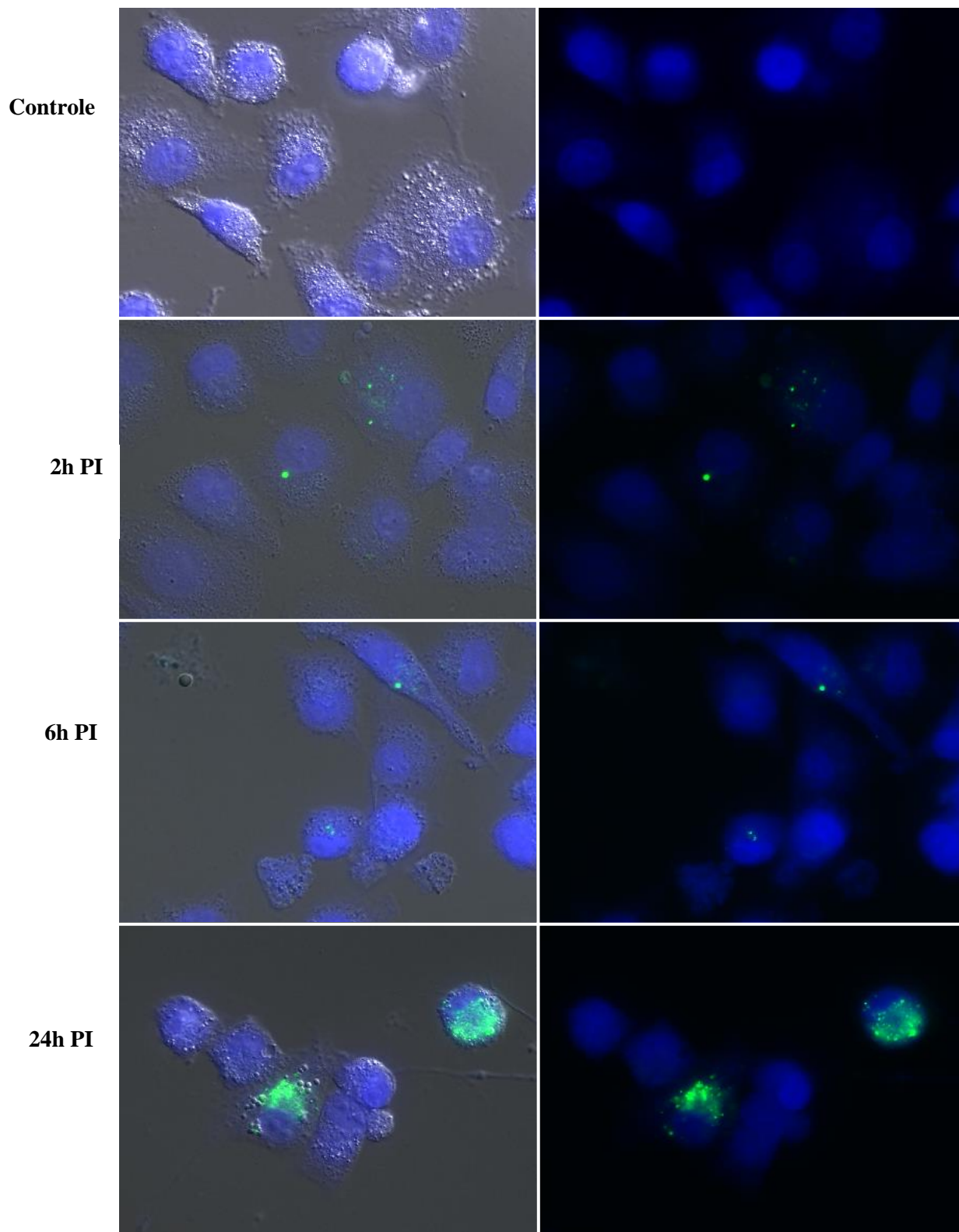


**Figura 31:** Linhagem IDE8 corada com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm. (\*continua)

\*continuação

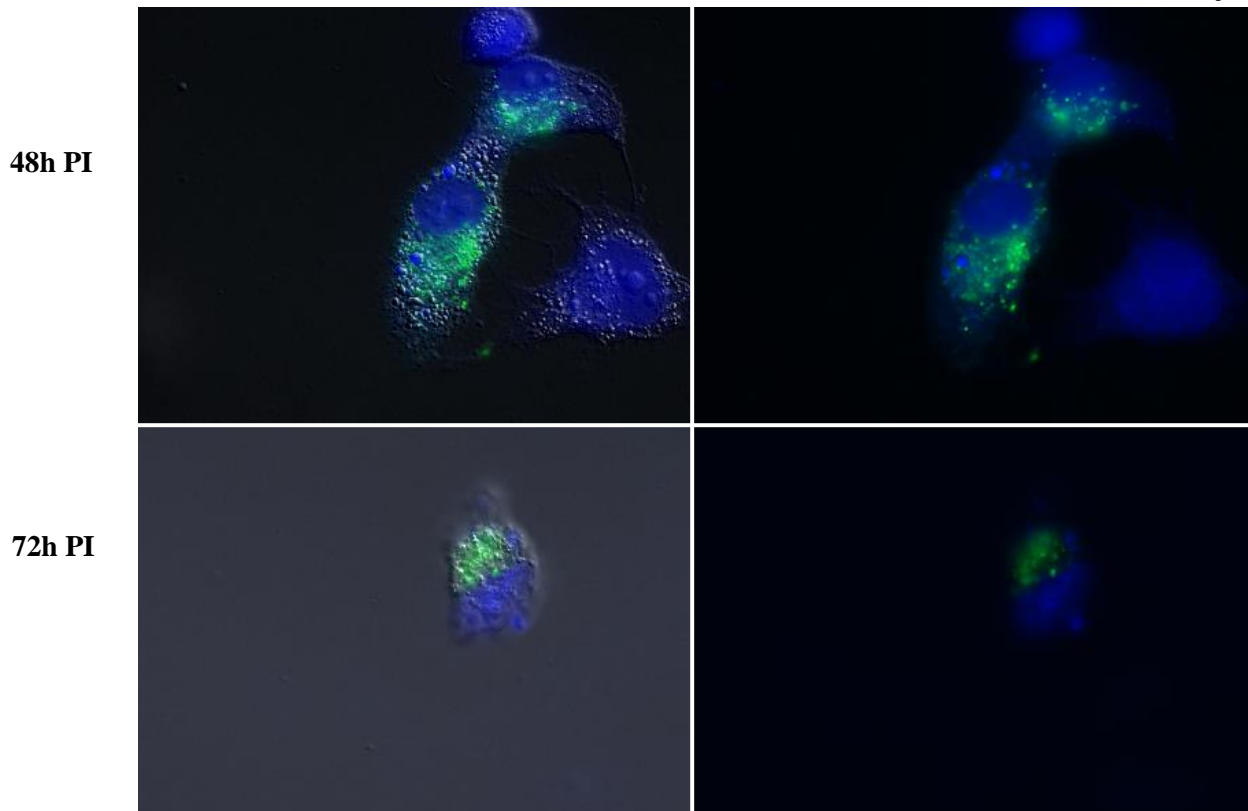


**Figura 31:** Linhagem IDE8 corada com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50 $\mu$ m.



**Figura 32** Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50 $\mu$ m. (\*continua)

\*continuação



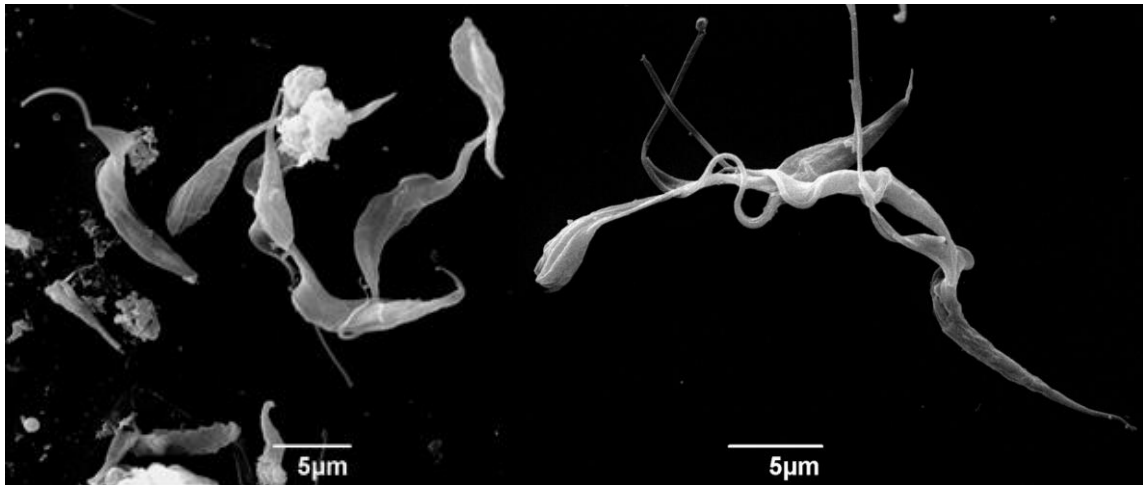
**Figura 32** Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e infectadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma rhipicephalis* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x. A barra de escala representa 50µm.

### 3.10. Microscopia eletrônica de varredura de *Trypanosoma rhipicephalis*

A microscopia eletrônica de varredura revelou ampla diversidade morfológica. (Figuras 33 e 34). Foram observadas formas tripomastigotas com membrana ondulante proeminente, formas epimastigotas de diferentes tamanhos com flagelos emergindo lateralmente ao corpo. Também foram observadas formas atípicas sem flagelo aparente e corpo de formato fusiforme com uma das extremidades alongada e a superfície irregular.



**Figura 33.** Microscopia eletrônica das formas de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (PIRJ), cultura de 6 dias.



**Figura 34.** Microscopia eletrônica da diversidade morfológica de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (P1RJ), cultura de 6 dias.

## 4 DISCUSSÃO

Este estudo descreve pela primeira vez a infecção natural de epimastigotas do gênero *Trypanosoma* em telóginas do carrapato *R. microplus* coletadas de bovinos no município de Seropédica-RJ com caracterização molecular, morfométrica e biológica. Com o isolamento de *Trypanosoma* a partir da hemolinfa do carrapato pode se afirmar que ocorre a multiplicação desse organismo no hospedeiro invertebrado, mas não se pode dizer que o carrapato é o vetor do agente isolado. No entanto, a ocorrência de formas epimastigotas de um tripanosomatídeo na hemolinfa dessa espécie de carrapato já havia sido relatada também em carrapato *R. microplus* por Martins et al (2008) e Ribeiro et al. (1988) na região central e sudeste do Brasil, respectivamente e por Gaido et al. (1989) na Argentina. Evidências morfológicas levaram os autores a suspeitar de *T. theileri*, uma espécie descrita como não patogênica aos bovinos e que é, usualmente, transmitida por tabanídeos. Assim como no presente estudo, artrópodes que não são dos gêneros *Rhodnius* e *Triatoma* podem atuar como vetores, como é observado no ciclo de vida do *Trypanosoma lewisi*, transmitido por pulgas das espécies *Nosopsyllus fasciatus* e *Xenopsylla cheopis* (RAYAT & VASISHTA, 2014). Outro exemplo é a espécie *Trypanosoma melophagium* que parasita ovinos e caprinos, sendo transmitido por *Melophagus ovinus* (NALBANTOGLU & KARAER, 2008). O resultado das análises desenvolvidas no presente estudo sugere se tratar de uma nova espécie de tripanosoma que nomeamos como *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov.

Em cultivo axênico e celular, após análise microscópica, o isolado apresentou características morfológicas clássicas do gênero *Trypanosoma* como núcleo, cinetoplasto, membrana ondulante e flagelo livre, além das diferentes formas evolutivas epimastigotas, tripomastigotas e esferomastigotas. Em condições axênicas e cultivos celulares ocorreu o predomínio das formas epimastigotas. A curva de crescimento que obteve maior pico de crescimento foi a de condições axênicas, talvez por não haver competição por meio de cultivo com as células. A curva de crescimento foi maior linhagem de células IDE8 quando comparada a linhagem DH82, sendo assim as células IDE8 em meio L15B serviram de substrato para o desenvolvimento dos *Trypanosomas*.

A avaliação de aspectos morfológicos e morfométricos em tripanossomatídeos fornecem dados valiosos que auxiliam na identificação e descrição de novas espécies (HOARE, 1972). *Trypanosoma rhipicephalis* descrito no presente estudo apresenta grandes dimensões, como se pode observar no comprimento total da forma tripomastigota, com média de 29,34µm, sendo assim maior que linhagens de *T. vivax* (RAMIREZ et al., 1997), *T. cruzi* (MADEIRA et al., 2009) e *T. evansi* (ELSHAFIE et al., 2013), embora menor que *T. theileri* (WINK, 1979), *T. caninum* (MADEIRA et al., 2009) e *T. rangeli* (MADEIRA et al., 2009).

No presente estudo foi observada considerável variação no comprimento total das formas tripomastigotas de *T. rhipicephalis*, indo de 19,87µm até 45,85µm. Ampla variação também foi observada em outras medidas, como na distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto, na distância entre núcleo e porção anterior e da região posterior ao núcleo. Observações semelhantes foram feitas por Chagas (1909) e Hoare (1972) ao descreverem formas tripomastigotas de *T. cruzi*, que também apresentam variação morfométrica no comprimento total (16,3 – 21,8 µm segundo Hoare, 1972). Pleomorfismo em *T. rangeli*, *T. minasense* e *T. saimirii* também foi observado por Ziccardi & Lourenço-de-Oliveira (1999) em primatas da Amazônia



brasileira. Fatores como a espécie de hospedeiro e a fase de infecção, bem como a cepa de *Trypanosoma* envolvida, podem influenciar para a ocorrência dessa variação (BRENER, 1965; ANDRADE, 1974; URDANETA-MORALES, 1983). Nesse sentido, estudos de caracterização de espécies de *Trypanosoma* devem utilizar mais do que apenas a morfometria como ferramenta de identificação específica, sendo muito utilizadas atualmente as análises de isoenzimas, moleculares e filogenéticas (MADEIRA et al., 2009).

A espécie descrita neste artigo apresenta algumas características biológicas pouco comuns aos protozoários do gênero *Trypanosoma*. Um aspecto interessante foi o isolamento feito a partir da linhagem de células de carrapatos IDE8, uma vez que, o isolamento de tripanosomatídeos, geralmente, é realizado em meio de cultura ágar sangue Difásico NNN (MADEIRA et al. 2009). Além disso, formas evolutivas sem o flagelo livre visível em culturas axênicas foram visualizadas. Recentemente, Barros et al. (2015) descreveu formas epimastigotas aflageladas em *T. caninum* confirmadas pela microscopia eletrônica. O flagelo é considerado uma estrutura sofisticada nos tripanosomatídeos e problemas na expressão de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento dessa organela estão relacionadas ao aparecimento de formas mutantes sem flagelo (BASTIN et al. 1999). Li et al. (2004), estudaram proteínas do axonema, comparando parasitos flagelados e não-flagelados, foi constatado que nas formas flageladas essas proteínas estão presentes e nas formas aflageladas, ausentes. As razões deste fenômeno ainda são desconhecidas, mas tais fatos apontam para a possibilidade de que o surgimento dessas formas atípicas possa ser resultante de um processo perturbado durante a divisão celular desse parasito, que leva à incapacidade de formar e alongar o flagelo. Considerando que *T. rhipicephalis* é uma espécie nova, essa informação pode ser útil para esclarecer aspectos do ciclo biológico desse parasito.

Outra característica pouco comum do gênero *Trypanosoma* é a inviabilidade de propagação como observado em *T. rhipicephalis* quando submetidos às temperaturas de incubação a 26<sup>o</sup>C, 28<sup>o</sup>C e 37<sup>o</sup>C nos meios de cultura convencionais como MEM, DMEM, M199, BHI, BHI suplementado com ágar sangue, *Schneider's insect Medium*. As abordagens biológicas a partir do cultivo *in vitro* são fundamentais para o conhecimento de características importantes do parasito, como padrões morfológicos e perfis de multiplicação. A grande diversidade de meios de cultura pode, por exemplo, fornecer informações nutricionais desses parasitos (SCHUSTER & SULLIVAN, 2002). O conhecimento da forma de multiplicação dos tripanosomatídeos é importante quando estudamos novas espécies. Como exemplo, em algumas espécies do subgênero *Megatrypanum* (*T. theileri*, *T. melophagium* e *T. conorhini*) a multiplicação é feita através da forma epimastigota em mamíferos (HOARE, 1972).

Diversos marcadores genéticos têm sido empregados para o estudo molecular de parasitos do gênero *Trypanosoma*. Para as regiões conservadas do genoma, genes da pequena e grande subunidade do DNA ribossomal (*18S rDNA* e *24Sa rDNA*), são frequentemente usados para abordagem diagnóstica, principalmente para a identificação de novas espécies (LIMA et al., 2012; SIMO et al., 2013; VILLAREAL et al., 2013) e estudos filogenéticos de espécies aparentadas (GARCIA et al. 2011).

Na análise filogenética com alvo molecular o gene *18S rDNA*, o isolado de *T. rhipicephalis* se apresenta dentro de um mesmo clado junto com *Trypanosoma caninum* e *Trypanosoma KG1*. Na análise filogenética, o alvo molecular do gene *24Sa rDNA* de *T. rhipicephalis* está em um ramo separado dentro de um mesmo clado, junto a *T. caninum*. A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sa rDNA* comprovaram a autenticidade dessa nova espécie.

*Trypanosoma KG1* foi descrito após isolamento em *Hemaphysalis hystricis* naturalmente infectados no Japão (THEKISOE et al., 2007). A proximidade filogenética entre *T. rhipicephalis* e *Trypanosoma KG1* pode estar relacionada ao fato de ser um *Trypanosoma* também isolado de carrapato naturalmente infectado. Porém até o presente momento o carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum* é a única espécie de ixodídeo que apresenta alta capacidade vetorial para *T. theileri* (LATIF et al. 2004). Outra espécie com proximidade filogenética ao *T. rhipicephalis* é a espécie *T. caninum* isolada a partir de uma cultura axênica da pele intacta de um cão doméstico capturado em diferentes estados do Brasil, incluindo o Rio de Janeiro (MADEIRA et al 2009, BARROS et al. 2015). Embora ainda se conheça o vetor de *T. caninum*, existe a possibilidade de ser transmitido por carrapatos e dessa forma justificar a proximidade filogenética entre *T. rhipicephalis* e *T. caninum*. Outra possibilidade seria o fato de *T. rhipicephalis* não ser encontrado infectando ou algum indício de sinal clínico em animais, existe a possibilidade de que, *T. rhipicephalis* tenha o bovino como hospedeiro mamífero, uma vez que o carrapato *R. microplus* infesta, preferencialmente, essa espécie. Se há infecção em bovinos, acreditamos que o mecanismo de infecção ocorra de forma semelhante a *T. caninum* em cães, apesar desse fenômeno ainda não ter sido descrito uma vez que até o presente momento também não foi possível encontrar este parasito no sangue de canídeos infectados (MADEIRA et al. 2009).

Esse fato pode justificar a proximidade filogenética de ambos parasitos, já que carrapatos são comuns infestando cães. O vetor de *T. caninum* ainda é desconhecido, essas duas espécies de *Trypanosomas* podem compartilhar do mesmo hospedeiro invertebrado *R. microplus*, uma vez que ainda não é conhecido o vetor de *T. caninum*. Compartilhar do mesmo vetor poderia justificar a proximidade filogenética.

A marcação de *T. rhipicephalis* com o fluoróforo PKH67 verde não trouxe prejuízos a seu metabolismo e permitiu a visualização por microscopia de fluorescência assim como a quantificação da interação com as linhagens IDE8 e DH82 utilizando citometria de fluxo. As linhagens usadas neste estudo foram a linhagem de células de carrapato IDE8 utilizada no isolamento *T. rhipicephalis*, e a linhagem DH82, macrófago de mamífero, com alta função fagocítica. A Citometria de fluxo permitiu a detecção da fluorescência proveniente de Tripanosomas corados associados e internalizados nas células que com o auxílio da microscopia de fluorescência que permitiu a visualização da localização intracelular e raramente foram visualizados Tripanosomas livres ou fixados às células sendo comprovada a infecção dessas células por *T. rhipicephalis*. A infecção foi mais satisfatória na linhagem IDE8. As formas intracelulares observadas nas duas linhagens estudadas apresentaram morfologia arredondada. Não se pode afirmar que os tripanosomas internalizados são capazes de multiplicação, porém células apresentavam alto índice de infecção após 48 horas de infecção. E após 72 horas já havia sofrimento celular e culturas menos confluentes.

Em uma das espécies mais estudadas, *Trypanosoma cruzi*, já se sabe que o estabelecimento da infecção depende de uma série de eventos que iniciam com a invasão das células do hospedeiro, como um mecanismo de evasão da lise, mediada pelo complemento. Diversas células podem ser alvo de invasão, dentre elas macrófagos, células epiteliais, neuronais e musculares (CESTARI, 2006). Moléculas de superfície do parasito, localizadas nas células do hospedeiro, são responsáveis pelos processos de interação e invasão como, mucinas, transialidades, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios ancorados ao fosfatidilinositol na membrana, além de outras proteínas integrais da membrana do parasito (VILLALTA et al., 2008). A invasão do *T. cruzi* nas células ocorre com a formação do vacúolo parasitóforo (na célula hospedeira) e um aumento de  $Ca^{+2}$ , tanto no parasito, quanto na célula hospedeira provocada por moléculas de

superfície do parasito (CESTARI, 2006). A membrana do vacúolo é derivada de lisossomos e contém no seu interior, componentes ácidos líticos potencialmente destrutivos para o parasito. Dessa maneira, a evasão desse compartimento para o meio intracelular torna-se essencial para o crescimento do parasito. A saída desse vacúolo é mediada por uma proteína secretada pelo parasito, a TC-tox, a qual possui uma atividade lítica e formadora de poros da membrana deste vacúolo em pH ácido, facilitada pela presença de transialidases, localizadas na superfície da membrana das formas tripomastigotas (ANDREWS, 1995).

De acordo com os percentuais de infecção detectados mesmos após o pré-tratamento das células com a citocalasina D (que impede a polimerização da actina) ocorreu a internalização dos Tripanosomas. Sendo assim sugere-se que a internalização dos Tripanosomas nas linhagens IDE8 e DH82 são independentes da polimerização da actina. A infecção de células não fagocitárias pode ocorrer por, pelo menos, duas vias principais. A primeira baseia-se em uma sinalização mediada pelo cálcio na superfície para a formação lisossômica dependente da polimerização de actina e microtúbulos, enquanto o segundo trata-se de uma invaginação mediada pela membrana plasmática envolvendo a sinalização pela PI3 cinase, independente da polimerização de actina (EPTINGA et al., 2010).

A infecção de células não fagocitárias pode ocorrer por pelo menos, duas vias principais. A primeira se baseia em uma sinalização mediada pelo cálcio na superfície para a formação lisossômica dependente da polimerização de actina e microtúbulos, enquanto o segundo trata-se de uma invaginação mediada pela membrana plasmática envolvendo a sinalização pela PI3 cinase, independente da polimerização de actina (EPTINGA et al., 2010).

O potencial infeccioso de *Trypanosoma* com a internalização por penetração ativa sugere que possa ocorrer alguma fase intracelular do seu ciclo de vida. São necessários mais estudos para investigar a patogenicidade e o potencial vetorial de carrapatos.

A microscopia eletrônica de varredura revelou ampla diversidade morfológica da espécie descrita. O conhecimento das formas evolutivas é importante para estabelecer aspectos do ciclo de vida do parasito. Como se trata de uma espécie não descrita anteriormente é difícil afirmar se as formas tripomastigotas observadas eram formas ainda em transição. Sendo necessárias mais observações por microscopia eletrônica e em diferentes dias de cultura. Além das formas epimastigotas clássicas com flagelos emergindo lateralmente ao corpo foram observadas formas atípicas sem flagelo aparente. São necessários estudos de microscopia eletrônica de transmissão para definir se as formas atípicas sem flagelo aparente são epimastigotas sem flagelo e se essas formas aflageladas se diferenciam de formas flageladas. Assim como, se haveria a formação de vacúolos parasitóforo intracelulares e se após a internalização ocorreria a diferenciação em formas amastigotas.

O estudo de novas espécies deve considerar o perfil molecular e aspectos relacionados a biologia, como o conhecimento de suas formas evolutivas que o parasito possa apresentar durante o seu ciclo biológico. Aspectos relacionados à patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo e mecanismos de transmissão ainda são desconhecidos. Portanto, serão necessários mais estudos sobre as relações filogenéticas, patogenicidade, transmissão, novos isolados e microscopia eletrônica de transmissão para o conhecimento de aspectos do ciclo biológico do *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov.

## 5 DIAGNÓSTICO

**Nome:** *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov.

**Hospedeiro mamífero:** Possivelmente *Bos taurus*.

**Localidade:** Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

**Vetor:** carrapato *Rhipicephalus microplus*.

**Biologia e morfologia:** Esta espécie foi isolada em co-cultivo com células IDE8 e cresce bem em meio L15B disponíveis comercialmente suplementados com soro fetal de vitelo (FCS). Os estágios evolutivos encontrados em culturas axênicas foram epimastigotas (predominantemente), tripomastigotas, esferomastigotas. A média do comprimento total do corpo na forma epimastigota foi 32,44 µm, flagelo livre 6,90 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto 1,21 µm. Medida do comprimento total do corpo na forma tripomastigota foi em média 29,34 µm, flagelo livre 5,72 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto 1,02 µm. A média do comprimento total do corpo na forma esferomastigota foi de 16,13 µm, flagelo livre com 11,66 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto com 1,06 µm.

**Características moleculares:** Este *Trypanosoma* apresenta produtos amplificados para o gene *24Sa rDNA* de cerca de 250 pb utilizando primers D75 / D76. Na primeira reação da *Nested-PCR* para os genes *18S rDNA* utilizando os primers TRY927F e TRY927R, o fragmento amplificado foi de 900 pb. Na segunda reação, utilizando os primers SSU561F e SSU561R, o fragmento amplificado foi de 700 pb. Na análise filogenética dos genes ribossomais, este tripanossoma apresenta-se completamente diferente das espécies de *Trypanosomas* descritas e próxima de *Trypanosoma* sp. KG1 e *Trypanosoma caninum*.

**Armazenamento:** Culturas axênicas destes tripanossoma estão criopreservadas em DMSO 10%, armazenadas em nitrogênio líquida a – 196<sup>0</sup>C e depositadas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ.

## **CAPÍTULO II**

**ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (PROTOZOA:  
KINETOPLASTIDA) ORIUNDO DE *Amblyomma brasiliense*  
(ACARI: IXIDIDAE)**

## RESUMO

Parasitas do gênero *Trypanosoma* são microrganismos que apresentam ampla variedade morfológica, biológica e genética. O presente estudo descreve pela primeira vez o um isolado do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente o carrapato *Amblyomma brasiliense*. Os carrapatos foram coletados de um espécime de *Tayassu pecari* (Queixadas) oriundo do Parque Nacional de Itatiaia, município de Itatiaia, RJ. O isolado foi caracterizado através de análises moleculares, morfométricas e biológicas. As culturas de *Trypanosoma* foram obtidas através do macerado do corpo total do carrapato e propagado em linhagem celular IDE8, mantidas meio de cultivo L15B, incubadas em estufas bacteriológicas a 32°C. O isolado apresentou um bom rendimento de propagação em meio L15B nas temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C. A cultura permaneceu estável com mais de 14 passagens de propagação em cultura axênica com meio L15B à temperatura de 30 °C. A criopreservação da cultura do isolado apresentou viabilidade após descongelamento pelo armazenamento em nitrogênio líquido. Foi realizada a curva de crescimento e análise das formas evolutivas dos isolados em meio axênico e nas linhagens celulares IDE8 e DH82. A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sa rDNA* comprovaram a autenticidade dessas novas espécies. As sequências nucleotídicas descritas foram depositadas no *Genbank*. A microscopia eletrônica de varredura e análise morfométrica revelaram ampla diversidade morfológica da espécie denominadas que foi denominada de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. cepa C1RJ. A citometria de fluxo associada à microscopia de fluorescência comprovou a internalização de ambos os isolados de Tripanosomatídeos em células das linhagens IDE8 e DH82 mesmo com a inibição da fagocitose celular. Aspectos relacionados à patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo e mecanismos de transmissão ainda são desconhecidos. Portanto, serão necessários mais estudos para o conhecimento de aspectos do ciclo biológico de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.

**Palavras chaves:** *Trypanosoma amblyommi* sp. nov., *Amblyomma brasiliense*, propagação *in vitro*.

## ABSTRACT

Parasites of the genus *Trypanosoma* are microorganisms that present a wide morphological, biological and genetic variety. The present study describes for the first time the one isolate of the genus *Trypanosoma* naturally infecting the tick *Amblyomma brasiliense*. The ticks were collected from a specimen of *Tayassu pecari* (Queixadas) from the Itatiaia National Park, Itatiaia, RJ. The isolate was characterized by molecular, morphometric and biological analyzes. *Trypanosoma* cultures were obtained by maceration of the whole body of the tick and propagated in cell line IDE8, maintained L15B culture medium, incubated in bacteriological stoves at 32°C. The isolate showed a good propagation yield in L15B medium at temperatures of 30 ° C, 32 ° C and 34 ° C. The culture remained stable with more than 14 propagation passages in axenic culture with L15B medium at 30 ° C. Cryopreservation of the culture of the isolate showed viability after thawing by storage in liquid nitrogen. The growth curve and analysis of the evolutionary forms of the isolates in the axenic medium and the cell lines IDE8 and DH82 were performed. The analysis of the nucleotide sequences obtained with targets directed to the 18S rDNA and 24S $\alpha$  rDNA region confirmed the authenticity of these new species. The described nucleotide sequences were deposited with Genbank. Scanning electron microscopy and morphometric analysis revealed wide morphological diversity of the so-called species of *Trypanosoma amblyommi* sp. Nov. Strain C1RJ. Flow cytometry associated with fluorescence microscopy confirmed the internalization of both *Trypanosomatid* isolates in cells from the IDE8 and DH82 lines even with the inhibition of cellular phagocytosis. Aspects related to pathogenicity, involvement with vertebrate hosts, epidemiology, evolutionary cycle and transmission mechanisms are still unknown. Therefore, further studies will be needed to understand aspects of the biological cycle of *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.

**Keywords:** *Trypanosoma amblyommi* sp. nov., *Amblyomma brasiliense*, *in vitro* propagation.

## 1 INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Trypanosoma*, pertencentes a família *Trypanosomatidae* apresentam complexa classificação taxonômica devido a ampla variedade morfológica, biológica e molecular. Análises morfológicas e biológicas são fundamentais para estudo de novas espécies e para o conhecimento do ciclo biológico do parasito. Diversas espécies do Gênero *Trypanosoma* são agentes etiológicos de doenças transmitidas para o ser humano e animais, estimulando o interesse por esses protozoários (HOARE, 1972).

O presente estudo descreve um novo isolado do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente carrapatos da espécie *Amblyomma brasiliense* parasitando um espécime de *Tayassu pecari* (Queixada), proveniente do Parque Nacional de Itatiaia, RJ. Apesar do carrapato *Amblyomma brasiliense* serem agressivos para os seres humanos se desconhece a capacidade vetorial de agentes etiológicos para doenças transmitidas à seres humanos ou mesmo para animais (ARAGÃO, 1936).

Foi elaborada a caracterização molecular da espécie através do sequenciamento e análise filogenética dos genes *18S rDNA* e *24Sa rDNA*. Foram realizadas curvas de crescimento em cultivo axênico e nas linhagens de células de carrapato IDE8 e de macrófago DH82, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência para a avaliação da internalização e fagocitose celular e a microscopia eletrônica de varredura. Os objetivos foram a descrição de nova espécie do gênero *Trypanosoma* oriundas de carrapatos naturalmente infectados através da caracterização molecular, análises morfológica e biológica.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As únicas etapas da metodologia que se diferenciam das etapas descritas no Capítulo I são as descritas a baixo.

### 2.1. Origem dos carrapatos *Amblyomma brasiliense*

Um espécime de *Tayassu pecari* (Queixadas), adulto, fêmea de pelagem preta encontrado morto na Cachoeira Itaporani, do Parque Nacional de Itatiaia, município de Itatiaia, RJ e foi encaminhado pelo diretor do Parque à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para uma necropsia. O animal foi mantido por aproximadamente 24 horas em refrigerador (2 a 8° Celsius) até o momento da necropsia.

Foram encontrados 6 animais mortos e suspeita-se que ao fugirem de outro animal predador, caíram de cima da cachoeira com 10 a 12 metros de altitude. (Figura 35). O laudo da necropsia (Anexo I) atestou que os achados macroscópicos foram compatíveis com fraturas vertebrais e hemorragias cavitárias. Quadro compatível com trauma.

Durante a necropsia foi observado uma alta infestação por carrapatos do gênero *Amblyomma*. Oito carrapatos vivos foram coletados e levados ao LDP para a identificação morfológica segundo Barros-Battesti et al. (2006) para adultos (Figura 36 a) e Martins et al. (2008) para ninfas (Figura 36b). As larvas coletadas foram identificadas apenas como sendo do gênero *Amblyomma* e todas as ninfas e adultos foram identificados como pertencentes à espécie *Amblyomma brasiliense*.



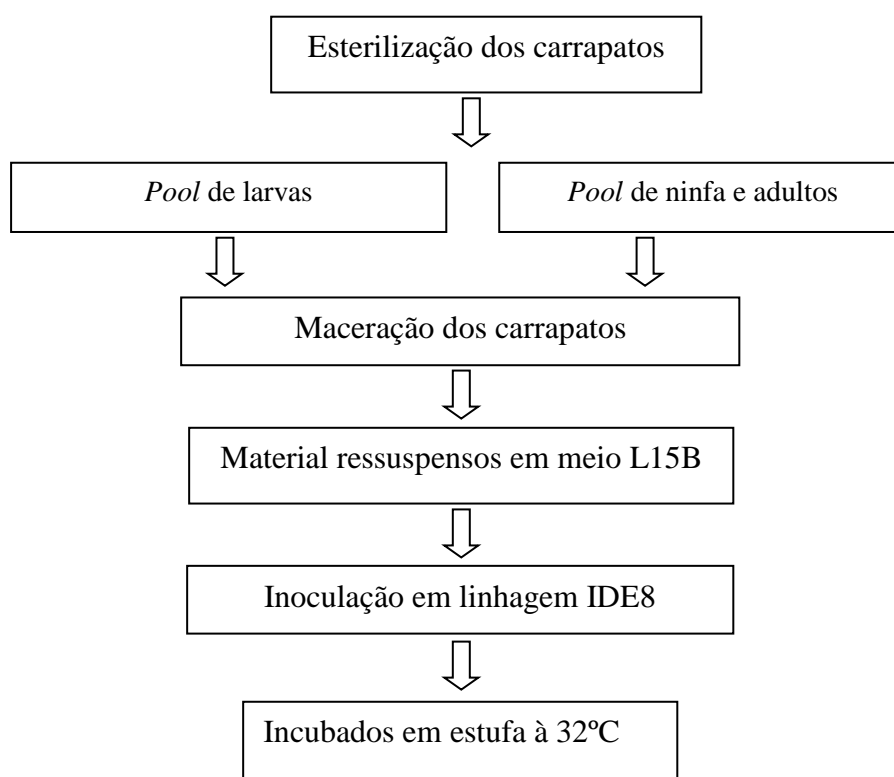
**Figura 35.** *Tayassu pecari* adultos encontrados mortos na Cachoeira Itaporani, do Parque Nacional de Itatiaia. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz.



**Figura 36.** (A) Infestação por *Amblyomma brasiliense* adultos na parte ventral do terço cranial do membro pélvico esquerdo, (B) larvas e ninfas na parte ventral de pavilhão auricular esquerdo. Fotos cedidas: Dr. Hermes Luz.

## 2.2. Isolamento do tripanosomatídeo de *Amblyomma brasiliense*

Após a esterilização, os carrapatos da espécie *Amblyomma brasiliense* foram separados em dois *pools* de quatro carrapatos cada, sendo um pool de larvas e o segundo *pool* composto de ninfas e adultos. Os *pools* foram separadamente macerados por pressão com o auxílio de um pistilo de vidro. Os macerados de carrapatos foram ressuspensos em 5 mL de meio Leibovitz's L-15B (Sigma®), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies®), 10% de caldo de triptose fosfatada (Sigma®), 0,1% de lipoproteína bovina concentrada (Biomedicals®), 1% de L-Glutamina (200 mM) (Sigma®) e solução de antibióticos a 1% de penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL) (Sigma®). Os inóculos foram realizados em um frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Kasvi®) contendo uma monocamada homogênea da 116<sup>0</sup> passagem da linhagem celular IDE8 (MUNDERLOH et al., 1994) e mantidos em estufa a 32<sup>0</sup>C (Figura 37).



**Figura 37.** Fluxograma dos procedimentos para isolamento do Tripanosomatídeo oriundo de *Amblyomma brasiliense*.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento

Do *pool* de 4 carrapatos adultos e ninfas vivos de *A. brasiliense* e após o inóculo em monocamada de cultura de célula IDE8 o aparecimento das formas típicas de *Trypanosoma* se deu a partir do 7º DPI.

As culturas permaneceram estável com mais de 10 passagens de propagação em cultura axênica com meio L15B à temperatura de 30°C. A criopreservação dos isolados apresentaram viabilidade após descongelamento pelo armazenamento em nitrogênio líquido.

#### 3.2. Incubação em diferentes temperaturas e meios de cultivo

Não foi possível a propagação dos isolados nos seguintes meios de cultura: MEM, DMEM, M199, BHI, BHI suplementado com ágar sangue, *Schneider's insect Medium*. Parasitos letárgicos a partir do segundo dia de cultivo e 100% de formas degeneradas foram visualizadas a partir do 7º DPI.

O isolado não apresentou viabilidade de propagação quando submetido a temperaturas de 26°C, 28°C e 37°C. Parasitos letárgicos a partir do segundo dia de cultivo e 100% de formas degeneradas foram visualizadas a partir do 7º DPI. Já a incubação a 30°C, 32°C e 34°C demonstraram viabilidade de propagação com formas evolutivas apresentando boa motilidade e crescimento.

#### 3.3. Análise morfométrica de Tripanosomatídeo isolado de *Amblyomma brasiliense*

A forma evolutiva epimastigota apresentou maior comprimento do corpo em média (Tabela 8) e a forma esferomastigota a menor média de comprimento total do corpo. O comprimento do flagelo livre apresentou médias próximas entre as formas epimastigota e tripomastigota, (Tabela 9) sendo a forma esferomastigota (Tabela 10) de maior comprimento do flagelo livre. Os diâmetros do núcleo e do cinetoplasto das três formas evolutivas não apresentaram muita diferença em média. A média da distância da extremidade posterior e a metade do diâmetro do núcleo ficaram próximas entre as formas epimastigota e tripomastigota, sendo bem inferior na forma esferomastigota. O valor médio da distância da metade do diâmetro do núcleo a metade do diâmetro do cinetoplasto foi próximo nas formas três formas evolutivas epimastigotas e esferomastigotas. A forma epimastigota apresentou maiores valores médios na distância da extremidade posterior a metade do diâmetro do cinetoplasto e da distância da extremidade anterior a metade do diâmetro do núcleo e inferior na esferomastigota.

**Tabela 8.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas epimastigotas do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense*.

	Comprimento Total	Posterior – cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo-anterior	Flagelo livre	Posterior-núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	41,72	15,47	1,18	15,61	10,74	14,59	1,84	1,23
Valor máximo	60,87	27,74	2,08	29,18	17,59	26,99	2,50	2,37
Valor mínimo	24,20	7,38	0,67	8,06	5,81	8,03	1,11	0,52
Desvio padrão	8,85	4,26	0,38	5,12	2,90	4,09	0,37	0,39

**Tabela 9.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas tripomastigotas do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense*.

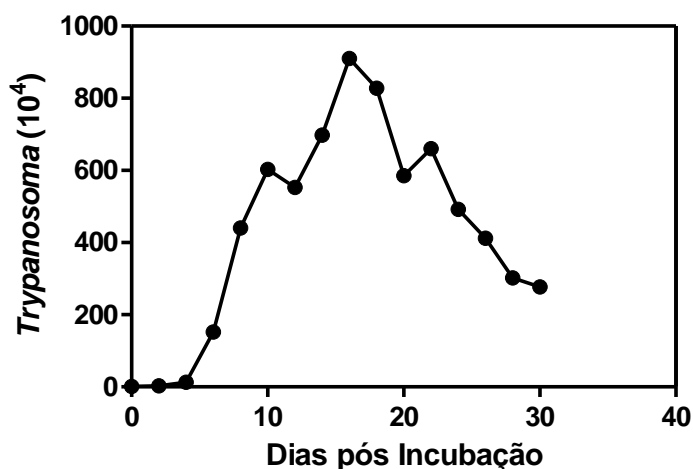
	Comprimento Total	Posterior-cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo - anterior	Flagelo livre	Posterior-núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	35,81	12,30	1,39	11,06	10,76	13,28	1,75	1,09
Valor máximo	56,16	21,82	3,92	26,03	19,34	22,52	3,33	1,86
Valor mínimo	25,42	7,17	0,94	5,68	4,06	8,19	1,21	0,64
Desvio padrão	7,60	3,56	0,47	4,10	2,92	3,61	0,40	0,25

**Tabela 10.** Medidas biométricas ( $\mu\text{m}$ ) das formas esferomastigotas do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense*.

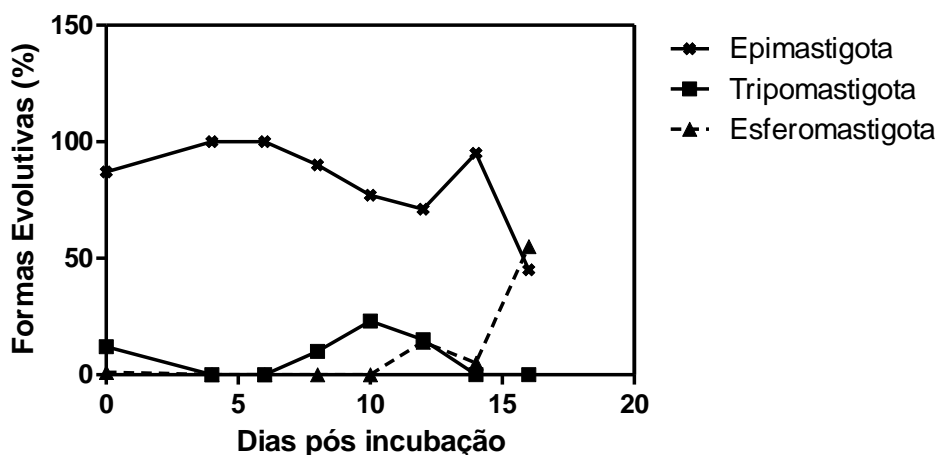
	Comprimento Total	Posterior - cinetoplasto	Cinetoplasto – núcleo	Núcleo - anterior	Flagelo livre	Posterior-núcleo	Núcleo	Cinetoplasto
Média	19,44	3,26	1,45	5,55	11,61	3,32	1,71	1,05
Valor máximo	36,82	6,40	3,89	15,83	22,18	13,80	2,82	1,89
Valor mínimo	7,98	1,01	0,28	0,23	3,31	0,12	0,73	0,35
Desvio padrão	5,92	1,48	0,80	4,61	4,88	2,18	0,49	0,31

### 3.4. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas em cultivo axênico de *Trypanosomatídeo* isolado de *Amblyomma brasiliense*

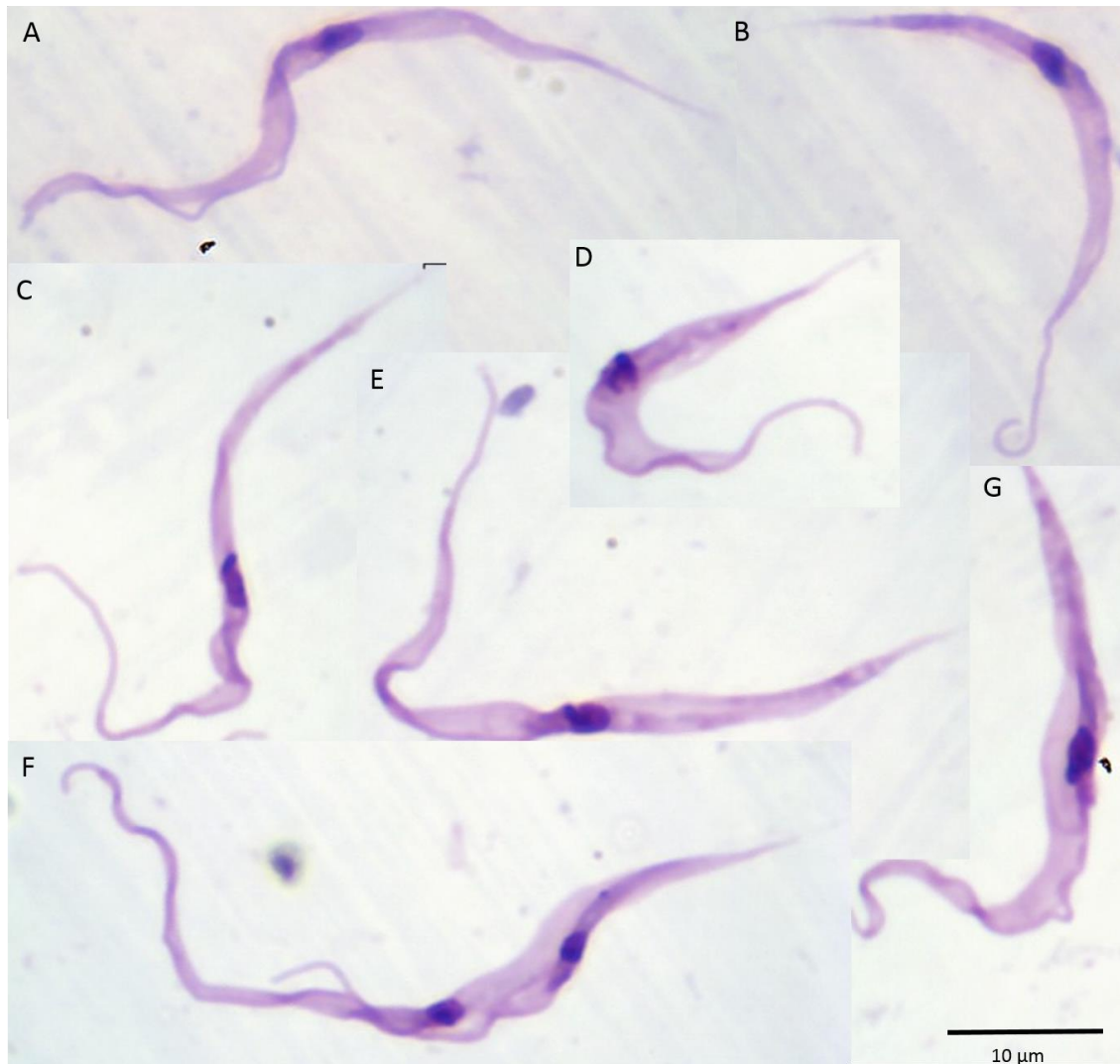
A curva de crescimento (Figura 38) foi iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1,0 \times 10^4$  parasitos /mL sendo 87% de formas epimastigotas típicas com corpo alongado, extremidade posterior bem afilada e cinetoplasto anterior e próximo ao núcleo. A forma de tripomastigota com comprimento do corpo em média menor que a forma epimastigota e cinetoplasto posterior ao núcleo, representava 12% e 1% de formas esferomastigotas (Figura 39). O pico de crescimento foi visualizado no 16º dia com  $910 \times 10^4$  parasitos /mL. No 30º DPI com predominou a visualização de forma degeneradas. As formas evolutivas estão registradas nas Figuras 40 e 41 em cultivo axênico.



**Figura 38.** Curva de crescimento do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* em cultivo axênico.

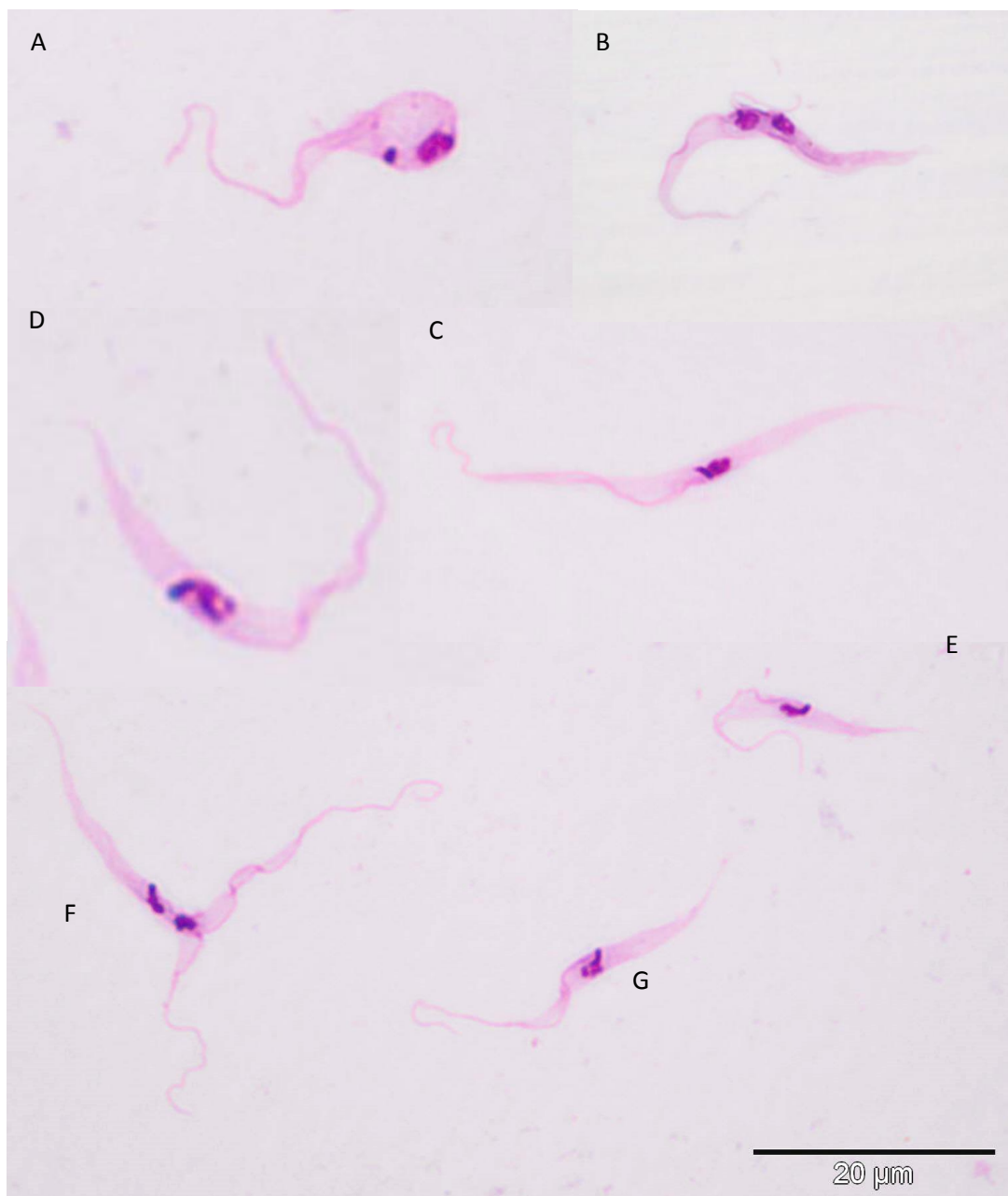


**Figura 39.** Análise de formas evolutivas do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* em cultivo axênico.



**Figura 40.** Fotomicrografia da diversidade morfológica do *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* em cultivo axênico. Forma epimastigota (A, B, D, E); forma em transição para tripomastigota (C) e forma em divisão (F, G). Coloração Gimesa, 4<sup>o</sup> dia de cultivo axênico.



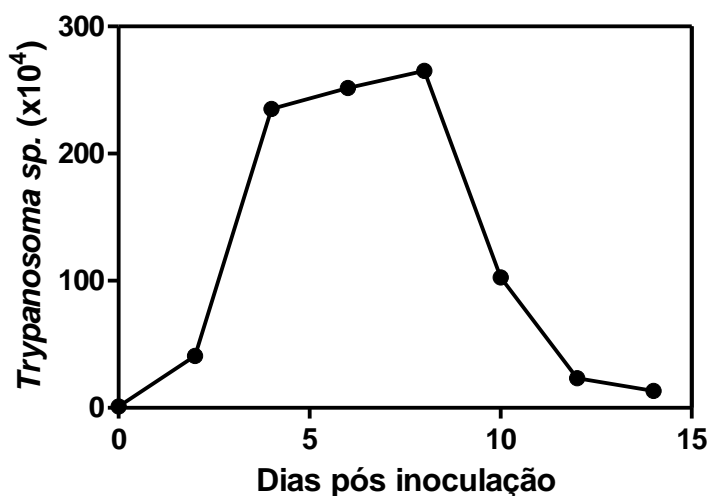


**Figura 41.** Fotomicrografia de *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense*. Esferomastigota (A); forma em divisão (B, F); epimastigota (C) e forma em transição para tripomastigota (D, E, G). Coloração Gimesa, 6º dia de cultivo axênico.

### 3.5. Curva de crescimento e análise das formas evolutivas de *Trypanosoma amblyommi* em cultivo celular

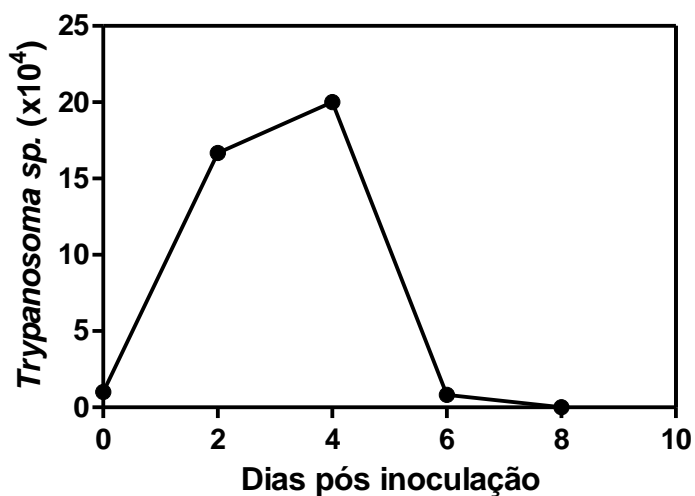
A curva de crescimento obtida em cultivo na linhagem IDE8 (figuras 42) iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1,0 \times 10^4$  parasitos/mL com 85% de formas epimastigotas com corpo alongado e extremidade posterior bem afilada, 3% de formas

tripomastigotas, 5% de formas esferomastigotas (Figura 45). O isolado apresentou o pico de crescimento até o 8° DPI com uma média predominante de epimastigotas clássicas. Foram visualizadas apenas formas degeneradas no 14° DPI.

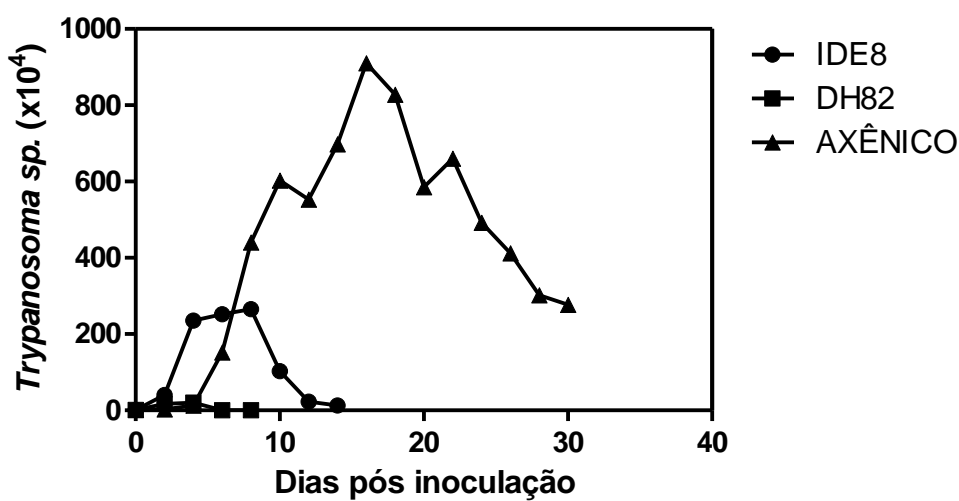


**Figura 42.** Curva de crescimento de *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* em células IDE8.

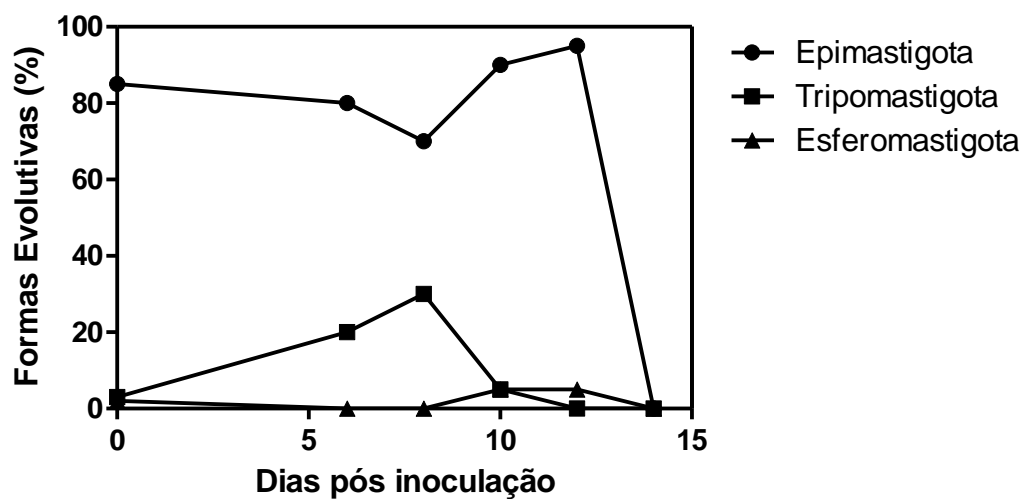
A curva de crescimento obtida em cultivo na linhagem DH82 foi avaliada até o 8° DPI (Figura 43) e iniciada com um inóculo (dia 0) de  $1,0 \times 10^4$  parasitos/mL com 70% de formas epimastigotas, 5% de formas tripomastigotas, 15% de formas esferomastigotas. O isolado apresentou o pico de crescimento no 4° DPI. Foi visualizado o predomínio em toda a curva das formas epimastigotas. Os perfis de crescimento e análise das formas evolutivas de *Trypanosoma* sp. isolado de *A. brasiliense* em IDE8, DH82 e cultivo axênico estão representadas nas Figuras 44 e Tabela 11. O perfil das formas evolutivas de *Trypanosoma* sp. isolado de *A. brasiliense* na linhagem DH82 (Figura 46).



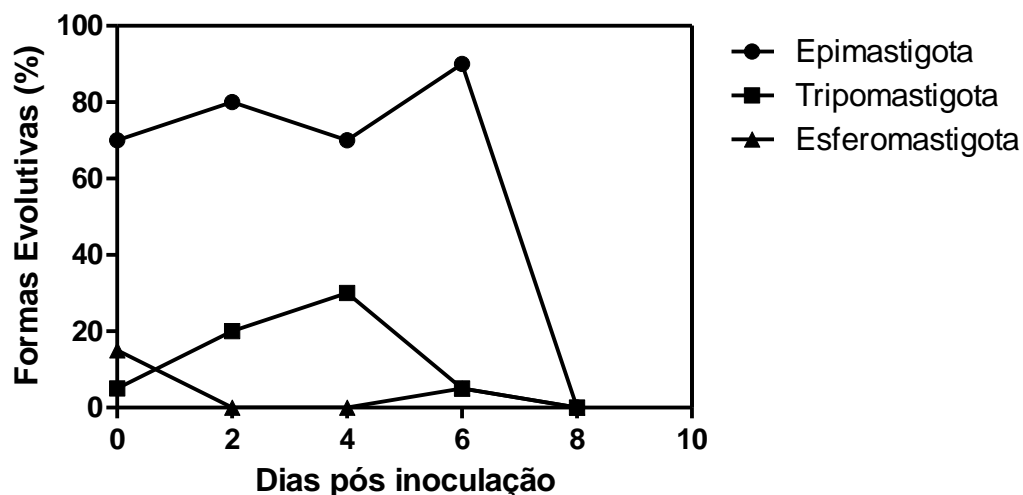
**Figura 43.** Curva de crescimento de *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* em células DH82.



**Figura 44.** Perfil de crescimento *Trypanosoma sp.* isolado de *Amblyomma brasiliense* em IDE8, DH82 e cultivo axênico.



**Figura 45.** Perfil das formas evolutivas de *Trypanosoma sp.* isolado de *Amblyomma brasiliense* na linhagem IDE8.



**Figura 46.** Perfil das formas evolutivas de *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* na linhagem DH82.

**Tabela 11.** Número de parasitos x 10<sup>4</sup>/mL em cada dia de avaliação das curvas de crescimento de *Trypanosoma* sp. isolado de *Amblyomma brasiliense* nas linhagens IDE8, DH82 e cultivo axênico.

Dias Pós-infecção	Cultivo axênico	IDE8	DH82
0	1,00	1,00	1,00
2	2,50	40,80	16,67
4	13,33	235,00	20,00
6	151,67	251,67	0,83
8	440,83	265,00	0,00
10	603,33	102,67	-
12	552,50	23,33	-
14	698,33	13,33	-
16	910,00	-	-
18	828,33	-	-
20	585,00	-	-
22	660,00	-	-
24	492,17	-	-
26	411,67	-	-
28	301,67	-	-
30	276,67	-	-

### 3.6. Análise molecular

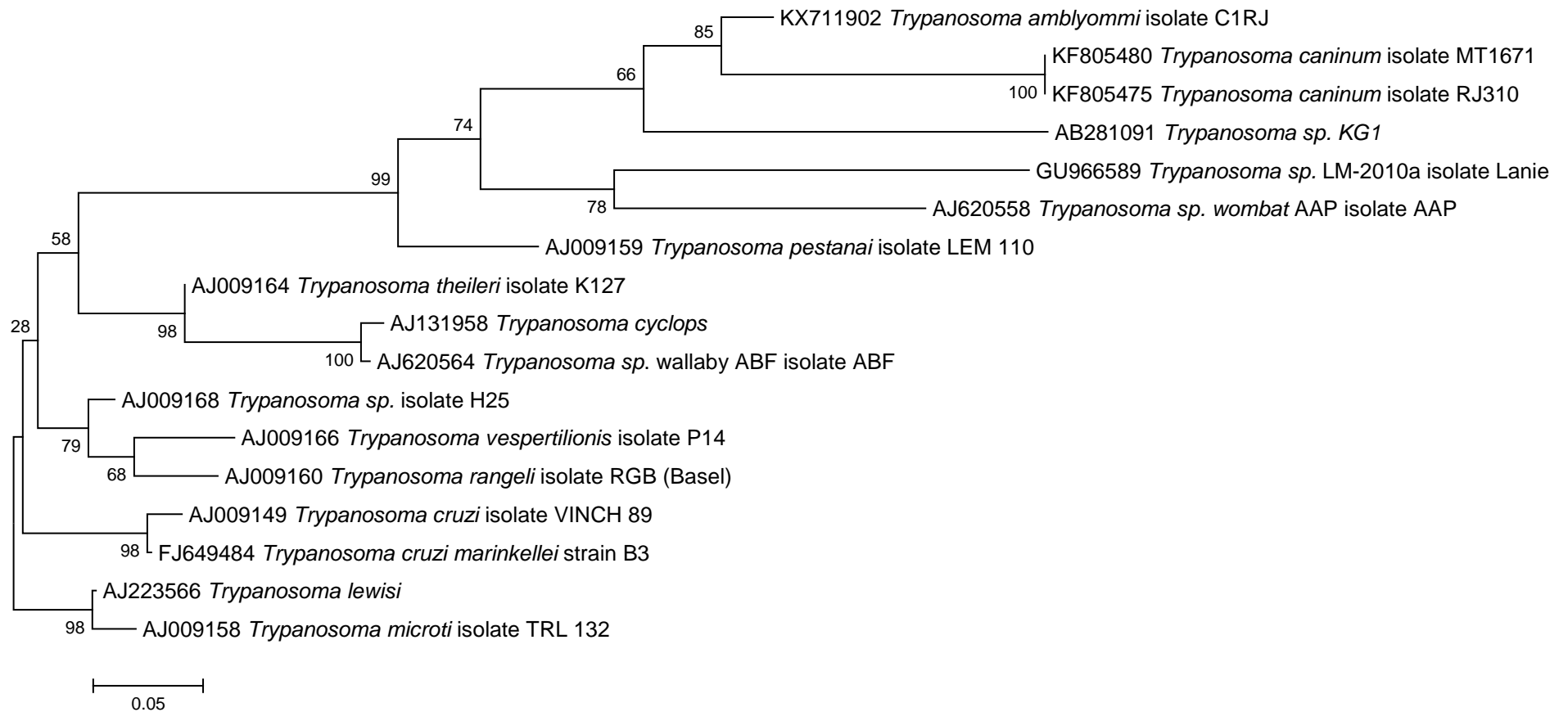
Na Nested-PCR para o alvo molecular *18S rDNA* a primeira reação o tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 900pb o isolado. Na segunda reação o tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 700pb para o isolado.

A sequência parcial do gene *18S rDNA* apresentou similaridade de 88% com *Trypanosoma KGI* (número de acesso AB281091) analisando 99% da query Sequence. Apresentou também 90% de similaridade (com e-value 2 e-133) que alinhou com 60% da sequência (query coverage 60%) de *Trypanosoma caninum* (número de acesso JF951431, JF9075537).

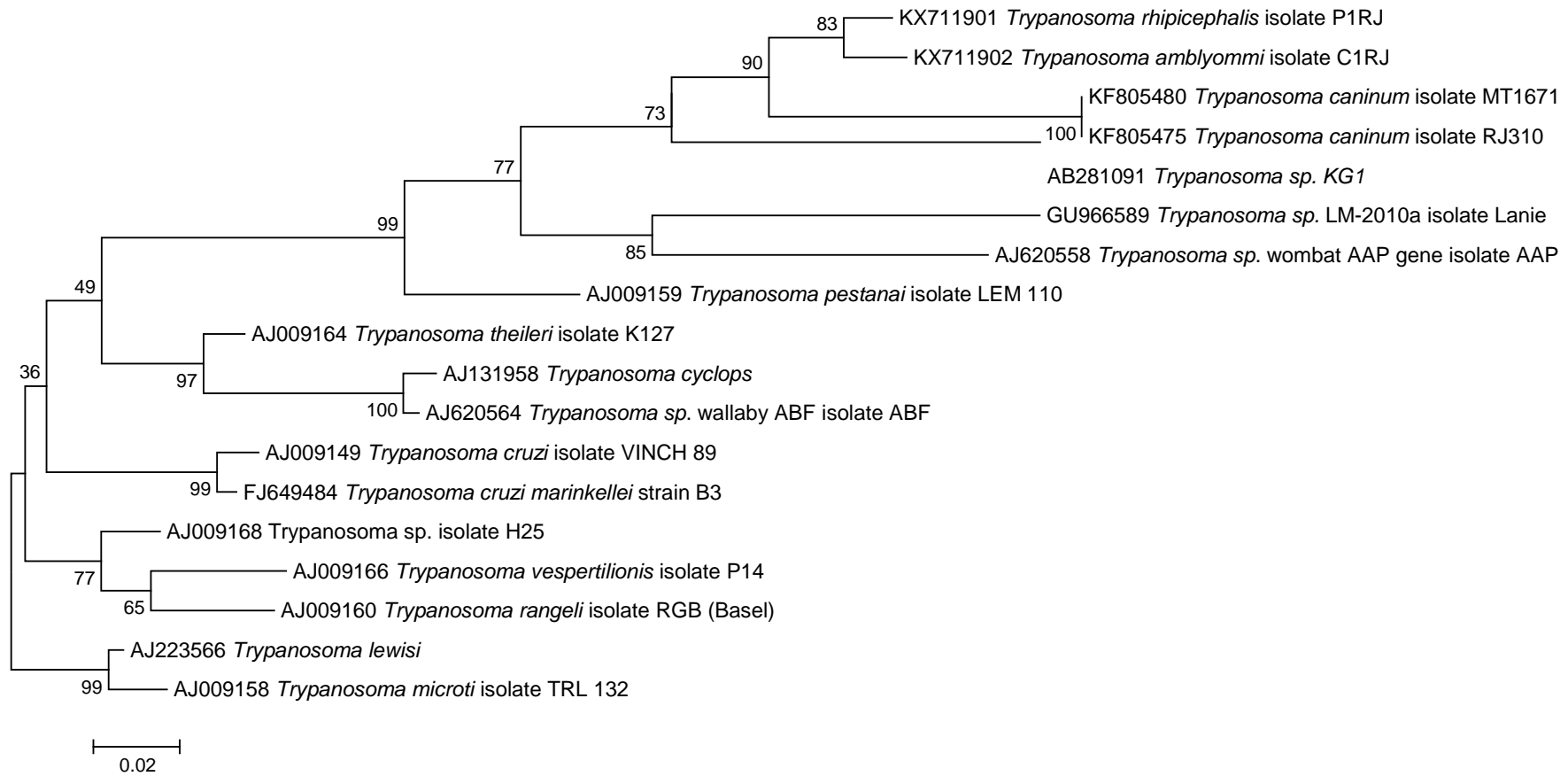
Na PCR para o alvo molecular *24Sα rDNA* a reação utilizando os primers D75 e D76 o tamanho do fragmento amplificado foi de 270 pb para ambos os isolados.

Para o gene *24S rDNA* (Figura 48) houve similaridade de 96% com *Trypanosoma rangeli* (query coverage 63% *GenBank* KJ742907), *Trypanosoma grosi* AKHA (query coverage 65% *GenBank* AB175624).

Na análise filogenética tendo como alvo molecular o gene *18S rDNA* (sequência conservada dentro da família Trypanosomatidae) confirma que o isolado de *A. brasiliense* pertence à família Trypanosomatidae (Figura 47). A árvore filogenética mostra que a espécie está dentro do clado, próximo ao *Trypanosoma caninum* e ao *Trypanosoma KGI*. A análise das sequências nucleotídicas obtidas com produtos de amplificação com alvo dirigido para a região *18S rDNA*, comprovou a autenticidade dessas novas espécies. As sequências nucleotídicas descritas foram submetidas no *GenBank* e a espécie foi denominada de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. cepa C1RJ.



**Figura 47.** Árvore filogenética de *Trypanosoma amblyommi* baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood –Modelo Kimura 2-parameter. Bootstrap: 1000.



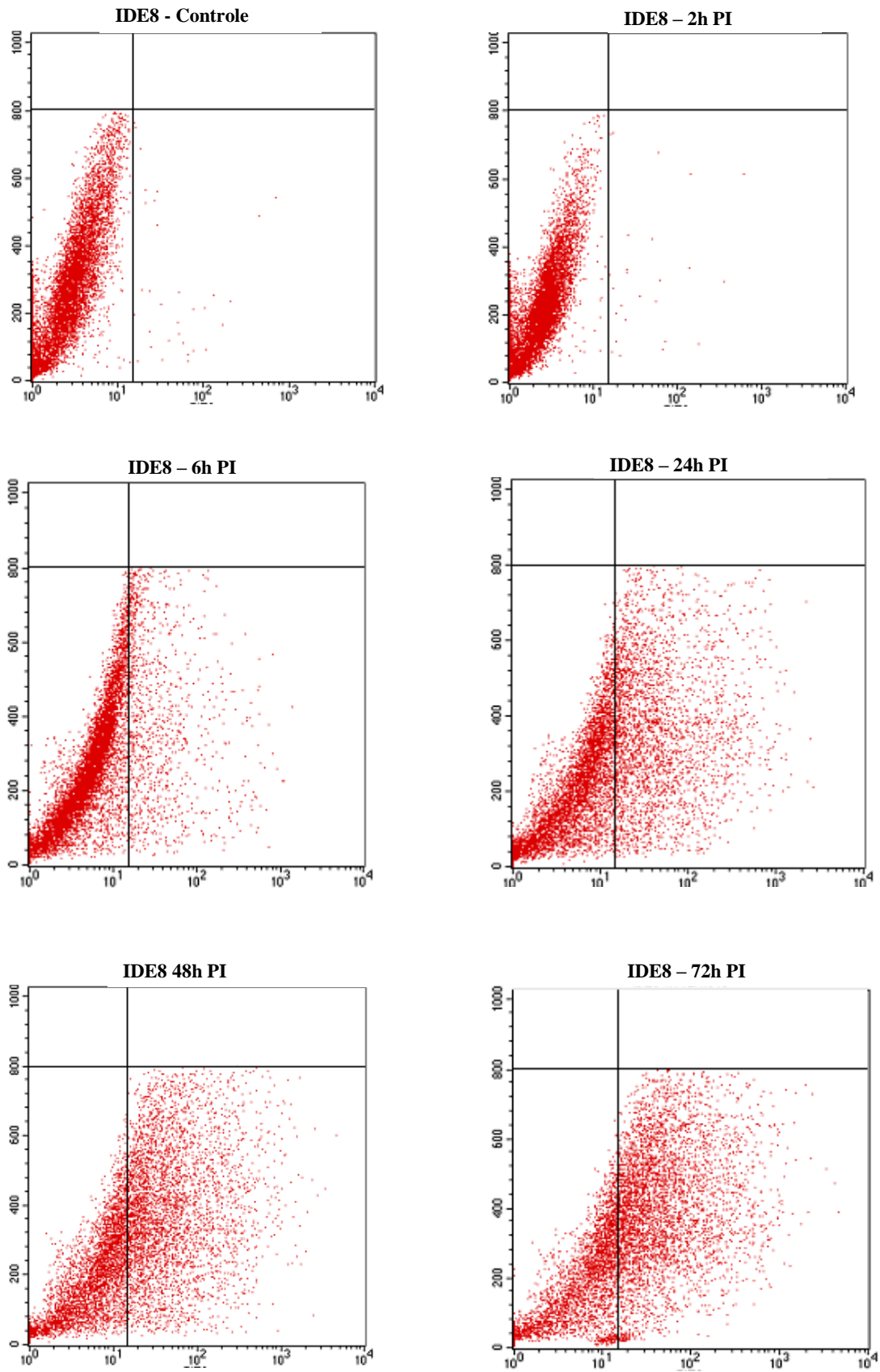
**Figura 48.** Árvore filogenética de *Trypanosoma rhipicephalis* e *Trypanosoma amblyommi* baseada na análise das sequências de 18S rDNA. Método Estatístico Maximum Likelihood – Modelo Tamura-nei. Bootstrap: 1000

### 3.7. Internalização de *Trypanosoma amblyommi* em células IDE8 E DH82

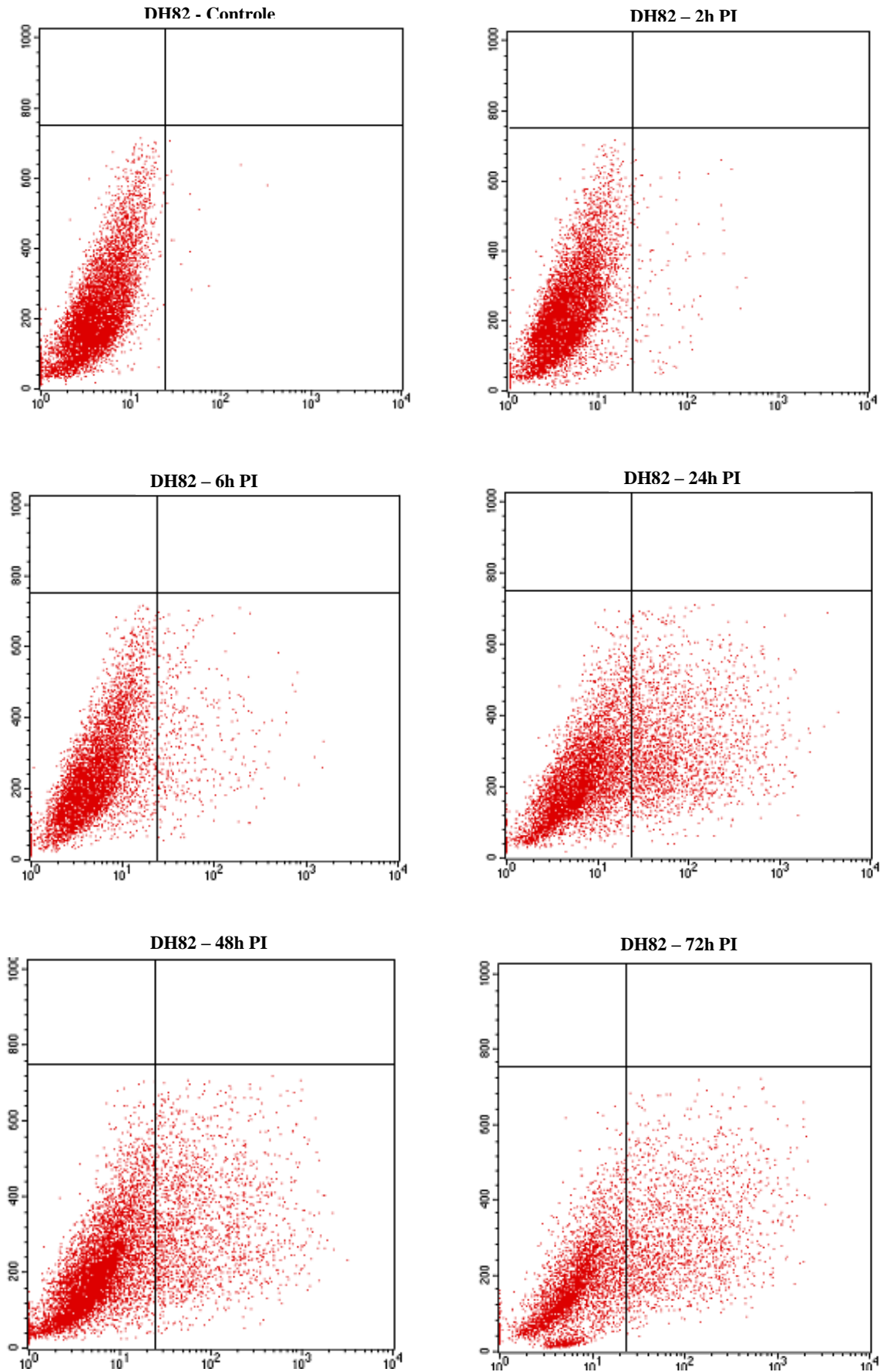
Através da citometria de fluxo foi quantificada a interação de *T. rhipicephalis* às linhagens IDE8 (Figura 49) e DH82 (Figura 50) e a sua internalização visualizada nas microscopias de fluorescência.

Foram visualizados diferentes percentuais de infecção nas linhagens de células IDE8 e DH82 avaliadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67. Sendo o percentual de células infectadas crescente em todos os tempos de avaliação na linhagem IDE8. Foi realizado um controle com células não infectadas de cada uma das linhagens. Após 2 horas de infecção com *T. amblyommi* a citometria de fluxo, associada a visualização por microscopia de fluorescência, revelou um percentual de infecção da linhagem IDE8 de 0,26% e 1,11% na linhagem DH82. Depois de 6 horas do inóculo foi possível observar, através da microscopia de fluorescência, em ambas as linhagens celulares diversas células muito infectadas, os percentuais de infecção aumentaram para 9,38% e 4,88% nas linhagens IDE8 e DH82, respectivamente. Após 24 horas de infecção o percentual de infecção na linhagem IDE8 foi de 29,15% e 25,07% na linhagem DH82. Já com 48 horas pós-infecção a linhagem IDE8 apresentou 45,87% de infecção e um decréscimo no percentual de infecção foi observado na linhagem DH82 17,29% das células infectadas. Após 72 horas do inóculo os percentuais de infecção foram de 53,46% e 27,95% nas linhagens IDE8 e DH82, respectivamente. A Figura 51 e Tabela 12 registram os percentuais de infecção por *T. amblyommi* nas linhagens IDE8 e DH82.





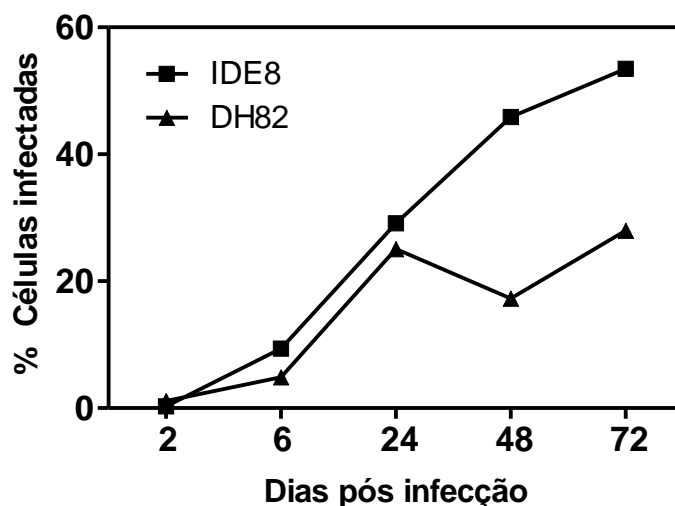
**Figura 49.** Citometria de fluxo mostrando a infecção da linhagem IDE8 por *Trypanosoma amblyommi* marcado com PKH67.



**Figura 50.** Citometria de fluxo mostrando a infecção da linhagem DH82 por *Trypanosoma amblyommi* marcado com PKH67.

**Tabela 12.** Percentual de infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com PKH67 nas linhagens IDE8, DH82 e controle.

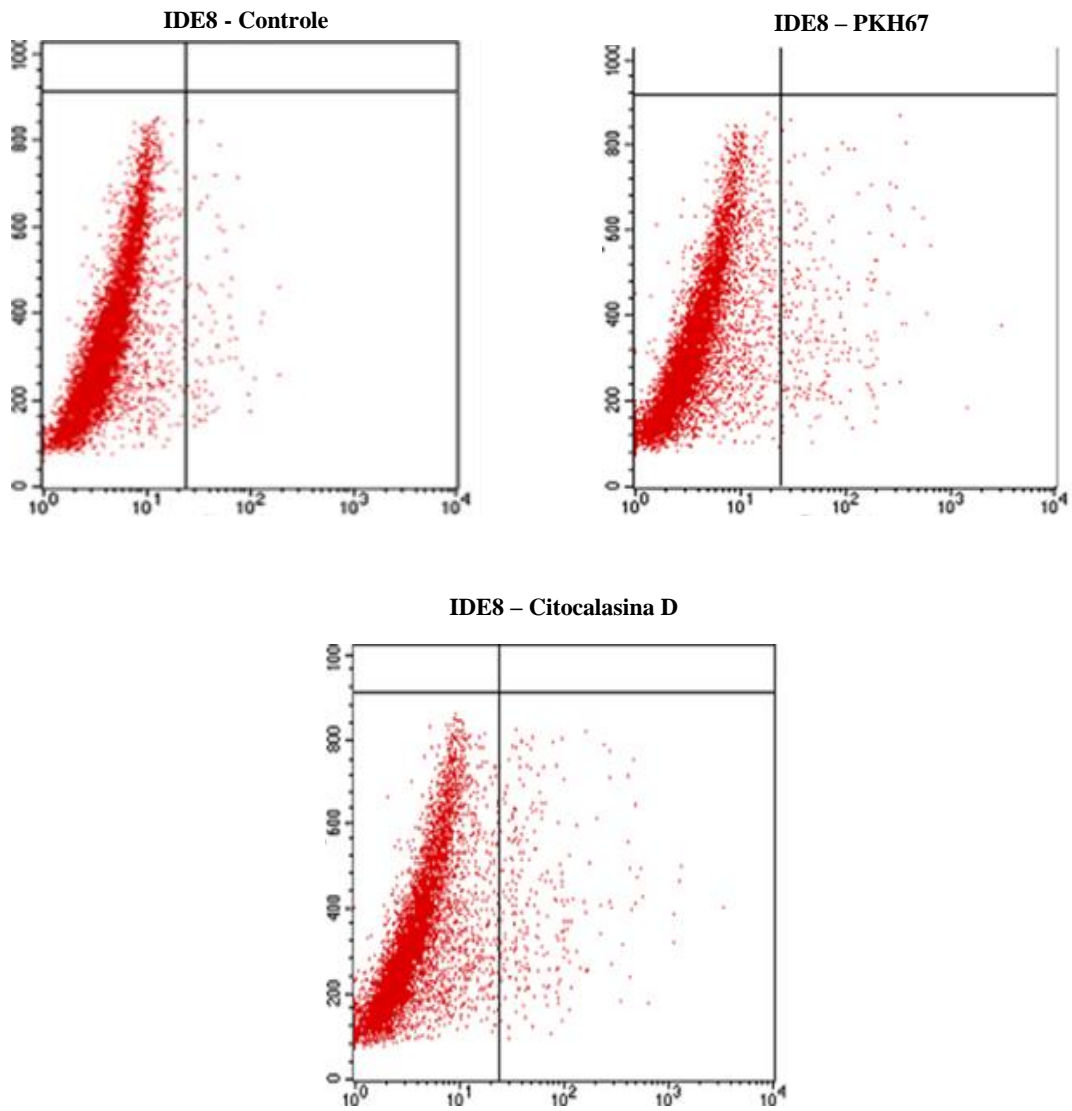
	Controle	2h PI	6h PI	24h PI	48h PI	72h PI
IDE8 infectadas	0,03%	0,26%	9,38%	29,15%	45,87%	53,46%
DH82 infectadas	0.01%	1.11%	4.88%	25.07%	17.29%	27.95%



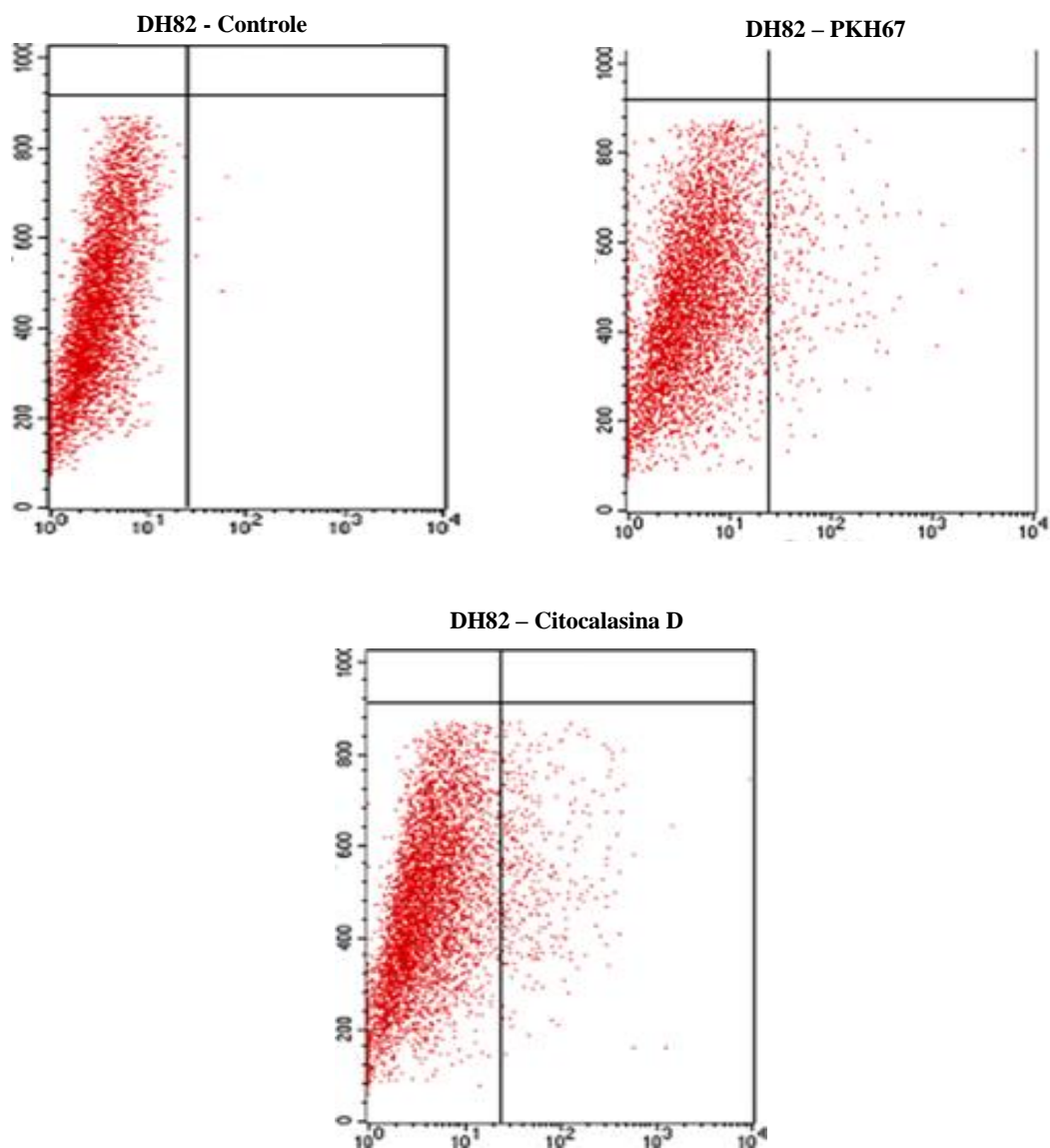
**Figura 51.** Percentual de infecção por *Trypanosoma amblyommi* nas linhagens IDE8, DH82.

### 3.8. Mecanismo de invasão celular de *Trypanosoma amblyommi*

Foi quantificada, com auxílio da citometria de fluxo a interação de *T. amblyommi* às linhagens IDE8 (Figura 52) e DH82 (Figura 53) com e sem a inibição da fagocitose através da citocalasina D. Foram realizados controles com células não infectadas de cada linhagem. Diferentes percentuais de infecção foram detectados nas linhagens de células IDE8 e DH82, avaliadas 4 horas pós-infecção por *T. amblyommi* com e sem o uso da citocalasina D. Foi detectada infecção celular mesmo com a inibição da fagocitose. O percentual de infecção por *T. amblyommi* com e sem o tratamento por citocalasina nas linhagens IDE8, DH82 estão registradas nas Figura 54 e Tabela 13.



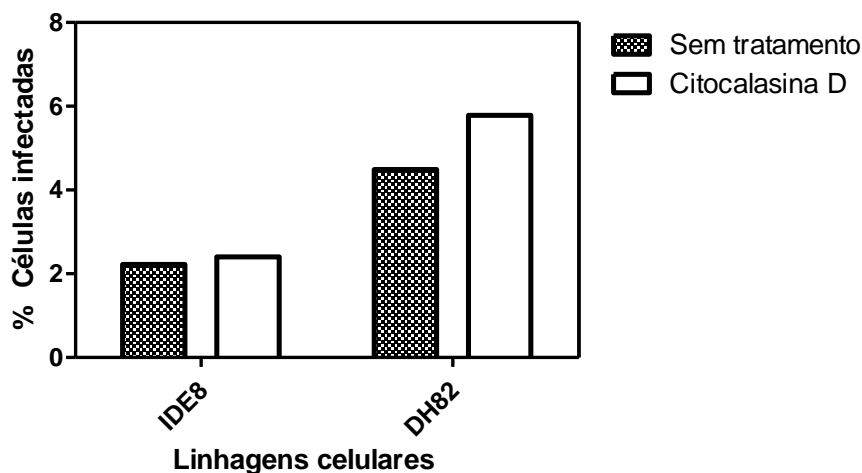
**Figura 52.** Citometria de fluxo mostrando a internalização de *Trypanosoma amblyommi* com e sem a citocalasina D na linhagem IDE8.



**Figura 53.** Citometria de fluxo mostrando a internalização de *Trypanosoma amblyommi* com e sem a citocalasina D na linhagem DH82.

**Tabela 13.** Percentual de infecção por *Trypanosoma amblyommi* com e sem o tratamento por citocalasina nas linhagens IDE8, DH82 e controle.

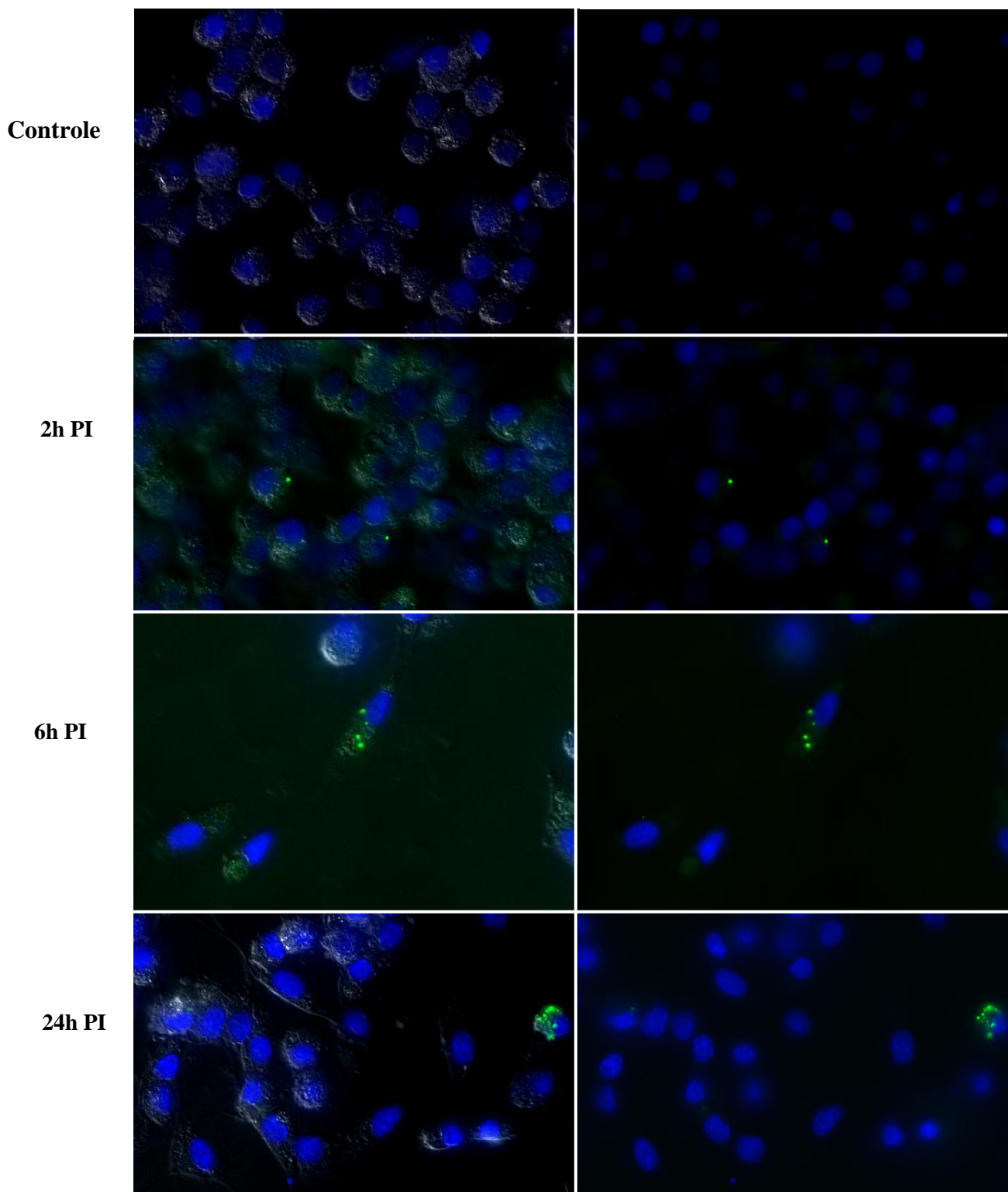
	Controle	PKH	Citocalasina
IDE8	0,66%	2,22%	2,40%
DH82	0,07%	4,49%	5,78%



**Figura 54.** Percentual de infecção por *Trypanosoma amblyommi* com e sem o tratamento por citocalasina D nas linhagens IDE8, DH82.

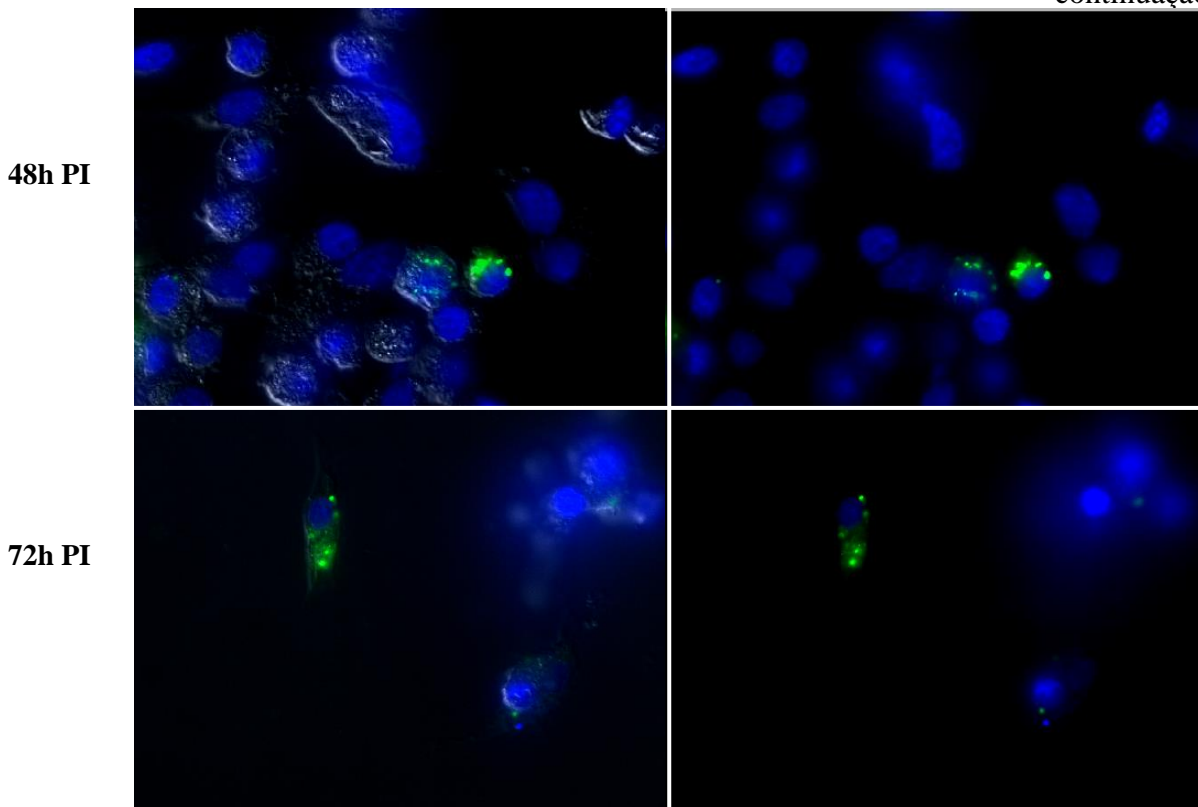
### 3.9. Microscopia de fluorescência de *Trypanosoma amblyommi*

Foram observadas em microscópio de fluorescência, células infectadas das linhagens IDE8 e DH82 coradas com DAPI e infectadas por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67 a partir de duas horas da infecção (Figuras 55, 56 e 57). Células muito infectadas foram visualizadas a partir de 24 horas de infecção nas duas linhagens presentes no estudo. Foi observada perda acentuada da confluência das monocamadas das linhagens IDE8 e DH82 a partir de 72 horas pós infecção.

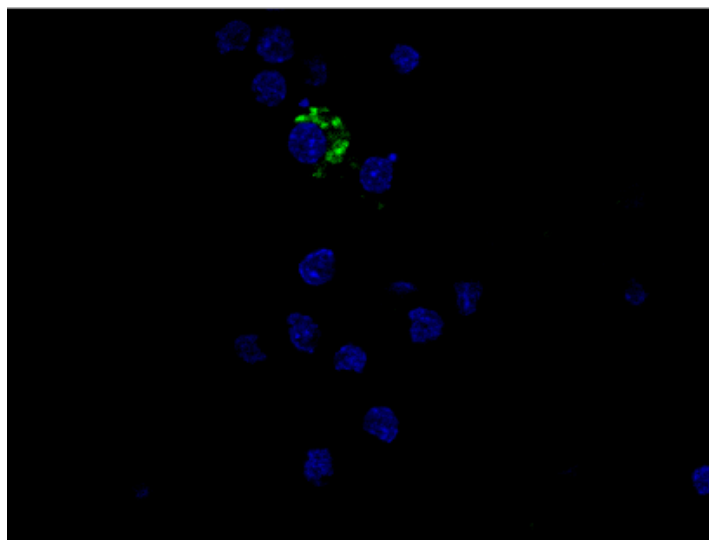


**Figura 55.** Linhagem IDE8 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67 e observado em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala representa 50 $\mu$ m. (\*continua)

\*continuação

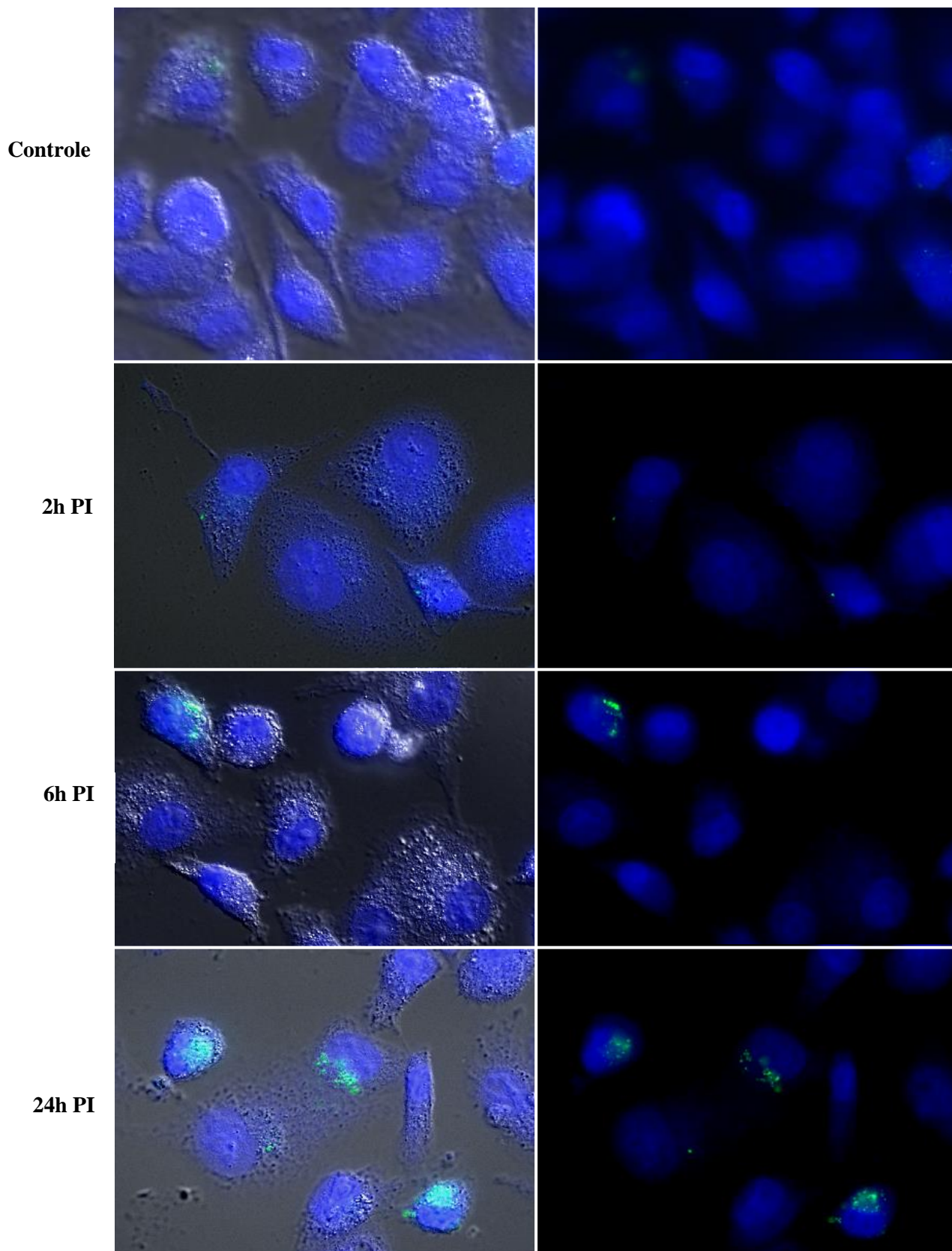


**Figura 55.** Linhagem IDE8 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67 e observado em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala representa 50µm.



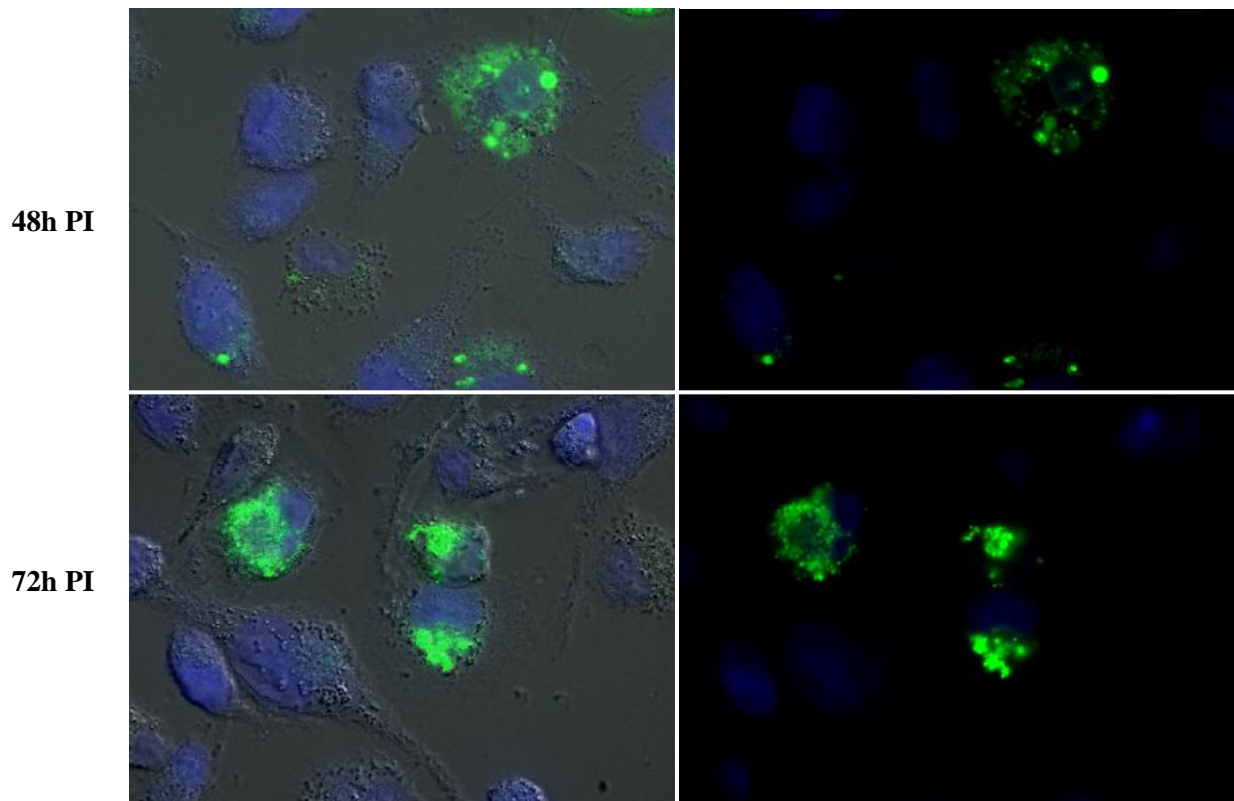
**Figura 56.** Linhagem IDE8 corada com DAPI e infectada com *Trypanosoma amblyommi*, marcado com o fluoróforo PKH67 e observada 48 horas pós-infecção em microscópio confocal, aumento de 630x. A barra de escala representa 50µm.





**Figura 57.** Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala representa 50 $\mu$ m. (\*continua)

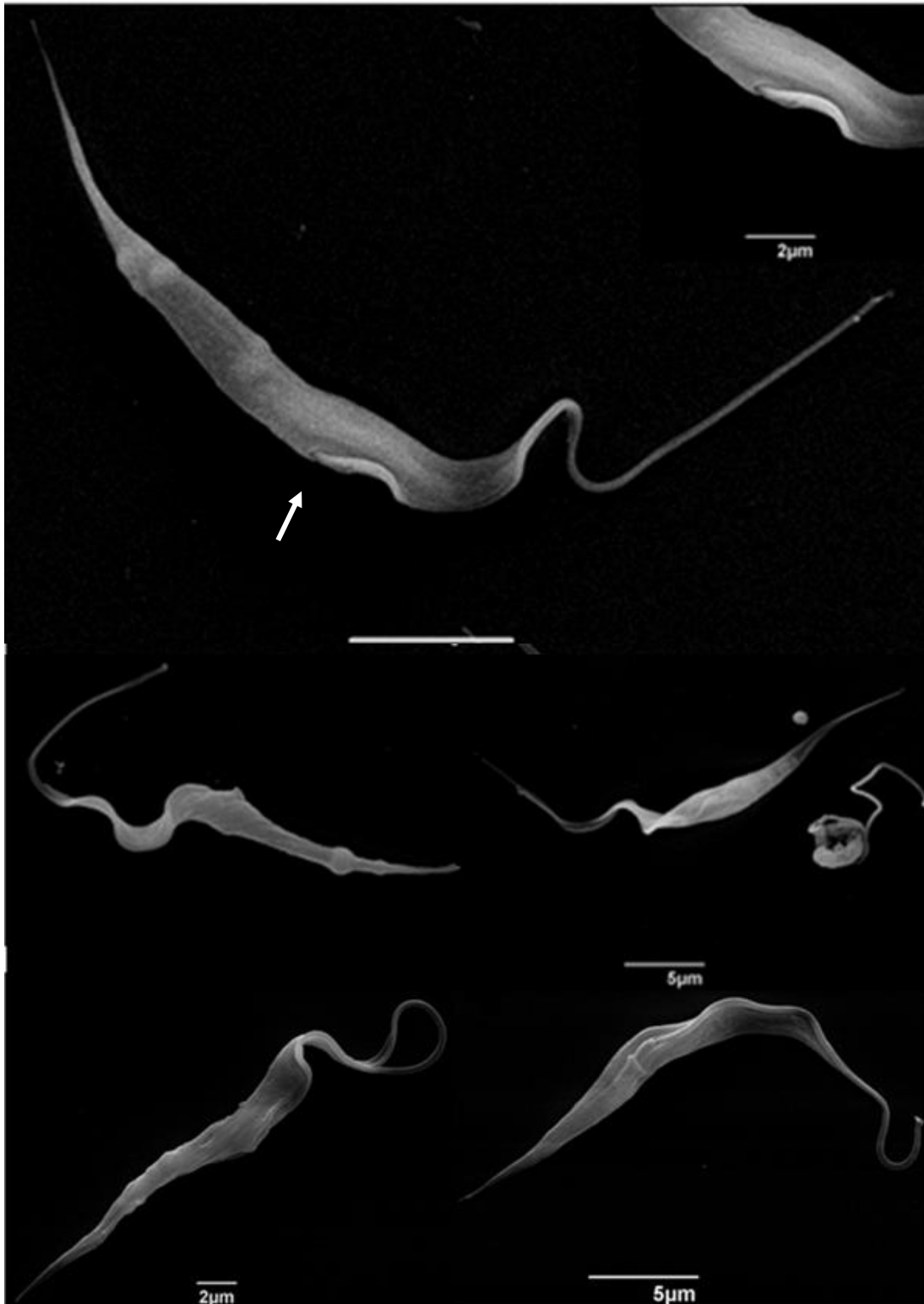
\*continuação



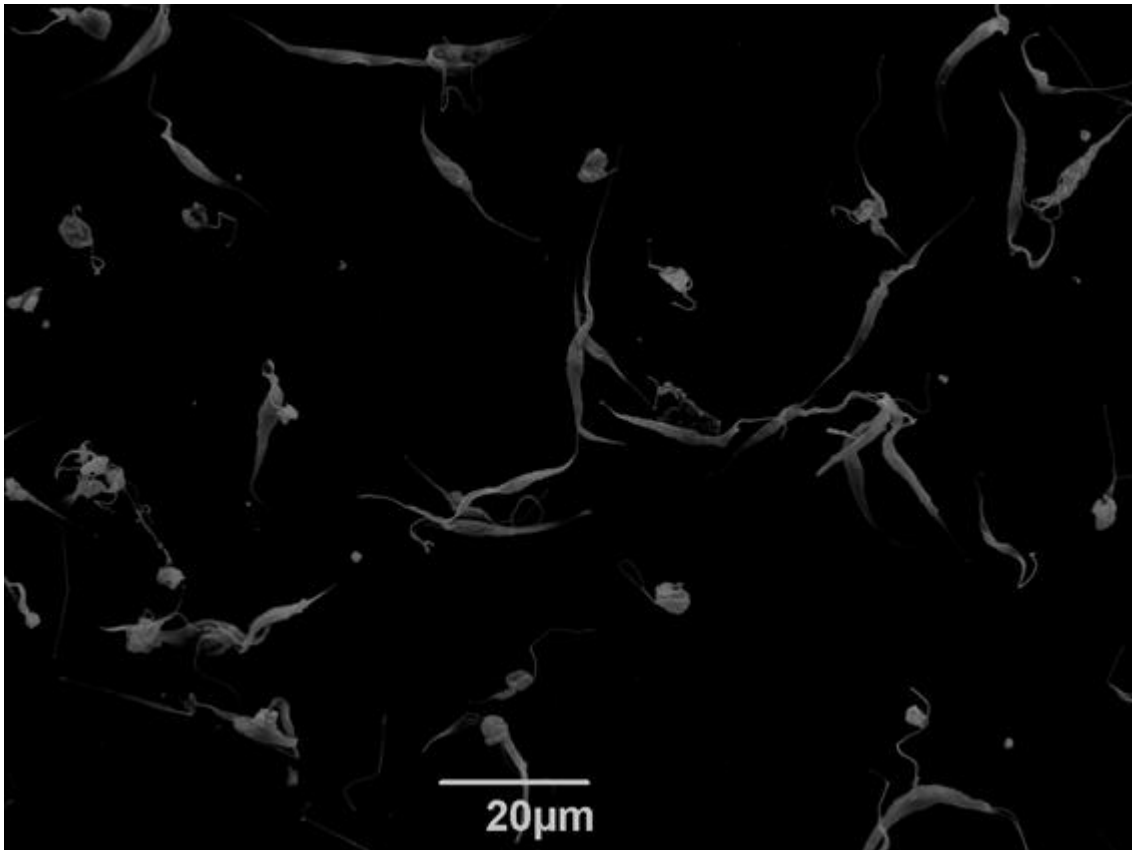
**Figura 57.** Linhagem DH82 coradas com DAPI, controle e observadas em diferentes períodos (horas) pós-infecção por *Trypanosoma amblyommi* marcado com o fluoróforo PKH67 e observada em microscópio de fluorescência, aumento de 630x. A barra de escala representa 50µm.

### 3.10. Microscopia eletrônica de varredura de *Trypanosoma amblyommi*

A microscopia eletrônica de varredura revelou ampla diversidade morfológica. (Figuras 58 e 59). Foram observadas formas epimastigotas de corpo delgado, bolsa flagelar lateral ao corpo e extremidade posterior afilada e alongada.



**Figura 58.** Microscopia eletrônica das formas de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (C1RJ), cultura de 6 dias. Formas epimastigotas, bolsa flagelar (detalhe).



**Figura 59.** Microscopia eletrônica da diversidade morfológica de *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (C1RJ), cultura de 6 dias.

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve um novo isolado do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente carrapatos da espécie *Amblyomma brasiliense* parasitando um espécime de *Tayassu pecari* (Queixada), proveniente do Parque Nacional de Itatiaia, RJ. A nova espécie foi denominada *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. O carrapato *A. brasiliense* Aragão (1908) é endêmico na América do Sul (GUGLIELMONE et al., 2003). O homem é muito atacado por esta espécie, mas ainda se desconhece sua capacidade vetorial de bioagentes para seres humanos ou mesmo para animais (ARAGÃO, 1936). O isolado foi realizado a partir de ninfas e adultos. Sendo relatados por estudos que larvas e ninfas de *A. brasiliense* estão entre os carrapatos mais agressivos para os seres humanos no Brasil (ARAGÃO, 1936). Apesar do isolamento de *Trypanosoma* a partir do macerado total do carrapato não podemos afirmar se a origem desse protozoário é do tayassuídeo ou se ocorre a multiplicação desse organismo no hospedeiro invertebrado, sendo o carrapato vetor do agente isolado. Entretanto, o tempo de espera de 3 dias (Coleta ao dia de inoculação) sugere que a sobrevivência deste microrganismo é dependente deste artrópode.

O espécime de *Tayassu pecari* (Queixada) apresentava um bom escore corporal e uma alta infestação por carrapatos do gênero *Amblyomma*. O laudo da necropsia atestou quadro compatível com trauma com achados macroscópicos compatíveis com fraturas vertebrais e hemorragias internas. Não apresentou nenhum indício de lesão causada pela infecção por Trypanosomatídeos.

A curva de crescimento de melhor desempenho ocorreu em condições axênicas de cultivo, sem competição pelo meio de cultivos com as linhagens celulares. Nos cultivos em linhagem celular IDE8 e DH82 o isolado apresentou características morfológicas clássicas do gênero *Trypanosoma* e as formas evolutivas epimastigotas, tripomastigotas e esferomastigotas. Apesar do relato em estudos anteriores que a variação morfológica extensa ocorre entre os estágios do ciclo de vida serem resultado do desenvolvimento de mecanismos de adaptação a cada uma dessas condições de cultivo (HOARE, 1972), ocorreu o predomínio das formas epimastigotas nas condições de cultivo celular e axênico. Assim como a variação de temperatura, que não se mostrou um fator importante para a diferenciação das formas evolutivas dos *Trypanosoma*. Algumas espécies se multiplicam no hospedeiro vertebrado no meio intracelular na forma de amastigota, como exemplo *T. cruzi*, no sangue na forma tripomastigota como *T. brucei* ou na forma de epimastigota como as espécies do subgênero *Megatrypanum*. A multiplicação observada neste estudo ocorreu sob a forma de epimastigota.

Outro fato interessante foi a inviabilidade de propagação de *T. amblyommi* quando submetidos às temperaturas de incubação e meios de cultura convencionais para cultivo de *Trypanosoma*. O meio de melhor desenvolvimento do *Trypanosoma* ocorreu no L15B, meio usado para cultivo de células de carrapato.

A avaliação morfométrica revelou ampla diversidade morfológicas. *T. amblyommi* apresentou grandes dimensões, como pôde-se observar no comprimento total da forma tripomastigota, com média de 35,81µm sendo assim maior que linhagens de *T. vivax* (RAMIREZ et al., 1997), *T. cruzi* (MADEIRA et al., 2009) e *T. evansi* (ELSHAFIE et al., 2013), *T. rangeli* (MADEIRA et al., 2009) embora menor que *T. theileri* (WINK, 1979) e *T. caninum* (MADEIRA et al., 2009). Ampla variação também foi observada em outras medidas, como na distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto, na distância entre núcleo e porção anterior e da região posterior ao núcleo.

A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sa rDNA* comprovaram a autenticidade dessa nova espécie. Na análise filogenética com alvo molecular o gene *18S rDNA*, o isolado apresenta-se dentro de um mesmo clado junto com *T. caninum* e *Trypanosoma KG1*. Na análise filogenética, o alvo molecular do gene *24Sa rDNA* de *T.* dentro de um mesmo clado, junto o *T. caninum*. *Trypanosoma KG1* foi descrito após isolamento em *Hemaphysalis hystricis* naturalmente infectados no Japão. A proximidade filogenética entre *T. amblyommi* e *Trypanosoma KG1* pode estar relacionada ao fato de ser um *Trypanosoma* também isolado de carrapato naturalmente infectado (THEKISOE et al., 2007). Já a proximidade filogenética com a espécie *T. caninum* pode se basear na possibilidade dessa espécie ser transmitida por carrapatos, embora ainda se desconheça o vetor de *T. caninum*.

A Citometria de fluxo associada a microscopia de fluorescência comprovou a internalização de ambos os isolados de Tripanosomatídeos em células das linhagens IDE8 e DH82 mesmo com a inibição da fagocitose celular. O potencial infeccioso do *Trypanosoma* com a internalização por penetração ativa sugere que possa ocorrer alguma fase intracelular do seu ciclo de vida. Como descrito em estudos recentes que comprovam de estágios evolutivos intracelulares em *T. theileri* usando diversas linhagens celulares (LEE et al., 2013).

A microscopia eletrônica de varredura revelou ampla diversidade morfológica da espécie descrita. Entretanto como a espécie descrita é nova, para o conhecimento mais detalhado das formas evolutivas como clássicas ou de transição, são necessárias observações por microscopia eletrônica de varredura em diferentes fases da cultura e associadas a microscopia eletrônica de transmissão.

O presente estudo descreveu uma nova espécie do gênero *Trypanosoma* com aspectos relacionados à patogenicidade, envolvimento com hospedeiros vertebrados, epidemiologia, ciclo evolutivo, mecanismos de transmissão, classificação e taxonomia ainda são desconhecidos. São necessários mais estudos sobre as relações filogenéticas, patogenicidade, transmissão, novos isolados e microscopia eletrônica de transmissão para o conhecimento de aspectos do ciclo biológico do recém isolado *T. amblyommi*.

## 5 DIAGNÓSTICO

**Nome:** *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.

**Hospedeiro mamífero:** Possivelmente *Tayassu pecari* (Queixada).

**Localidade:** Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

**Vector:** Possivelmente o carrapato *Amblyomma brasiliense*.

**Biologia e morfologia:** Esta espécie foi isolada em co-cultivo com células IDE8 e cresce bem em meio L15B disponíveis comercialmente suplementados com soro fetal de vitelo (FCS). Os estágios evolutivos encontrados em culturas axênicas foram epimastigotas (predominantemente), tripomastigotas, esferomastigotas. A média do comprimento total do corpo na forma epimastigota foi 41,72 µm, flagelo livre 10,74 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto 1,23 µm. Medida do comprimento total do corpo na forma tripomastigota foi em média 35,81 µm, flagelo livre 10,76 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto 1,09 µm. A média do comprimento total do corpo na forma esferomastigota foi de 19,44 µm, flagelo livre com 11,61 µm e eixo longitudinal do cinetoplasto com 1,05 µm.

**Características moleculares:** Este *Trypanosoma* apresenta produtos amplificados para o gene *24Sa rDNA* de cerca de 250 pb utilizando *primers* D75 / D76. Na primeira reação da *Nested-PCR* para o gene *18S rDNA* utilizando os *primers* TRY927F e TRY927R, o fragmento amplificado foi de 900 pb. Na segunda reação, utilizando os *primers* SSU561F e SSU561R, o fragmento amplificado foi de 700 pb. Na análise filogenética dos genes ribossomais, este *trypanosoma* apresenta-se completamente diferente das espécies de *trypanosomas* descritas e próxima de *Trypanosoma KG1* e *Trypanosoma caninum*.

**Armazenamento:** Culturas axênicas destes *Trypanosoma* estão criopreservadas em DMSO a 10%, armazenadas em nitrogênio líquido a - 196°C e depositadas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), localizado no Anexo I do Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

- São descritos dois novos isolados do gênero *Trypanosoma* infectando naturalmente carrapatos das espécies *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma brasiliense*, denominadas de *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. e *Trypanosoma amblyommi* sp. nov.
- A análise das sequências nucleotídicas obtidas com alvos dirigidos para a região *18S rDNA* e *24Sα rDNA* comprovaram a autenticidade dessas novas espécies.
- Nas condições axênicas de cultivo, em meio L15B, as duas espécies de *Trypanosoma* apresentaram bom desenvolvimento e propagação *in vitro*.
- A Citometria de fluxo associada a microscopia de fluorescência comprovou a internalização de ambos os isolados de Tripanosomatídeos em células das linhagens IDE8 e DH82 mesmo com a inibição da fagocitose celular. O potencial infeccioso de *Trypanosoma* com a internalização por penetração ativa sugere que possa ocorrer alguma fase intracelular do seu ciclo de vida.
- A microscopia eletrônica de varredura e análise morfométrica revelaram ampla diversidade morfológica das duas espécies descritas no presente estudo.



## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; SOARES, H. S.; KRAWCZAK, F. S.; VIEIRA, F. T.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial infection. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3-4, p. 66-69, 2016.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª Ed. Artes Médicas Ed., Porto Alegre, 2002. 1548p.

ALMEIDA, A.B.; SOUSA, V.R.; SORTE EDA, E.; FIGUEIREDO, F.B.; PAULA D.A., PIMENTEL, M.F; DUTRA, V.; MADEIRA, M.F. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1555-1560, 2011.

ANDRADE, S. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Cell Biology*, v. 5, n. 3, p. 133-137, 1995.

ARAGÃO, H. B. Algumas novas espécies de carrapatos brasileiros. **Brasil-médico**, v. 22, n. 12, p. 111-115, 1908.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-841, 1936.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. In: (Ed.). **Ticks and tick-borne pathogens**: Springer, 2003. p. 55-68.

BARROS-BATTESTI, D.N.; ARZUA, M.; BECHARA, J.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan. 2006. 223p.

BARROS, J.; TOMA, H.; MADEIRA, M. Molecular study of *Trypanosoma caninum* isolates based on different genetic markers. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 777-783, 2015.

BASTIN, P.; MACRAE, T.H.; FRANCIS, S.B.; MATTHEWS, K.R.; GULL, K. Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 12, p. 8191-8200, 1999.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOVIN, E.F.; GOULD, E. A.; JOMGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-bone disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BOSE, R.; HEISTER, N.C. Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in Tabanids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.40, p. 788-792, 1993.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. **The Journal of parasitology**, p. 922-926, 1965.

CESTARI, I.S. **Trypanosoma cruzi e o sistema complemento: mecanismos de ativação e o papel do gene Crit (Complement C2 Inhibitor Trispanning) na resistência à lise em cepas de Classe I e II.** 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., sp. nov., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

DIETRICH, P.; SOARES, M.B.; AFFONSO, M.H.T.; FLOETER-WINTER, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, v. 125, n.1, p. 103-107, 1993.

ELSHAFIE, E.I.; SANI, R.A.; HASSAN, L.; SHARMA, R.; BASHIR, A.; ABUBAKAR, I.A. Active infection and morphometric study of *Trypanosoma evansi* among horses in Peninsula Malaysia. **Tropical Biomedical**, v. 30, n. 3, p. 444-50, 2013.

EPTING, C.L., COATESA, B.M., ENGMANB, D.M. Molecular Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–291, 2010.

FRAGOSO, J.M.V. A long-term study of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) population fluctuations in northern Amazonia—anthropogenic versus “natural” causes. In: SILVIUS, K.M.; BODMER, R.E.; FRAGOSO, J.M.V. (eds.). **People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America.** Columbia University Press, New York, USA. pp. 286-296, 2004.

GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; GUGLIELMONE, A. A. Hallazgo de Trypanosomatidae en la garrapata *Boophilus microplus* en la Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria (B. Aires)**, v. 70, n. 3, p. 134-137, 1989.

GARCÍA, L.; ORTIZ, S.; OSORIO, G.; TORRICO, M. C.; TORRICO, F.; SOLARI, A. Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome B sequence and minicircle analyses. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36578, 2012.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region.** Atalanta: International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases, 2003. 173 p.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitas de Importância Veterinária.** São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 218p.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 37-49, 1998.

HERRERA, H.M.; DAVILA, A.M.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 263-75, 2004.

HOARE, C. The trypanosomes of mammals. **Oxford: Blackwell Scientific Publication** p. 749, 1972.

LATIF, A.A.; BAKHEIT, M.A.; MOHAMED, A.E.E.; ZWEYGARTH, E. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 4, p. 251-256, 2004.

LEE, Y.F.; CHEN, C.C.; CHEN, J.S.; LIN, N.N.; HUNG, Y.W.; WANG, J.M.; et al. Evidence of intracellular stage en *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in non-phagocytic mammalian cells. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3, p. 228-239, 2013.

LI, J.B.; GERDES, J.M.; HAYCRAFT, C.J.; FAN, Y.; TESLOVICH, T.M.; MAY-SIMERA, H.; LI, H.; BLACQUE, O.E.; LI, L.; LEITCH, C.C.; LEWIS, R.A.; GREEN, J.S.; PARFREY, P.S.; LEROUX, M.R.; DAVIDSON, W.S.; BEALES, P.L.; GUAY-WOODFORD, L.M.; YODER, B.K.; STORMO, G.D.; KATSANIS, N.; DUTCHER, S.K. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 541-52, 2004.

LIMA, L.; DA SILVA, F.M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P.B.; TEIXEIRA, M.M. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. **Protist**, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S.A.; AGBO, E.E.; ENGLUND, P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 363-369, 2005.

NALBANTOGLU, S.; KARAER, Z. *Trypanosoma melophagium* in blood cell culture. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v. 55, p. 173-176, 2008.

MADEIRA, M.F.; SOUSA, M.A.; BARROS, J.H.S.; FIGUEIREDO, F.B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; DE PAULA, C.C.; FAISSAL, B.N.S.; FONSECA, T.S.; THOMA, H.K.; MARZOCHI, M.C.A. *Trypanosoma caninum* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology**, v. 136, n. 4, p. 411-423, 2009.

MARTINS, J.R.; LEITE, R.C.; DOYLE, R.L. Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 113-114, 2008.

- MAYER, J.J.; WETZEL, R.M. *Tayassu pecari*. **Mammalian Species**, n. 293, pp. 1-7, 1987.
- SHATKIN, A.A.; BESKINA, S.R.; MEDVEDEGA, G.I.; GROKHOVSKAYA, I.M. Cultivation of the agent of enzootic abortion of sheep in a continuous cell line of tick *Hyalomma* embryonic cells. **Meditsinskaya Parazitologiya a Parazitarnye Bolezni**, v. 46, p. 420-423, 1977.
- MORZARIA, S.P.; LATIF, A.A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A.R. Transmission of a Trypanosoma sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Veterinary Parasitology**, v.19, n.1, p.13-21, 1986.
- MUNDERLOH, U.G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T.J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of Parasitology**, p. 533-543, 1994.
- OSÓRIO, A.L.; MADRUGA, C.R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C.O.; RIBEIRO, L.R.; COSTA, S.C. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 1-13, 2008.
- PASSOS, L.M.F. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 81-86, 2012.
- PEREIRA, P.C.M.; NAVARRO, E.C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, p. 1-17, 2013.
- PINTO, C.M.; KALKO, E.K.; COTTONTAIL, I.; WELLINGHAUSEN, N.; COTTONTAIL, V.M. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rDNA gene for lineage identification. **Infect Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1328-1332, 2012.
- PUDNEY, M.; VARMA, M.G.R.; LEAKE, C.J. Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 5, p. 493-496, 1973.
- PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. – *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica**, v. 62, p. 163-170, 1996.
- RAMÍREZ, L.; DÁVILA, A.; VICTÓRIO, A.; SILVA, R.; TRAJANO, V.; JANSEN, A. Measurements of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 483-484, 1997.
- RAYAT, C.; VASISHTA, R. Wild Rats as Reservoir of *Trypanosoma Lewisi* in Northwest India. **Austin Journal of Pathology and Laboratory Medical**, v. 1, n. 2, p. 3, 2014.

REYNA-HURTADO, R.; NARANJO, E.; CHAPMAN, C.A.; TANNER, G.W. Hunting and the conservation of a social ungulate: the white-lipped peccary *Tayassu pecari* in Calakmul, Mexico. **Fauna & Flora International**, Oryx, v. 44, n.1, p. 89–96, 2009a.

RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M. Ocorrência de *Trypanosoma theileri*, Laveran 1902, em *Boophilus microplus*, no Estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 65-68, 1988.

RIOU, G.; DELAIN, E. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 62, n. 1, p. 210-217, 1968

RODRIGUES, A.C., PAIVA, F., CAMPANER, M., STEVENS, J.R., NOYES, H.A., TEIXEIRA, M.M., Phylogeny of *Trypanosoma* (megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequence. **Parasitology**, v. 132, n.2, p. 215-224, 2006.

SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; GARCIA, M. V.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 43-48, 2008.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 3, p. 374-389, 2002.

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

SIMO, G.; SOBGWI, P. F.; NJITCHOUANG, G. R.; NJIOKOU, F.; KUIATE, J. R.; CUNY, G.; ASONGANYI, T. Identification and genetic characterization of *Trypanosoma congolense* in domestic animals of Fontem in the South-West region of Cameroon. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 66-73, 2013.

SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A. J.; WAYNE, A. F.; MORRIS, K. D.; THOMPSON, R. C. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, p. 1329, 2008.

SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* Based on a Variable Domain from the Large Subunit Ribosomal RNA Gene. **Experimental parasitology**, v. 91, n. 4, p. 306-314, 1999.

SOUZA, W. D. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 313-325, 2008.

VARMA, M.G.R.; PUDNEY, M.; LEAKY, C.J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirus. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 698-706, 1975.

VICKERMAN, K. P The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W. H.R., Evans, D. A. Biology of the Kinetoplastida. New York **Academic Press**, p. 1-34, 1976.

VILLALTA, F.; MADISON, M.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; NDE, P.N.; LIMA, M.F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in bioscience**, v. 13, n. 10, p. 3714-3734, 2008.

VILLAREAL, M.V.; MINGALA, C.N.; RIVERA, W.L. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. **Acta Parasitology**, v. 8, p. 6-12, 2013.

VOTÝPKA J, SZABOVÁ J, RÁDROVÁ J, ZÍDKOVÁ L, SVOBODOVÁ M (2012) *Trypanosoma culicavium* sp. nov. an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, p. 745–754, 2012.

THEKISOE, O.M.M.; HONDA, T.; FUJITA, H.; BATTSETSEG, B.; HATTA, T.; FUJISAKI, K.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystrix* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. **Parasitology**, v. 134, n. 7, p. 967-974, 2007.

URDANETA-MORALES, S. Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. **Tropenmed Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 225-8, 1983.

WINK, M. *Trypanosoma theileri*: in vitro cultivation in tsetse fly and vertebrate cell culture systems. **Int J Parasitol**, v. 9, n. 6, p. 585-9, 1979.

ZICCARDI, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Morphological Features of Trypanosomes from Squirrel Monkeys from the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 301-301, 1998.

## 8 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

SETOR DE ANATOMIA PATOLÓGICA

### LAUDO DE NECROPSIA N 120/15

**ESPÉCIE:** Queixada (*Tayassu pecari*).  
**PELAGEM:** Preta.  
**IDADE:** Adulto.  
**SEXO:** Fêmea.  
**PROCEDÊNCIA:** Itatiaia, RJ.  
**DATA DA NECROPSIA:** 08/07/2015.

#### HISTÓRICO:

Foram encontrados 6 animais mortos, suspeita de que foram encurralados por algum outro animal e caíram de cima de uma cachoeira.

#### DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

**Estado nutricional:** bom.

**Pele/pêlos:** presença de ectoparasitos. Duas lesões circulares no flanco direito com 1,5 e 1,0 centímetros de diâmetro circulares e profundas.

**Orelhas:** ninfas de ectoparasitos (carrapatos).

**Tecido subcutâneo:** na região inguinal direita, encontra-se líquido gelatinoso avermelhado (edema) se estendendo para a parte interior da coxa e lateral abdominal.

**Linfonodos superficiais:** linfonodo inguinal avermelhado ao corte.

**Pleura e cavidade torácica:** presença de sangue (hemorragia) em tórax esquerdo.

**Traquéia:** presença de parasitos (helmintos)

**Pulmão:** presença de lacerações em lobo caudal com ruptura do parênquima pulmonar, de aproximadamente 6 centímetros de diâmetro.

**Peritônio e cavidade abdominal:** presença de coágulos na cavidade abdominal.

**Ossos:** fraturas vertebrais de T-13, T-12 no corpo vertebral e processo transversal.

**Músculos:** hemorragia em musculatura paravertebral próximo a T-13.

**Articulações:** articulações costal-vertebral e T-8, T-9, T10, T-11, T-12, e T-13 luxadas do lado esquerdo.

**DIAGNÓSTICO:** os achados macroscópicos são compatíveis com fraturas vertebrais e hemorragias cavitárias. Quadro compatível com trauma.

Daniel Guimarães Ubiali  
Marlene de Farias Brito Queiroz  
Ticiane Nascimento França  
Profs. Anatomia Patológica