

**Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA BIOLOGIA DOS TRIPANOSSOMAS
DE ANUROS NEOTROPICAIS**

Moara Lemos

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2007

**Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA BIOLOGIA DOS TRIPANOSSOMAS
DE ANUROS NEOTROPICAIS**

Moara Lemos

Orientadora: Profa. Dra. Marta D'Agosto

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2007

Lemos, Moara

Contribuição ao estudo da biologia dos Tripanossomas de Anuros neotropicais / Moara Lemos ; orientador : profa. Dr. Marta Tavares d'Agosto. – 2007.

96 f. il.

Dissertação (Mestrado em Biologia e Comportamento animal – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

1. Parasitos - Parasitologia. 2. Parasitos – Ultra-estrutura. 3. Parasitos – Isolamento e purificação. 4. Anuros – Sangue. 5. Anuros - Parasitologia. I. d'Agosto, Marta Tavares, orientador. I. Título.

CDU: 576.8

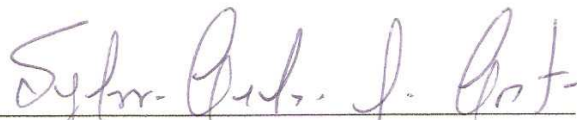
**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA BIOLOGIA DOS
TRIPANOSSOMAS DE ANUROS NEOTROPICAIS**

Moara Lemos

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marta D'Agosto

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração em Comportamento e Biologia Animal).

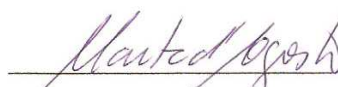
Aprovada em 14 de fevereiro de 2007.



Prof. Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ



Prof. Dr. André Flávio Soares Ferreira Rodrigues
Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora



Prof^ª. Dra. Marta D'Agosto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, Tereza e José Abel e
Tia Selma.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

A Universidade Federal de Juiz de Fora; ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal e a CAPES pelo auxílio e suporte para a realização deste trabalho;

A Dra. Marta D'Agosto pela orientação, amizade e por ensinar a buscar com afinco aquilo que acredito sem me deixar intimidar pelas barreiras do caminho;

Aos colaboradores:

Dr. André Flávio por acreditar e incentivar a realização deste trabalho e pelos valiosos conselhos;

Vinícius Carvalho e Dráusio Morais pelo envio do material, primeiros a tornar real este trabalho;

Dr. Helio Ricardo da Silva pelas coletas, maiores aventuras dos últimos tempos, e por me inspirar a confiança necessária para superação de um dos maiores medos;

Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa por gentilmente abrir as portas de seu laboratório para realização deste trabalho, por impulsionar minha curiosidade científica e mostrar as novas possibilidades;

Dra. Celeste de Souza pela paciência, tolerância e por me ensinar cada passo no cuidado com os pequenos;

Dra. Elaine Coimbra pelos ensinamentos e por gentilmente permitir a utilização do seu laboratório para manutenção dos tripanossomas;

Dr. Maurílio José Soares pela paciência, amizade e por me encorajar a seguir sempre em frente;

A Dr. Kátia Calabrese pelas correções e sugestões;

A amiga, Sthefane, pela amizade, conselhos e belíssimos desenhos;

A Rosângela e Marlú por facilitarem tudo, mostrando mais que eficiência, atenção aos meus pedidos;

Ao Dr. Erik Daemon, Dr. Juliane Lopes e Dra. Beth Bessa pela amizade, sugestões, correções, conselhos e ensinamentos;

Aos colegas que me acompanharam no mestrado dividindo angústias e vitórias e ainda aos colegas dos laboratórios de Leishmaniose da UFJF; de Herpetologia da UFRRJ, do LBCM, de Imunomodulação do Instituto Oswaldo Cruz, pela ajuda prestada e momentos de descontração;

Aos amigos Usha e Fabrício pelo auxílio prestado, imprescindíveis, no cuidado e manipulação dos animais;

Aos mais que colegas, amigos, que estiveram presentes nos momentos de dificuldade, nas descobertas, principalmente aos amigos do Laboratório de Protozoologia, Usha, Isabel e Roberto que muito me ensinaram sobre respeito, companheirismo e lealdade;

Aquele que me dá força para continuar a cada dia, a jornada dos tempos;

A minha família, Leni e Tarcísio, Eder e Cleide, Eli, Nely, Tia Selma, Panmella, Thainá, Vinícius, Amanda e Bianca, meu porto seguro, segurança e amor inabaláveis;

A Alessandra por toda a paciência, compreensão e carinho que tem mostrado a cada dia de nossa convivência;

Aos meus pais, princípio de tudo.

“Às vezes, atormentado pelo espetáculo do mundo e pelas incertezas do futuro, o homem levanta os olhos para o céu, e pergunta-lhe a verdade. Interroga silenciosamente a Natureza e o seu próprio espírito. Pede à Ciência os seus segredos, à Religião os seus entusiasmos. Mas, a Natureza parece-lhe muda... Entretanto, a solução repousa sobre as bases mais sólidas que conceber se possa: o testemunho dos sentidos e a experiência da razão.”

Leon Denis

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Transmissão ao hospedeiro vertebrado.....	8
2.2 Patogenia.....	8
2.3 Morfologia dos tripomastigotas.....	9
2.4 Sítios de infecção em órgãos de anuros.....	12
2.5 Técnicas Parasitológicas.....	12
2.6 Cultura dos tripanossomas.....	13
2.7 Ultra-estrutura.....	15
CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍNEOS.....	17
RESUMO.....	17
1.0 INTRODUÇÃO.....	18
2.0 MATERIAL & MÉTODOS.....	19
2.1 Captura e dados dos hospedeiros.....	19
2.2 Coleta e análise dos parasitos.....	19
2.3 Análise morfológica e morfométrica.....	20
2.4 Análise estatística.....	21
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1 Hospedeiros infectados e sítios de infecção.....	21
3.2 Taxonomia dos tripanossomas.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

CAPÍTULO II. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DA ULTRA-ESTRUTURA DAS FORMAS EM CULTURA ISOLADAS DE <i>Leptodactylus ocellatus</i>	45
RESUMO.....	45
1.0 INTRODUÇÃO.....	46
2.0 MATERIAL & MÉTODOS.....	46
2.1 Captura e dados dos hospedeiros.....	46
2.2 Coleta dos parasitos.....	47
2.3 Cultura dos tripanossomas.....	47
2.4 Desenvolvimento dos tripanossomas em meio de cultura bifásico.....	48
2.5 Criopreservação dos tripanossomas.....	48
2.6 Ultra-estrutura.....	49
2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	49
2.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	49
2.7 Análise estatística.....	50
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Observações em culturas.....	50
3.2 Morfologia e morfometria dos tripanossomas em culturas.....	52
3.3 Reprodução das formas em culturas.....	57
3.4 Ultra-estrutura.....	58
3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	58
3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	59
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Distribuição, por região geográfica e hospedeiros, das espécies de tripanossomas que parasitam anuros nas Américas.....5

Capítulo I.

Tabela 1-Procedência das famílias e respectivas espécies de anuros e número de indivíduos coletados nos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.....20

Tabela 2-Prevalência (%) e número de hospedeiros infectados por tripanossomas provenientes dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.....22

Tabela 3-Dados morfométricos de *Trypanosoma* sp2. em *Leptodactylus lineatus*. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).....25

Tabela 4-Dados morfométricos de *Trypanosoma chattoni* em *Leptodactylus fuscus*. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).29

Tabela 5-Dados morfométricos de *Trypanosoma rotatorium (lato sensu)* em *Osteocephalus* sp. e *Leptodactylus chaquensis*. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).....32

Tabela 6-Dados morfométricos de *Trypanosoma* sp.3 encontrado em *Leptodactylus ocellatus*..36

Capítulo II.

Tabela 1-Tripanossomas em culturas de amostras provenientes da circulação periférica e visceral de *Leptodactylus ocellatus*.....50

Tabela 2-Dados morfométricos das formas de *Trypanosoma* sp3. em cultura. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).....53

Tabela 3- Comparação entre as organelas celulares e estruturas intracelulares em tripanossomas de anuros.....	64
--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I.

Figura 01- Parasitemia encontrada em anuros coletados no estado do Mato Grosso.....	22
Figura 02- Percentual de tripanossomas encontrados na circulação periférica e visceral em <i>Leptodactylus ocellatus</i>	23
Prancha 01- Tripanossomas de anuros, barra 10µm.....	27
Figura 03- <i>Trypanosoma</i> sp.1 em processo degenerativo, linhas indicam pequenos vacúolos....	27
Figura 04- <i>Trypanosoma</i> sp.2 encontrada em <i>L. lineatus</i> ; forma delgada com cinetoplasto arredondado e área clara anterior ao núcleo.....	27
Figura 05- <i>Trypanosoma</i> sp.2 encontrada em <i>L. lineatus</i> ; forma larga com cinetoplasto perpendicular ao maior eixo do corpo e vacúolos localizados principalmente na região posterior do corpo.....	27
Figura 06- <i>T. chattoni</i> encontrada em <i>L. fuscus</i> ; tripanossoma com cinetoplasto juxtenuclear e pequeno flagelo marcando o citoplasma como canal claro.....	27
Figura 07- <i>T. chattoni</i> encontrado em <i>L. fuscus</i> ; cinetoplasto localizado sobre o núcleo.....	27
Figura 08- <i>T. rotatorium (lato sensu)</i> encontrada em <i>Ostheocephalus</i> sp. e <i>Leptodactylus chaquensis</i> forma de corpo curto e extremidades arredondadas com cinetoplasto arredondado e membrana ondulante.....	27
Prancha 02- Tripanossomas de anuros, figuras 9, 12, 13 e 14 barra 10µm e figuras 10, 11 barra 20 µm..	35
Figura 09- <i>T. rotatorium (lato sensu)</i> encontrado em <i>Ostheocephalus</i> sp. e <i>Leptodactylus chaquensis</i> , cinetoplasto alongado indicado pela seta e membrana ondulante delimitada por canal claro.....	35
Figura 10- (TM1) com cinetoplasto alongado e côncavo, presença de vacúolos localizados principalmente na região posterior do corpo e núcleo alongado.....	35

Figura 11- (TM1) com grânulos fortemente corados distribuídos ao longo da extensão citoplasmática.....	35
Figura 12- (TM3) com cinetoplasto juxtenuclear e núcleo arredondado.....	35
Figura 13- (TM2) núcleo com duas regiões, cinetoplasto arredondado e tênue marcação do flagelo livre sobre o eritrócito.....	35
Figura 14- (TM2) com pequeno flagelo livre.....	35
Figura 15- Localização das formas arredondadas sem membrana ondulante e flagelo livre (TM3) em <i>Leptodactylus ocellatus</i>	37
Figura 16- Localização das formas largas com membrana ondulante e flagelo livre (TM2) em <i>Leptodactylus ocellatus</i>	39
Capítulo II	
Prancha 01- Formas de cultura de <i>Trypanosoma</i> sp.3, barra 10 µm.....	54
Figura 01- Epimastigota delgado.....	54
Figura 02- Epimastigota piriforme com extremidade posterior do corpo fortemente afilada.....	54
Figura 03- Esferomastigota sem a porção livre do flagelo aparente.....	54
Figura 04- Esferomastigota com flagelo livre.....	54
Figura 05- Tripomastigota delgado.....	54
Figura 06- Tripomastigota largo com membrana ondulante conspícua e flagelo livre.....	54
Figura 07- Epimastigota piriforme em início de divisão iniciada pela duplicação do flagelo livre.....	54
Figura 08- Epimastigota delgado apresentando dois flagelos e dois cinetoplastos.....	54
Figura 09- Epimastigota piriforme apresentando flagelo livre, cinetoplasto e núcleo duplicados.....	54
Figura 10- Epimastigotas delgados em rosetas.....	54
Figura 11- Frequência (%) da variação das formas em cultura de <i>Trypanosoma</i> sp.3 ao longo de 13 dias de observação.....	56

Prancha 02 -Ultra-estrutura por microscopia eletrônica de varredura das formas de cultura de <i>Trypanosoma</i> sp.3, figura 13 barra 1µm e figuras 12, 14 – 18 barra 2µm.....	61
Figura 12 -Epimastigota delgado com flagelo aderido à membrana plasmática.....	61
Figura 13 -Esferomastigota com curto flagelo livre.....	61
Figura 14 -Epimastigota delgado com flagelo emergindo da bolsa flagelar.....	61
Figura 15 -Esferomastigotas com flagelo livre curto e sulcos marcando o citoplasma, indicando os ramos mitocondriais.....	61
Figura 16 -Epimastigota piriforme com sulcos e em início de processo reprodutivo pela presença do segundo flagelo livre.....	61
Figura 17 -Epimastigotas delgados apresentando grânulos ao longo da extensão citoplasmática.....	61
Figura 18 -Epimastigota piriforme em processo reprodutivo com segundo flagelo livre desenvolvido.	61
Prancha 3 -Ultra-estrutura por microscopia eletrônica de transmissão de <i>Trypanosoma</i> sp.3, figura 19 barra 3.2µm e figuras 20 – 22 barra 0.75µm.....	62
Figura 19 -Corte longitudinal de epimastigota delgado apresentando núcleo alongado com concentração de heterocromatina na porção posterior; cinetoplasto com fibrilas de kDNA orientadas paralelamente ao maior eixo do corpo; inclusões lipídicas concentradas na região posterior do corpo e flagelo com corpo paraxial.....	62
Figura 20 -Corte transversal mostrando núcleo com núcleo difuso e centralmente disposto; ramos mitocondriais periféricos e inclusões lipídicas.....	62
Figura 21 -Corte longitudinal mostrando cinetoplasto côncavo; corpúsculo basal localizado próximo a membrana mitocondrial e complexo de Golgi.....	62
Figura 22 -Corte transversal mostrando glicosomos alongados; acidocalcisomas dispostos ao longo da extensão citoplasmática e retículo endoplasmático liso localizado na periferia do corpo.....	62

Resumo

O presente estudo teve como objetivo verificar a infecção por tripanossomas em anuros em regiões dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro. Para tal, 20 espécies das famílias Bufonidae, Microhylidae, Hylidae e Leptodactylidae foram coletadas durante as atividades de resgate de fauna da Usina hidrelétrica do Guaporé, na divisa dos municípios Vale de São Domingos, Pontes e Lacerda, MT e no Município de Seropédica, Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. Verificou-se a presença de tripanossomas em esfregaços sangüíneos e impressões de órgãos em 36,36% dos hospedeiros analisados de *Osteocephalus* sp., 50% de *Leptodactylus chaquensis*, 100% de *Leptodactylus fuscus*, 100% de *Leptodactylus lineatus* e 100% de *Leptodactylus ocellatus*.

Foi verificado polimorfismo das espécies encontradas, separando-se *Trypanosoma* sp.1; *Trypanosoma* sp.2; *Trypanosoma* sp.3; *Trypanosoma chattoni* e *Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*). Destes o polimorfismo mais acentuado foi observado em *Trypanosoma* sp.3.

Amostras de sangue da circulação periférica e visceral de *Leptodactylus ocellatus* foram incluídas em meio de bifásico constituído de Agar e sangue e fase líquida de LIBHIT-K. Foram obtidos isolados de *Trypanosoma* sp.3 de três dos quatro hospedeiros coletados. Tripanossomas

foram observados 4 dias após inoculação, mantidos por 8 meses em cultura e retiradas amostras para análise da ultra-estrutura.

Nas formas de cultura foram observadas epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas. Divisão binária foi observada em epimastigotas e esferomastigotas; tripomastigotas não foram observadas em divisão. A análise da ultra-estrutura de *Trypanosoma* sp.3 confirmou sua singularidade por características morfológicas como glicosomos alongados.

Este estudo faz o primeiro registro da infecção por tripanossomas em anuros do gênero *Ostheocephalus* e nas espécies *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus lineatus* e a ocorrência de *T. chattoni* em espécies do gênero *Leptodactyllus* e no Brasil.

Registra-se ainda a utilização do meio LIBHIT-K como eficaz para manutenção de *Trypanosoma* sp.3 e o primeiro estudo sobre registro da ultra-estrutura de tripanossomas de anuros no Brasil.

Palavras-chave: *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma rotatorium*, isolamento e manutenção, Ultra-estrutura, Morfometria.

Abstract

The present research had as its main goal, checking the infection through trypanosomes in Anuran around Mato Grosso and Rio de Janeiro States. For that purpose 20 species from Bufonidae, Microhylidae, Hylidae and Leptodactylidae families were collected during the fauna rescue activities at Guapore Power Station the border of Vale de São Domingos, Pontes Lacerda, MT and in Seropédia County, at the Rural Federal University Campus in Rio de Janeiro, RJ.

Trypanosomes were found in blood smears and organ impressions in 36,36% of the *Osteocephalus* sp. studied hosts, 50% of *Leptodactylus chaquensis*, 100% of *Leptodactylus fuscus*, 100% of *Leptodactylus Lineatus* and 100% of *Leptodactylus ocellatus*.

Polimorfism was verified on the founded species, splitting into *Trypanosoma* sp.1, *Trypanosoma* sp.2, *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma rotatorium (lato sensu)* and *Trypanosoma* sp.3 that exhibit high polymorphism.

Periferal blood samples were inoculated through diphasic blood Agar and LIBHIT-K, liquid fase. Isolates of *Trypanosoma* sp.3 were obtained from three out of four collected hosts. Trypanosomes were observed 4 days after the inoculation, kept in cultures for 8 months and samples were taken for ultrastructural analysis.

Epimastigotes, sphaeromastigotes and trypomastigotes were the culture forms founded. Binary fission was noticed in epimastigotes and in sphaeromastigotes only, trypomastigotes were not

observed in reproduction. The ultrastructural analysis of *Trypanosoma* sp.3 confirmed its singularity through morphological characteristic such as elongated glicosomes.

This research accomplishes its first record of the infection through trypanosomes in the Anuran *Osteocephalus* genre and in the species of *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus lineatus* and the presence of *T. chattoni* in the *Leptodactyllus* species in Brazil.

The usage of LIBHIT-K as an effective mean for *Trypanosoma* sp.3 maintenance and the first records of ultrastructure anuran trypanosomes in Brazil.

Key-words: *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma rotatorium*, Morphology, Isolation and Maintenance, Ultra-structure.

1.0 INTRODUÇÃO

Os parasitos da ordem Kinetoplastida Honigberg, 1963 são encontrados em ampla gama de animais, vertebrados e invertebrados, e plantas (MASLOV *et al.*, 2001) e caracterizam-se pela morfologia dos estádios evolutivos e ciclos biológicos, ressaltando-se os hospedeiros envolvidos. A ordem é dividida em duas subordens: Bodonina, que apresenta indivíduos de vida livre e parasitos, e Trypanosomatina, que apresenta única família, Trypanosomatidae Doflein, 1901, em que todos os indivíduos são parasitos.

O gênero *Trypanosoma* foi proposto por Gruby em 1843, que identificou um hemoparasito de anuro, *Trypanosoma sanguinis*, observado em *Rana esculenta* na Europa. Entretanto, Mayer, meses antes, havia encontrado parasito semelhante, que descreveu como *Amoeba rotatoria*. LAVERAN & MESNIL (1901) propuseram a combinação *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843), sendo esta a espécie tipo do gênero (BARDSLEY & HARMSSEN, 1973).

Várias abordagens foram realizadas com espécies deste gênero, sobretudo com aquelas que parasitam humanos e outros vertebrados de importância econômica. Entretanto, estudos que consideram tripanossomas de animais da fauna silvestre são escassos no Brasil.

Os anuros apresentam plasticidade de habitat, por viverem na interface água-terra, expostos a oportunidades ecológicas distintas para o acesso a diferentes tipos de parasitos, o que reflete sua alta diversidade parasitária (BARTA & DESSER, 1984). As espécies deste grupo apresentam complexas relações no sistema parasito-hospedeiro, uma vez que os ambientes

aquático e terrestre estão envolvidos no processo de infecção dos hospedeiros vertebrado e invertebrado, oferecendo campo vasto para o estabelecimento das mais diversas inter-relações.

Considerando-se que o Brasil abriga a maior diversidade de anuros do mundo (VASCONCELOS & ROSSA-FERES, 2005), cerca de 776 espécies registradas (SBH, 2005), pouco se conhece sobre seus hemoparasitos, destacando-se o que se concerne aos tripanossomas.

Estudos que datam do início do século XIX abordaram a ocorrência e aspectos citológicos do processo de reprodução dos parasitos e aqueles da segunda metade do século XX, além da ocorrência, relataram aspectos morfológicos, morfométricos e biológicos. Após este período, estudos sobre tripanossomas de anuros são quase inexistentes no Brasil.

Após cerca de 150 anos do primeiro relato de tripanossomas, pouco se conhece sobre a biologia, bioquímica, ultraestrutura e genética das espécies encontradas em anuros. No que se refere à taxonomia, existem controvérsias sobre a validade de algumas espécies. Os estudos realizados abordaram o ciclo evolutivo, distribuição biogeográfica e infecções experimentais nos diversos hospedeiros, vertebrado e invertebrado. Estudos sobre o desenvolvimento *in vitro*, ultraestrutura, análise ecológica e molecular são ainda escassos.

Vários relatos demonstraram ser sanguessugas o hospedeiro invertebrado destes tripanossomas. Poucas espécies são comprovadamente transmitidas por dípteros hematófagos, incluindo espécies de importância médico-veterinária.

O polimorfismo, amplamente relatado, ocorre nos hospedeiros invertebrado e, principalmente, vertebrado. As maiores contradições referem-se à taxonomia de *T. rotatorium*, não existindo consenso a respeito da morfologia que a caracteriza.

Destaca-se a relevância da compreensão das relações parasito-hospedeiro como importante medida de conservação das espécies hospedeiras, sobretudo quando animais da fauna silvestre estão envolvidos, uma vez que relatos de sua patogenicidade foram verificados em anuros. Destaca-se ainda, a relevância dos anuros como indicadores biológicos devido a sua sensibilidade às alterações ambientais e sua presença em regiões urbanas carreando patógenos entre o ambiente urbano e silvestre.

O registro de tripanossomas em anuros no estado do Mato Grosso e de *T. rotatorium* no município de Seropédica, Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por LEMOS *et al.* (2003) e ELISEI *et al.* (2002), respectivamente, motivou a tentativa, ora relatada, de caracterizar, segundo a morfologia e morfometria, as formas sanguíneas de tripanossomas encontrados no hospedeiro vertebrado, em regiões dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.

Além de caracterizar, segundo a morfologia, morfometria e a ultra-estrutura, das formas de cultura dos tripanossomas isoladas de *Leptodactylus ocellatus* do estado do Rio de Janeiro.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com DESSER (2001) existem mais de 70 espécies assinaladas para tripanossomas parasitos de anuros. Entretanto sua validade é questionada devido ao polimorfismo que algumas apresentam (KUDO, 1922; BRUMPT, 1928; FANTHAM *et al.*, 1942; RUIZ & ALFARO, 1958; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; DESSER, 1973; MIYATA, 1976; MIYATA, 1978; MARTIN *et al.*, 1992b; LUN & DESSER, 1996; MARTIN *et al.*, 2002). DESSER, em 2001, sugeriu alguns critérios que deveriam ser adotados para a identificação de novas espécies deste grupo, assim destacou aspectos como formas de desenvolvimento, especificidade do parasito, cultura, dados do hospedeiro invertebrado e localidade que deveriam ser considerados para novas descrições, bem como análises bioquímicas, da ultraestrutura e da genética para melhor caracterização destes tripanossomas polimórficos.

Estes parasitos apresentam ampla distribuição geográfica. Em trabalho de revisão BARDSLEY & HARMSSEN (1973) relataram sua ocorrência em mais de 15 países. Em outros estudos, houve registros de ocorrência em quase todos os continentes por FENG & CHUNG (1940); WERNER (1993) na China; na França por BRUMPT (1928); BUTTNER & BOUCART (1955a; 1955b) e CREEMERS & JADIN (1966); na Itália por JACONO (1938); Bélgica por SCHWETZ (1930) e na Lituânia por ZICKUS (2002). Na África por BOUET (1909); Angola por FRANÇA (1925); na Índia por MISRA & CHANDRA (1995). EWERS (1968) em Papua Nova Guiné; MACKERRAS (1961) e

HALMILTON *et al.* (2005) na Austrália. Nas Américas, diversos autores relataram a ocorrência destes parasitos (TAB. 1)

TABELA 1. Distribuição, por região geográfica e hospedeira, das espécies de tripanossomas que parasitam anuros nas Américas.

Espécie	Espécies Hospedeiras	Localidade	Autor
<i>Trypanosoma arcei</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Argentina	*Mazza <i>et al.</i> (1927)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Bufo arenarum</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Ceratophrys ornata</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla raddiana</i>	Argentina	*Jörg (1936) e Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla venulosa</i>	Argentina	*Plimmer (1912)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Lepidobatrachus asper</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus bufonius</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus gracilis</i>	Argentina	*Jörg (1936)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	Argentina	Vucetich & Giacobbe (1949)
<i>Trypanosoma borreli</i>	<i>Hyla lateristriga</i>	Brasil	Marchoux & Salimbeni (1907)
<i>Trypanosoma celestinoi</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Brasil	*Brumpt (1936)
<i>Trypanosoma leptodactyli</i>	<i>Leptodactylus gracilis</i>	Brasil	Brumpt (1914)
<i>Trypanosoma leptodactyli</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Brasil	Carini (1910); Brumpt (1914); Pessoa (1969)
<i>Trypanosoma leptodactyli</i>	<i>Paludicola signifera</i>	Brasil	Brumpt (1914)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Brasil	Machado (1911); Gonçalves da Costa & Silva (1969); Pessoa (1969) e Elisei <i>et al.</i> (2002)
<i>Trypanosoma sp.</i>	?	Brasil	Ferreira <i>et al.</i> (2003)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Leptodactylus lineatus</i>		Lemos <i>et al.</i> (2004)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hypsoboas lundii</i>	Brasil	Santos <i>et al.</i> (2005)
<i>Trypanosoma andersoni</i>	<i>Hyla versicolor</i>	Canadá	Reylli & Woo (1981) e Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma canadensis</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Woo (1969)
<i>Trypanosoma chattoni</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Jones & Woo (1986; 1989)
<i>Trypanosoma fallisi</i>	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Martin & Desser (1990)
<i>Trypanosoma gaumontis</i>	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma gaumontis</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Woo (1969)
<i>Trypanosoma grylli</i>	<i>Hyla versicolor</i>	Canadá	Reylli & Woo (1981) e Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma grylli</i>	<i>Hyla avivoca</i>	Canadá	Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma inopinatum</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma inopinatum</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma lavalina</i>	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma montrealis</i>	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Hyla crucifer</i>	Canadá	Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Hyla versicolor</i>	Canadá	Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Pseudacris triseriata</i>	Canadá	Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	Canadá	Siddall & Desser (1992)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana clamitans</i>	Canadá	Woo (1969)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Woo (1969)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana septentrionalis</i>	Canadá	Barta & Desser (1984)

Continua

TABELA 1. Continuação. Distribuição, por região geográfica e hospedeira, das espécies de tripanossomas que parasitam anuros nas Américas.

Espécie	Espécies Hospedeiras	Localidade	Autor
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana sylvatica</i>	Canadá	Woo (1969)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Barta & Desser (1984)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Hyla versicolor</i>	Canadá	Barta & Desser (1984); Jones & Woo (1989)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Jones & Woo (1989)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana septentrionalis</i>	Canadá	Woo & Bogart (1983)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942); Woo (1969) e Bardsley & Harmsen (1969; 1970)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana clamitans</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942); Woo (1969); Desser (1976) e Jones & Woo (1989)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Fantham <i>et al.</i> (1942)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	Woo (1969) e Jones & Woo (1989)
<i>Trypanosoma sanguinis</i>	<i>Rana mugiens</i>	Canadá	*Osler (1883)
<i>Trypanosoma chattoni</i>	<i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma chattoni</i>	<i>Rana vaillanti</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma loricatum</i>	<i>Rana vaillanti</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana pipiens</i>	Costa Rica	Ruiz & Alfaro (1958)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana warschewitschii</i>	Costa Rica	Ruiz & Alfaro (1958)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Phrynohyas venulosa</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Eleutherodactylus fitzingeri</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Rana forreri</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Rana vaillanti</i>	Costa Rica	Desser (2001)
<i>Trypanosoma aurorae</i>	<i>Rana aurora</i>	EUA	Lehmann (1959)a
<i>Trypanosoma boylii</i>	<i>Rana boylii</i>	EUA	Lehmann (1959)b
<i>Trypanosoma bufophlebotomi</i>	<i>Bufo americanus</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma bufophlebotomi</i>	<i>Bufo boreas</i>	EUA	Ayala (1970)
<i>Trypanosoma chattoni</i>	<i>Rana pipiens</i>	EUA	Diamond (1958)
<i>Trypanosoma grylli</i>	<i>Acris gryllus</i>	EUA	Nigrelli (1945)
<i>Trypanosoma karyozeukton</i>	<i>Acris gryllus</i>	EUA	*Lauter (1960)
<i>Trypanosoma parvum</i>	<i>Rana clamitans</i>	EUA	Kudo (1922)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana clamitans</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma pipientis</i>	<i>Rana pipiens</i>	EUA	Diamond (1950; 1958)
<i>Trypanosoma pseudopodium</i>	<i>Bufo americanus</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana clamitans</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana pipiens</i>	EUA	Diamond (1958); Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma ranarum</i>	<i>Rana septentrionalis</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Acris gryllus</i>	EUA	*Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Bufo compactilus</i>	EUA	*Walton (1946)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Bufo fowleri</i>	EUA	*Walton (1946)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Bufo Woodhouseii</i>	EUA	*Campbell (1968)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla avivoca</i>	EUA	*Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla cinerea</i>	EUA	*Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla crucifer</i>	EUA	*Brandt (1936) e *Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla versicolor</i>	EUA	*Campbell (1968)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Pseudacris brimleyi</i>	EUA	*Brandt (1936)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana areolata</i>	EUA	*Lauter (1960)

Continua

TABELA 1. Continuação. Distribuição, por região geográfica e hospedeira, das espécies de tripanossomas que parasitam anuros nas Américas.

Espécie	Espécies Hospedeiras	Localidade	Autor
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	EUA	*Brandt (1936); Nigrelli (1945); *Campbell (1968) e Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana clamitans</i>	EUA	Nigrelli (1945); Southworth et al. (1968); *Bolinger et al. (1969) e Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana palustris</i>	EUA	Laird (1951) e *Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana pipiens</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana septentrionalis</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana sphenocephala</i>	EUA	*Brandt (1936) e *Lauter (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana sylvatica</i>	EUA	Werner & Walewski (1976)
<i>Trypanosoma schmidti</i>	<i>Rana sphenocephala</i>	EUA	Diamond (1958)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Bufo boreas</i>	EUA	Anderson & Ayala (1968)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hyla andersoni</i>	EUA	Nigrelli (1945)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hyla arenicolor</i>	EUA	*Parry & Grundmann (1965)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hyla crucifer</i>	EUA	Nigrelli (1945)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hyla sp.</i>	EUA	*Schmidt (1878)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Hyla versicolor</i>	EUA	Nigrelli (1945)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Rana pipiens</i>	EUA	Nigrelli (1945)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Rana pretiosa</i>	EUA	*Clark <i>et al.</i> (1969)
<i>Trypanosoma chattoni</i>	<i>Rana pipiens</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma diamondi</i>	<i>Rana pipiens</i>	México	Pérez-Reyes (1968)
<i>Trypanosoma galba</i>	<i>Rana montezuma</i>	México	Pérez-Reyes (1968)
<i>Trypanosoma galba</i>	<i>Rana palmipes</i>	México	Pérez-Reyes (1968)
<i>Trypanosoma galba</i>	<i>Rana pustulosa</i>	México	Pérez-Reyes (1968)
<i>Trypanosoma grandis</i>	<i>Rana pipiens</i>	México	Pérez-Reyes (1968)
<i>Trypanosoma inopinatum</i>	<i>Rana montezumae</i>	México	Pérez-Reyes <i>et al.</i> (1960)
<i>Trypanosoma loricatum</i>	<i>Rana pipiens</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma montezumae</i>	<i>Rana montezumae</i>	México	Pérez-Reyes <i>et al.</i> (1960)
<i>Trypanosoma montezumae</i>	<i>Rana pustulosa</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma montezumae</i>	<i>Rana palmipes</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla lafrentzi</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	México	Pérez-Reyes (1967)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana montezumae</i>	México	Pérez-Reyes <i>et al.</i> (1960)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Rana pipiens</i>	México	Pérez-Reyes <i>et al.</i> (1960)
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Bufo marinus</i>	Peru	Lehmann (1966)b
<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Dendrobates trivittatus</i>	Peru	Guerrero & Ayala (1977)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla crepitans</i>	Venezuela	Scorza & Dagert (1858) e Ramos & Urdaneta-Morales (1977)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Hyla venulosa</i>	Venezuela	Scorza & Dagert (1958)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus bolivianus</i>	Venezuela	Scorza & Dagert (1958)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Leptodactylus insularum</i>	Venezuela	Ramos & Urdaneta-Morales (1977)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Venezuela	Scorza & Dagert (1958)

*apud BARDSLEY & HARMSSEN (1973)

2.1 TRANSMISSÃO AO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Sanguessugas foram relatadas pela primeira vez como hospedeiro invertebrado para tripanossomas que parasitam anuros por BILLET (1904), que sugeriu ser *Helobdella algira* o hospedeiro invertebrado de *Trypanosoma inopinatum* Sergent & Sergent, 1904. BRUMPT no mesmo ano confirmou a hipótese de BILLET (1904) verificando a transmissão de *T. inopinatum* a *Rana esculenta* por *H. algira*. A infecção da sanguessuga ocorre por ingestão das formas infectantes; a infecção ao anuro ocorre por inoculação das formas infectantes pela sanguessuga durante a hematofagia. Desde o demonstrado por BRUMPT (1904), diversos autores como BRUMPT (1906), NIGRELLI (1945), DIAMOND (1950), SCORZA & DAGERT (1958), KUDO (1966), WOO (1969a), DESSER (1976), MIYATA (1976; 1978), MARTIN & DESSER (1990, 1991a), DESSER (1992) e SIDDAL & DESSER (1992) verificaram o desenvolvimento de tripanossomas em sanguessugas, em anuros naturalmente ou experimentalmente infectados nos quais a presença de tripomastigotas metacíclicos foi comumente relatada.

Dípteros hematófagos foram indicados como hospedeiros invertebrados para tripanossomas de anuros, entretanto poucos estudos constataram sua viabilidade como transmissores. FENG & CHUNG (1940) e FENG & CHAO (1943) no Japão AYALA, (1968; 1970; 1971) nos EUA e RAMOS & URDANETA-MORALES (1977) na Venezuela relataram a transmissão de *Trypanosoma bocagei* França, 1911; *Trypanosoma bufophlebotomi* Ayala, 1968 e formas do complexo *T. rotatorium* por dípteros hematófagos.

Estes autores verificaram o desenvolvimento dos tripanossomas na porção posterior do sistema digestório e observaram que a transmissão ao anuro ocorre por ingestão do hospedeiro invertebrado (FENG & CHUNG, 1940; FENG & CHAO, 1943; AYALA, 1971 e RAMOS & URDANETA-MORALES, 1977). Nestes estudos, tripanossomas metacíclicos não foram observados, sendo epimastigotas as formas infectantes.

PESSOA (1969) e RAMOS & URDANETA-MORALES (1977) obtiveram resultados negativos ao tentar infectar *Rhodnius prolixus* com formas de *T. rotatorium* e *T. leptodactyli*. Estes autores registraram que 24hs após hematofagia, ocorreu arredondamento das formas e 72hs após, apresentavam-se em processo de degeneração. BAILEY (1962) observou o desenvolvimento de *T. rotatorium* em *Aedes aegypti* e DESSER *et al.* (1973; 1974) em *Culex territans*, entretanto a transmissão experimental por estes hospedeiros não resultou em infecções positivas.

2.2 PATOGENIA

A ação patogênica de tripanossomas a anuros foi verificada em *T. inopinatum*, *T. rotatorium* e em *T. andersoni* (FRANÇA, 1913; 1914 *apud* FRANÇA, 1928; BUTTNER & BOUCART, 1955a; 1955b e REILLY & WOO, 1982a). A ação patogênica de *T. rotatorium* e *T. andersoni*, é questionável, uma vez que as análises foram acompanhadas sob condições de inoculação experimental.

BUTTNER & BOUCART (1955a; 1955b) relataram que as formas jovens e delgadas de *T. inopinatum* são patogênicas, causadoras da fase aguda, muitas vezes responsáveis pelas mortes dos anuros. BRUMPT (1906; 1924) e BUTTNER & BOUCART (1955a; 1955b) registraram anemia, ascites e hemorragias em anuros intensamente parasitados.

2.3 MORFOLOGIA DOS TRIPOMASTIGOTAS

Este grupo de parasitos apresenta variada morfologia, que muitas vezes é utilizada como único critério para descrições de novas espécies. Algumas espécies, entretanto, apresentam morfologia invariável, consideradas monomórficas, outras são notadamente polimórficas (FRANÇA, 1911; MACHADO, 1911; KUDO, 1922; BRUMPT, 1928; SCHWETZ, 1930; FANTHAM *et al.*, 1942; VUCETICH & GIACOBBE, 1949; RUIZ & ALFARO, 1958; PÉREZ-REYES *et al.* 1960; CREEMERS & JADIN, 1966; PERES-REYES *et al.*, 1968; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; DESSER, 1973; PÉREZ-REYES *et al.*, 1976; MIYATA, 1976; 1978; MARTIN *et al.*, 1992a; 1992b; LUN & DESSER, 1996; DESSER, 2001, MARTIN *et al.*, 2002).

Espécies monomórficas, em geral, apresentam o corpo alongado com extremidades afiladas, membrana ondulante conspícua e flagelo livre. Sob estas características podem ser consideradas *Trypanosoma nelspruitense* Laveran, 1904; *Trypanosoma parroti* Brumpt, 1923; *Trypanosoma neveulemairei* Brumpt, 1928; *Trypanosoma mega* Dutton & Tobey, 1903; *Trypanosoma karyozenkton* Dutton & Tobey, 1903; *Trypanosoma pipientis* Diamond, 1950; *Trypanosoma montezumae* Pérez-Reyes, 1960; *Trypanosoma grandis* Pérez-Reyes, 1968; *Trypanosoma diamond* Pérez-Reyes, 1968; *Trypanosoma ishigakiense* Miyata, 1978; *Trypanosoma parvum* Kudo, 1922 e *Trypanosoma microhylis* Misra & Chandra, 1995.

Trypanosoma boyli Lehmann, 1959, *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 e *Trypanosoma loricatedum* (Mayer, 1843) LAVERAN & MESNIL, 1901, considerados monomórficos, apresentam morfologia corporal distinta dos citados.

Trypanosoma chattoni Mathis & Leger, 1911 difere de todas as outras espécies já relatadas. Este tripanossoma com morfologia peculiar, apresenta o corpo arredondado e um pequeno flagelo que não se estende além do comprimento do corpo. DIAMOND (1965) isolou este

tripanosossoma e manteve-o por sete anos em meio de cultura. JONES & WOO (1986) relataram aspectos do seu processo de divisão, não observando variação na morfologia corporal do parasito. CLARK *et al.* (1995), LUN & DESSER (1996) e MARTIN *et al.* (2002) confirmaram por análises moleculares, a singularidade de *T. chattoni*. Esta espécie foi amplamente relatada em bufonídeos por MATHIS & LEGER (1911), MIYATA (1978) e WERNER (1993) na Ásia, em ranídeos por DIAMOND (1965), JONES & WOO (1986) e DESSER (2001) nas Américas do Norte e Central.

As variações morfológicas dos tripanosossomas de anuros podem ser verificadas por alterações na largura do corpo até polimorfismo acentuado com marcada mudança de forma.

Polimorfismo relacionado à largura corporal, originando formas delgadas e largas foi relatado em *Trypanosoma sergenti* Brumpt, 1923; *Trypanosoma bocagei* França, 1910; *Trypanosoma rugosae* Miyata, 1978 e *Trypanosoma ranarum* (Lankester, 1871) DANILWESKY, 1885.

BUTTNER & BOUCART (1955a; 1955b), PÉRES-REYES (1968), ANDERSON & AYALA (1970) e MARTIN & DESSER (1990) atribuíram o polimorfismo de *Trypanosoma inopinatum* Sergent & Sergent, 1904; *Trypanosoma galba* Pérez-Reyes, 1968, *Trypanosoma bufophlebotomi* Anderson & Ayala, 1970 e *Trypanosoma fallisi* Martin & Desser, 1990 ao tempo de infecção do hospedeiro vertebrado. As formas jovens referiam-se a parasitos menores e delgados e as maduras a parasitos maiores e largos.

GALLIARD *et al.* (1954) relataram que determinados hormônios podem alterar a morfologia dos tripomastigotas de *T. inopinatum* que ocasionaram gigantismo e alterações em seu processo reprodutivo. REILLY & WOO (1982a) verificaram que fatores, como temperatura, alteraram a morfologia dos tripomastigotas. Estes autores observaram *Trypanosoma andersoni* e *Trypanosoma grylli* em diferentes temperaturas e verificaram alterações referentes ao comprimento do corpo ao longo de vários dias. MARTIN & DESSER (1991b) relataram interferência da temperatura na largura de *T. fallisi* ao longo das estações.

A maior variação morfológica, entre os tripanosossomas que parasitam anuros, é atribuída a *T. rotatorium*. Sob este nome, diversos tripanosossomas apresentando as mais variadas formas, foram relatados. FANTHAN *et al.* (1942), CREEMERS & JADIN (1966) e MIYATA (1978) verificaram a predominância das formas alongadas em girinos. Estes relatos ressaltaram o polimorfismo nos diversos estádios de desenvolvimento do hospedeiro vertebrado. BARDSLEY & HARMSSEN (1973) propuseram o complexo morfológico, *T. rotatorium*, na tentativa de evitar a confusão que existe acerca desta espécie.

DUTTON *et al.* (1907) e BARDSLEY & HARMSSEN (1973) especularam que Mayer, 1843 identificou como infecção mista o que na realidade seriam variações morfológicas de um mesmo tripanossoma, entretanto há divergências (DESSER, 2001). Relatos deste tipo têm ocorrido na história da literatura do grupo como o de FRANÇA (1915) que verificou que *Trypanosoma elegans* França & Athias, 1906 e *Trypanosoma undulans* França & Athias, 1906 espécies descritas como monomórficas eram estágios polimórficos de *T. inopinatum* considerada até então como monomórfica.

O grupo de formas identificadas como *T. rotatorium* teve sua ocorrência amplamente relatada por DUTTON *et al.* (1907), FRANÇA & ATHIAS (1907), MACHADO (1911), KUDO (1922), FANTHAM *et al.* (1942), VUCETICH & GIACOBBE (1949), RUIZ & ALFARO (1958), SCORZA & DAGERT (1958), LEHMANN (1959), PÉRES-REYES *et al.* (1960), BAILEY (1962), CREEMERS & JADIN (1966), BARDSLEY & HARMSSEN (1968), SOUTHWORTH (1968), GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969), PESSÔA (1971), BARDSLEY & HARMSSEN (1973), DESSER *et al.* (1973), DESSER *et al.* (1974) MIYATA (1976; 1978), WERNER & WALEWSKI (1976), RAMOS & URDANETA-MORALES (1977), BARTA *et al.* (1989), MARTIN *et al.* (1992b), LUN & DESSER (1996), DESSER (2001), ELISEI *et al.* (2002) e ZICKUS (2002). *Trypanosoma rotatorium* é a mais comumente assinalada em anuros (BARTA *et al.* 1989)

Segundo VUCETICH & GIACOBBE (1949) e SCORZA & DAGERT (1958) *Trypanosoma borreli* Marchoux & Salimbeni, 1907; *Trypanosoma arcei* Mazza, 1927; *Trypanosoma costatum* França, 1908; *Trypanosoma hylae* França, 1908; *Trypanosoma ocellati* Brumpt, 1936; *T. leptodactyli*; *T. parvum* Kudo, 1922; *Trypanosoma gaumontis*, *Trypanosoma lavalia* e *Trypanosoma montrealis* descritas por Fantham; Porter & Richardson, 1942 foram consideradas sinônimas de *T. rotatorium*.

SCORZA & DAGERT (1958) comprovaram por infecções experimentais que *T. rotatorium* e *T. leptodactyli* provenientes de *Leptodactylus bolivianus* e *Hyla crepitans* são estádios polimórficos de um mesmo tripanossoma. Estes autores verificaram, ao longo do desenvolvimento, formas alongadas e delgadas, formas largas com extremidades arredondadas e formas redondas. MACHADO (1911) observou os mesmos padrões morfológicos de *T. rotatorium* em *L. ocellatus*, em infecções naturais, provenientes do estado do Rio de Janeiro.

Em virtude do marcado polimorfismo que esta espécie apresenta, JACONO (1938) propôs a divisão do gênero *Trypanosoma* que abrigaria *T. rotatorium* ao qual serve de tipo e um novo gênero, *Castellanella*, que agruparia todas as demais espécies já descritas para o gênero. O autor fundamentou-se em argumentos morfológicos e biológicos, principalmente sobre a reprodução

no hospedeiro vertebrado. BARDSLEY & HARMSSEN (1973) propuseram o complexo *T. rotatorium* na tentativa de se evitar novas descrições fundamentadas somente na morfologia dos tripomastigotas sanguíneos e maiores problemas de caráter taxonômico.

2.4 SÍTIOS DE INFECÇÃO EM ÓRGÃOS DE ANUROS

Vários estudos relataram a existência de sítios de infecção específicos para este grupo de tripanossomas indicando os rins como sítio de maior concentração (MACHADO, 1911; KUDO, 1922; FANTHAM *et al.*, 1942; SOUTHWORTH *et al.*, 1968; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; JONES & WOO, 1986 e 1989). SOUTHWORTH *et al.* (1968) observou migração em 24hs, entre a circulação periférica e circulação dos rins, em *T. rotatorium*. MACHADO (1911) observou esta espécie em maior frequência na circulação dos rins, fígado e baço. Neste estudo o autor observou tripanossomas aderidos ao endotélio dos capilares viscerais. KUDO (1922), FANTHAM *et al.* (1942) e JONES & WOO (1989) relataram assim como MACHADO (1911), que esta espécie foi observada em maior frequência na circulação dos rins. JONES & WOO (1986; 1989) relataram que o mesmo ocorreu em *T. chattoni* encontrado em *Rana pipiens*. FANTHAM *et al.* (1942) e BARDSLEY & HARMSSEN (1973) verificaram que as formas arredondadas concentram-se na circulação visceral do coração e rins.

BRUMPT (1923) observou *T. parroti* e *T. sergenti* na medula óssea e na circulação visceral e relatou escassez de formas na circulação periférica. DUTTON *et al.* (1907) e PÉREZ-REYES (1969b) observaram o oposto em *T. rotatorium* e *T. grandis*, respectivamente. BUTTNER & BOUCART (1955a e 1955b) relataram *T. inopinatum*, na circulação cardíaca e em menor número na circulação renal, hepática, na medula óssea e ainda ciclo intracelular para esta espécie de tripanossoma. VUCETICH & GIACOBBE (1949) relataram formas intraeritrocitárias para tripanossomas alongados semelhantes a *T. leptodactyli*.

PÉREZ-REYES (1968; 1969a) verificou que em infecções recentes, *T. galba* e *T. montezumae* concentraram-se na circulação periférica e em períodos reprodutivos na circulação visceral, principalmente do fígado e coração.

A determinação da existência de sítios de infecção torna-se difícil uma vez que os diversos estudos foram fundamentados somente nas formas encontradas em esfregaços sanguíneos, não sendo observados sangue provenientes dos órgãos.

2.5 TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

Em geral, técnicas parasitológicas são utilizadas para detectar infecções por tripanossomas em anuros. Algumas foram desenvolvidas para auxiliar no diagnóstico e aumentar a sensibilidade na detecção de baixas infecções (JONES & WOO, 1989). WOO (1969c) avaliou a utilização da centrifugação de hematócrito para detecção de tripanossomas (HCT) em baixas parasitemias, esta técnica está associada à motilidade e peso específico do tripanossoma. WOO (1983) realizou estudo comparativo para avaliar a sensibilidade de técnicas de diagnóstico, comparando as técnicas de HCT, culturas e análise a fresco. Dentre elas, o HCT apresentou maior rapidez e sensibilidade no diagnóstico, que variam de acordo com a espécie. SIMON *et al.* (1989), avaliaram a sensibilidade da técnica de impressão dos rins (KIT) e constataram que está associada ao tamanho do parasito, sendo indicada para diagnosticar tripanossomas de grande tamanho. Os autores propõem que estas técnicas deveriam ser utilizadas em conjunto para se obter dados mais acurados para a determinação da prevalência destes parasitos.

2.6 CULTURA DOS TRIPANOSSOMAS

A primeira espécie de tripanossomas de anuros a ser observada *in vitro* foi *T. rotatorium* por BOUET (1906). Após, diversas espécies foram isoladas e mantidas em diferentes meios por MATHIS (1906), MATHIS & LEGER (1911), PONSELLE (1923b); PACKCHANIAN (1934), VUCETICH & GIACOBBE (1949); WALLACE (1956), STEINERT, (1958), PÉREZ-REYES *et al.* (1960), LEHMANN & SORSOLI (1962), CREEMERS & JADIN (1966), PÉREZ-REYES (1968a, 1968b), FROMENTIN (1971), REILLY & WOO (1982b) e MARTIN & DESSER (1991).

A manutenção entre lâmina e lamínula foi denominada como manutenção em meio de cultura por DUTTON *et al.* (1907), FRANÇA & LAVERAN (1911), SCORZA & DAGERT (1949) e PÉREZ-REYES (1960) e utilizada nas descrições das alterações que ocorrem com estes tripanossomas. Segundo estes autores foi verificada vacuolização do citoplasma e arredondamento das formas alongadas que perdem gradualmente a membrana ondulante e ocorre a migração do cinetoplasto em direção ao núcleo. As formas arredondadas recém formadas iniciam intenso processo de divisão, resultando em epimastigotas delgados e piriformes. REILLY & WOO (1982b) observaram tripomastigotas de *T. andersoni* entre lâmina e lamínula e também relataram processo de arredondamento, principalmente da região posterior do corpo, resultando na formação de esferomastigotas.

No Brasil, MACHADO (1911) isolou *T. rotatorium* de *L. ocellatus*, procedentes do estado do Rio de Janeiro. Este autor utilizou o meio N.N.N. e relatou a dificuldade de manter estes

parasitos atribuindo à temperatura de aproximadamente 28° C a mortalidade dos tripanossomas. PEREIRA *et al.* (1973) também isolaram *T. rotatorium* de *L. ocellatus* provenientes do estado do Rio de Janeiro e relataram assim como MACHADO (1911) a dificuldade em manter estes tripanossomas *in vitro*. Estes autores mantiveram *T. rotatorium* por aproximadamente 15 dias. FERREIRA *et al.*, (2003) obtiveram 70 isolados provenientes de 21 espécies de anuros procedentes do Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Entretanto, não mencionaram as espécies hospedeiras e espécies de tripanossomas encontrados, bem como o meio utilizado para o isolamento dos tripanossomas.

O polimorfismo das formas dos tripanossomas de anuros em cultura foi amplamente relatado (MACHADO, 1911; PONSELLE, 1923; PACKCHANIAN, 1934; VUCETICH & GIACOBBE, 1949; STEINERT, 1958 e 1965; PÉREZ-REYES *et al.*, 1960; LEHMANN, 1962; LEHMANN & SORSOLI, 1962; PÉREZ-REYES, 1968a 1968b; AYALA, 1971; FROMENTIN, 1971, BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; PEREIRA *et al.*, 1973; REILLY & WOO, 1982b; MARTIN & DESSER, 1990; 1991a). Estes autores relataram à presença de epimastigotas delgados e piriformes, esferomastigotas apresentando ou não flagelo livre e tripomastigotas. Entretanto, PÉREZ-REYES (1968b) e AYALA (1971) relataram ausência de formas tripomastigotas metacíclicas, que segundo AYALA (1971) as formas infectantes são epimastigotas.

Processos reprodutivos foram verificados para as espécies de tripanossomas observadas *in vitro*. Reprodução binária foi comumente observada (BARDSLEY & HARMSSEN, 1973) sendo relatada por MACHADO (1911), PÉREZ-REYES *et al.* (1960), FROMENTIN (1971) e PEREIRA *et al.* (1973) em *T. rotatorium*; por PONSELLE (1923) em *T. inopinatum*, por PÉREZ-REYES *et al.* (1960) em *T. montezumae*, por STEINERT (1958; 1965) em *T. mega*; por REILLY & WOO (1982 b) em *T. andersoni* e *T. grylli* e por MARTIN & DESSER (1991a) em *T. fallisi*.

Divisão múltipla foi observada em *T. rotatorium* (PÉREZ-REYES *et al.*, 1960 e PEREIRA *et al.*, 1973), *T. inopinatum* (PONSELLE, 1923), em *T. ranarum* (LEHMANN & SORSOLI, 1962), em *T. bufophlebotomi* (AYALA, 1971), em *T. grylli* e raramente em *T. andersoni* (REILLY & WOO, 1982b). A combinação dos dois processos reprodutivos foi verificada por PONSELLE (1923), PÉREZ-REYES *et al.* (1960), PEREIRA *et al.* (1973) e REILLY & WOO (1982 b).

Os primeiros estudos de isolamento e manutenção de tripanossomas de anuros utilizaram essencialmente o meio N.N. de NOVY & MCNEAL (1903) ou modificações deste meio (MATHIS, 1906 e NICOLE, 1906). PONSELLE (1923a) e FROMENTIN (1971) propuseram a utilização de meios bifásicos para manter tripanossomas não patogênicos. WALLACE (1956) relatou a superioridade de meios bifásicos em relação a meios monofásicos, testados em *T. ranarum*. Meios bifásicos

foram amplamente utilizados para isolamento e/ou manutenção de tripanossomas de anuros (RUIZ & ALFARO, 1958; STEINERT, 1958; 1967; CREEMERS & JADIN, 1966; LEHMANN, 1962; LEHMANN & SORSOLI, 1962; PÉREZ-REYES, 1968; LAURENT & STEINERT, 1970; PEREIRA *et al.*, 1973; REILLY & WOO, 1982b; VERMELHO *et al.*, 1986 e MARTIN & DESSER, 1991a).

LEHMANN (1962) verificou a influência da temperatura sobre a reprodução de *T. ranarum*. Este autor relatou que a temperatura ótima para a espécie analisada ocorreu entre 20 e 25° C e que em baixas temperaturas (9° C) a taxa reprodutiva diminui e altas temperaturas (35° C) são letais aos parasitos. Resultados semelhantes foram verificados por AYALA (1971) em *T. bufophlebotomi*.

LEHMANN & SORSOLI (1962) verificaram que epimastigotas piriformes de *T. ranarum* constituem as unidades reprodutivas e que formas epimastigotas delgadas são responsáveis pela manutenção da cultura se diferenciando em epimastigotas piriformes quando inoculados em meio de cultura.

A criopreservação de formas de cultura de tripanossomas de anuros foi relatada por FROMENTIN (1971), AYALA (1971) e REILLY & WOO (1982b). FROMENTIN (1971) utilizou como crioprotetor para *T. rotatorium* D.M.S.O. a 10%. AYALA (1971) e REILLY & WOO (1982b) para *T. bufophlebotomi*, *T. andersonni* e *T. grylli* respectivamente, utilizaram glicerol e obtiveram resultados positivos na viabilidade por inoculação experimental destas espécies.

2.7 ULTRA-ESTRUTURA

O primeiro estudo sobre a ultraestrutura de tripanossomas de anuros foi relatado por STEINERT (1958) que observou a existência de citóstoma e citofaringe em *T. mega* indicando a formação de vesículas endocíticas no citoplasma celular (STEINERT & NOVIKOFF, 1960). Em estudos posteriores, STEINERT & VAN ASSEL (1967) verificaram a ocorrência de divisão em indivíduos desprovidos de cinetoplasto.

CREEMERS & JADIN (1966) verificaram a ultraestrutura de formas de cultura de *T. rotatorium*. DESSER (1976) observou epimastigotas desta mesma espécie no sistema digestório da sanguessuga *Batracobdella picta*. Estes autores observaram inclusões lipídicas e diversas inclusões, cuja natureza não foi determinada que muitas vezes assemelharam-se à organelas ácidas de reserva de substâncias inorgânicas denominadas acidocalcisomas observadas em tripanossomatídeos (DO CAMPO *et al.*, 1995; VERCESI & DO CAMPO, 1996; MIRANDA *et al.*, 2000; DE SOUZA *et al.* 2000 e MEDEIROS *et al.*, 2005). DO CAMPO & MORENO (1999) relataram que estas organelas podem estar associadas ao armazenamento de substâncias inorgânicas que

poderiam ser utilizadas em processos de diferenciação celular ao longo do desenvolvimento do parasito, bem como no controle osmorregulatório.

Segundo DE SOUZA (1999; 2002) e DE SOUZA *et al.*(2000) estas organelas foram amplamente relatadas em tripomastigotas com diversas denominações como grânulos de volutina, inclusões vesiculares e grânulos osmiofílicos.

DESSER (1976) verificou em *T. rotatorium* estruturas semelhantes à hemidesmossomos que ligavam o flagelo à parede celular do hospedeiro e ausência de complexo de Golgi, o que não foi observado por CREEMERS & JADIN (1966) para a mesma espécie de tripanossoma.

CORTES & *et al.* (1972) observaram em epimastigotas de *T. montezumae* e verificaram além de organelas celulares, a presença de inúmeros ribossomos dispersos pelo citoplasma e vacúolos aos quais denominaram digestivos. Esses vacúolos apresentaram diferenças quanto ao seu conteúdo nas diferentes técnicas utilizadas. Os autores mencionaram que este parasito difere morfológicamente daqueles até então relatados e reforçam sua hipótese atribuindo as variações morfológicas de estruturas e organelas celulares às diferentes funções metabólicas.

PÉREZ-REYES *et al.* (1976) observaram a ultraestrutura de epimastigotas de *T. galba* e relataram vacúolos lipídicos, organelas celulares com função secretora, citofaringe e estruturas envoltas por membrana, localizadas próximas à bolsa do flagelo, que se assemelhavam a organismos simbiontes.

Glicosomos foram descritos em várias espécies do gênero *Trypanosoma*. Estas organelas apresentam aspecto arredondado de aproximadamente 0.3µm (DE SOUZA, 1999) e tem importante papel no metabolismo celular, principalmente na via glicolítica (SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1982 e MISSET *et al.*, 1986). Estas organelas foram relatadas em *T. mega* (STEINERT, 1960); *T. rotatorium* (DESSER, 1973); *T. galba* (PÉREZ-REYES, 1976); *T. montezumae* (CORTES *et al.*, 1976) e *T. fallisi* (MARTIN & DESSER, 1991).

MARTIN & DESSER (1991b) relataram a presença de citóstoma e citofaringe em *T. fallisi*. Estes autores verificaram a presença de reservosomos que são organelas envolvidas na via endocítica dos tripanossomas e foram descritas em *Trypanosoma cruzi* (SOARES & DE SOUZA, 1988).

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍNEOS

Resumo

O presente estudo teve como objetivo verificar a presença de tripanossomas em anuros e caracterizar morfológicamente e morfometricamente as formas sangüíneas encontradas. Para tal, 19 espécies de anuros das famílias Bufonidae, Microhylidae, Hylidae e Leptodactylidae foram coletadas durante as atividades de resgate de fauna da Usina Hidrelétrica do Guaporé, na divisa dos municípios Vale de São Domingos, Pontes e Lacerda, MT e no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. Verificou-se, por esfregaços sangüíneos e impressões de órgãos, a presença de tripanossomas em *Osteocephalus* sp., *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus lineatus* procedentes do estado do Mato Grosso e *Leptodactylus ocellatus* procedente do Município de Seropédica, RJ. Tripanossomas foram observados em esfregaços sangüíneos e impressões de órgãos em 36,36% dos hospedeiros analisados de *Osteocephalus* sp., 50% de *Leptodactylus chaquensis*, 100% de *Leptodactylus fuscus*, 100% de *Leptodactylus lineatus* e 100% de *Leptodactylus ocellatus*. Verificou-se polimorfismo das espécies encontradas, separando-se *Trypanosoma* sp.1; *Trypanosoma* sp.2; *Trypanosoma chattoni*; *Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*) e *Trypanosoma* sp.3. Destes o polimorfismo mais acentuado foi verificado em *Trypanosoma* sp.3. Este estudo faz o primeiro registro da infecção por tripanossomas em anuros do gênero *Osteocephalus*; nas espécies *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus lineatus* e a ocorrência de *Trypanosoma chattoni* em espécies do gênero *Leptodactylus* e no Brasil.

Palavras-chave: *Trypanosoma rotatorium*, *Trypanosoma chattoni*, Anura, Morfometria.

1.0 INTRODUÇÃO

Os tripanossomas de anuros foram relatados, desde meados do séc. XIX, em quase todos os continentes, parasitando diversas espécies de anuros, sanguessugas e algumas espécies de dípteros hematófagos.

O polimorfismo, amplamente relatado neste grupo de tripanossomas ocorre no hospedeiro vertebrado, com marcada mudança da forma. Estudos que propuseram descrições de espécies utilizando como único caráter a morfologia dos tripomastigotas sangüíneos, resultaram em problemas de cunho taxonômico cuja validade de algumas espécies, muitas vezes, foi questionada.

Desta forma, espécies próximas foram descritas como única espécie polimórfica ou espécies altamente polimórficas, descritas como distintas, gerando contradição e problemas na taxonomia do grupo. Poucas são as espécies que apresentam características morfológicas marcadamente distintas, como *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911.

Segundo BARDSLEY & HARMSSEN (1973) e WERNER & WALEWSKI (1976), a descrição de *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) não incluiu a caracterização morfológica das organelas acarretando, desde seu achado, falhas que resultam até os dias atuais em identificações errôneas. Após esta descrição, diversas novas espécies foram propostas baseando-se em dados morfológicos e morfométricos que muitas vezes resultaram em sinonímias.

Estes tripanossomas apresentam sítios de concentração no hospedeiro vertebrado, sendo encontrados na circulação periférica e visceral, sobretudo nos rins, onde são mais frequentes (MACHADO, 1911; KUDO, 1922; FANTHAM *et al.*, 1942; SOUTHWORTH *et al.*, 1968; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; JONES & WOO, 1986 e 1989).

No Brasil, foi relatada a ocorrência de tripanossomas em anuros por FERREIRA *et al.* (2003), LEMOS *et al.* (2003) e SANTOS *et al.* (2005) e de *T. rotatorium* por MACHADO (1911); GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969), PESSOA (1969) e ELISEI *et al.* (2002); de *T. borreli* por MARCHOUX & SALIMBENI (1907); de *T. celestinoi* por BRUMPT (1936) e *T. leptodactyli* por CARINI (1910), BRUMPT (1914) e PESSOA (1969).

A presença de tripanossomas em anuros em regiões do estado do Mato Grosso por LEMOS *et al.* (2003) e os relatos de ELISEI *et al.* (2002), no município de Seropédica, RJ motivaram a realização do levantamento dos tripanossomas e sua caracterização segundo a morfologia e morfometria das formas sangüíneas encontradas na circulação periférica e visceral dos anuros coletados em regiões dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Captura e dados dos hospedeiros

Na divisa dos municípios Vale de São Domingos, Pontes e Lacerda, MT (15° 07' 32"S, 58° 57' 16"W), durante atividades de resgate de fauna, 20 espécies de anuros adultos das famílias Bufonidae, Microhylidae, Hylidae e Leptodactylidae (TAB. 1) foram capturadas. As coletas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Núcleo de Fauna da Gerência Executiva - Mato Grosso, com protocolo de licença de coleta n^{os} 011/02, 030/02 e 001/UHE Guaporé.

No Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (22° 44' 08"S e 43° 42' 27"W), foram capturados, duas espécies de anuros adultos da família Leptodactylidae (Tabela I), sendo um jovem da espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) e dois jovens e dois adultos da espécie *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (TAB. 1). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com protocolo de licença de coleta n^o042/06 RAN, processo n^o2010.002541/05-00.

A manipulação dos anuros em condições de laboratório foi autorizada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora com protocolo de licença n^o048/2006.

2.2 Coleta e análise dos parasitos

Os anuros procedentes do campus da UFRRJ foram anestesiados com inoculação intraperitoneal de lidocaína 2%, (35mL/Kg) e lavados em álcool 70%. Destes anuros foram obtidas impressões do coração, fígado, baço e rins. Amostras de sangue de todos os anuros coletados no estado do Mato Grosso e no Município de Seropédica foram obtidas por punção cardíaca, feita no cone arterioso, preparados esfregaços sanguíneos. Todas as preparações foram fixadas em metanol por três minutos, secadas ao ar e coradas pelo May-Grünwald e Giemsa, analisadas em aumento de 200X em 50 campos para determinação da parasitemia dos tripanossomas. Todas as necropsias foram realizadas em mesmo horário, aproximadamente 15h30min para que não houvesse interferência na concentração dos parasitos, nos órgãos analisados, pela migração dos tripanossomas ao longo do dia.

TABELA 1. Procedência das famílias, respectivas espécies de anuros e número de indivíduos coletados nos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.

Família	Espécies de anuros	Número de indivíduos	Localidade
Bufonidae	<i>Bufo paracnemis</i> Lutz, 1925	4	Mato Grosso
	<i>Bufo margaritifera</i> Laurenti, 1768	9	Mato Grosso
Hylidae	<i>Hyla</i> sp. Laurenti, 1768	1	Mato Grosso
	<i>Hypsoboas raniceps</i> Cope, 1862	1	Mato Grosso
	<i>Scinax ruber</i> (Laurenti, 1768)	1	Mato Grosso
	<i>Osteocephalus</i> sp. Steindachner, 1862	11	Mato Grosso
	<i>Phyllomedusa boliviana</i> Boulenger, 1902	2	Mato Grosso
Microhylidae	<i>Elachistocleis ovalis</i> Schneider, 1799	1	Mato Grosso
	<i>Ctenophryne geayi</i> Mocquard, 1904	3	Mato Grosso
Leptodactylidae	<i>Physalaemus albonotatus</i> (Steindachner, 1864)	1	Mato Grosso
	<i>Eleutherodactylus</i> sp. Duméril & Bibron, 1841	2	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus chaquensis</i> Cei, 1950	2	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus elenae</i> Heyer, 1978	1	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	1	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824)	2	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus lineatus</i> (Schneider, 1799)	3	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus rhodomystax</i> Boulenger, 1884 "1883"	1	Mato Grosso
	<i>Proceratophrys concavitympanum</i> Giaretta, Bernarde, & Kokubum, 2000	3	Mato Grosso
	<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	1	Rio de Janeiro
	<i>Leptodactylus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)	4	Rio de Janeiro

2.3 Análise morfológica e morfométrica

Para a caracterização morfológica e morfométrica, de cada espécie hospedeira parasitada

foram fotografados 20 tripanossomas e medidos, utilizando-se curvímeter aferido por micrografia de régua graduada barra micrométrica e pelos programas GPS TrakMaker 11.7 e analySIS® Soft Imaging System GmbH 2003. Dos hospedeiros que apresentaram mais de um tipo morfológico de tripanossomas, foram medidos 20 dos indivíduos mais frequentes e 10 dos menos frequentes. Quando a frequência dos parasitos não atingia estes números, foram medidos todos os tripanossomas encontrados. Nos hospedeiros da espécie *L. ocellatus*, nos quais foram feitas impressões de órgãos, a metodologia citada foi repetida para cada órgão parasitado além dos esfregaços sangüíneos. As medidas utilizadas para análise morfológica e morfométrica foram as seguintes: comprimento do corpo (CC), do núcleo (CN) e cinetoplasto (CK); tamanho do flagelo livre (F), largura do corpo (L), do núcleo (LN) e cinetoplasto (LK); distâncias entre o meio do núcleo e a região anterior do corpo (NA), meio do núcleo e região posterior do corpo (NP), meio núcleo e o meio do cinetoplasto (NK), cinetoplasto à região anterior do corpo (KA) e cinetoplasto à região posterior do corpo (KP).

Foram calculados os índices nuclear (IN) NP/NA (DIAS & FREITAS, 1943 *apud* HOARE, 1972) e cinetoplasmático (IC) NP/NK (KEYMER, 1967 *apud* HOARE, 1972).

2.4 Análise estatística

Para análise foi utilizada estatística descritiva dos dados morfométricos, análise de variância de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5% e teste de Correlação de Spearman. Os dados foram analisados pelo programa estatístico BioEstat 2.0.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No material analisado dos anuros dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro, foram encontrados parasitos do gênero *Trypanosoma*, somente em indivíduos das famílias *Hylidae* e *Leptodactylidae*. A Tabela 2 apresenta dados sobre a procedência e os hospedeiros examinados.

3.1 Hospedeiros infectados e sítios de infecção

Os maiores percentuais de hospedeiros infectados foram registrados nas espécies *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus lineatus* e *Leptodactylus ocellatus* (TAB.2). Em *Leptodactylus chaquensis* 50% dos hospedeiros apresentaram infecção por tripanossoma e em *Ostheocephalus*, foram verificados em 36% (TAB.2).

TABELA 2. Prevalência (%) e número de hospedeiros infectados por tripanossomas provenientes dos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro.

Família	Espécies de anuros	Número de indivíduos	Localidade	Prevalência
Hylidae	<i>Osteocephalus</i> sp. Steindachner, 1862	11	Mato Grosso	36%
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i> Cei, 1950	2	Mato Grosso	50%
	<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	1	Mato Grosso	100%
	<i>Leptodactylus lineatus</i> (Schneider, 1799)	3	Mato Grosso	100%
	<i>Leptodactylus ocellatus</i> (Linnaeus, 1758)	4	Rio de Janeiro	100%

Dentre os anuros coletados no estado do Mato Grosso, a menor parasitemia foi observada em *L. fuscus* e a maior em *L. lineatus* (Fig.1). Todos os órgãos analisados de *L. ocellatus* apresentaram-se infectados por tripanossomas, constatando-se maior percentual de tripanossomas nos rins (Fig. 2), indicando que este é o principal sítio de infecção. Em um dos hospedeiros verificou-se maior percentual de tripanossomas no coração (Fig.2). Os parasitos foram observados em menor percentual na circulação periférica.

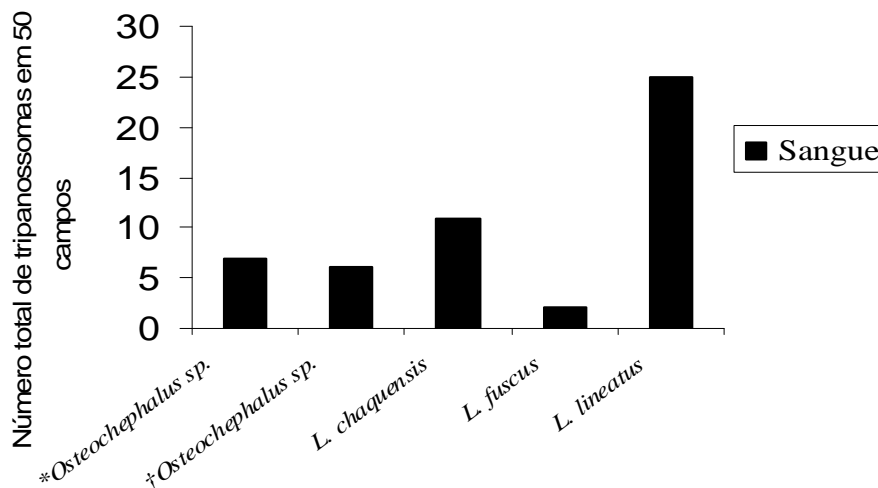


Figura 1. Parasitemia encontrada em anuros coletados no estado do Mato Grosso. * e † referem-se a diferentes hospedeiros do gênero *Osteocephalus*.

KUDO (1922) e FANTHAM *et al.* (1942) relataram que *T. rotatorium*, semelhantes às formas observadas em *L. ocellatus*, foi encontrada na circulação visceral e menos observada na

circulação periférica. Estas formas foram encontradas com frequência na circulação visceral do fígado e dos rins por BARDSLEY & HARMSSEN (1973).

MACHADO (1911), estudando *L. ocellatus* no estado do Rio de Janeiro, observou tripanossomas, identificados como *T. rotatorium*, na circulação periférica e verificou concentração dos parasitos no fígado e nos rins, onde foram mais frequentes. Resultados semelhantes foram observados por KUDO (1922); SOUTHWORTH *et al.* (1968) e BARDSLEY & HARMSSEN (1973) e corroboram os observados no presente estudo.

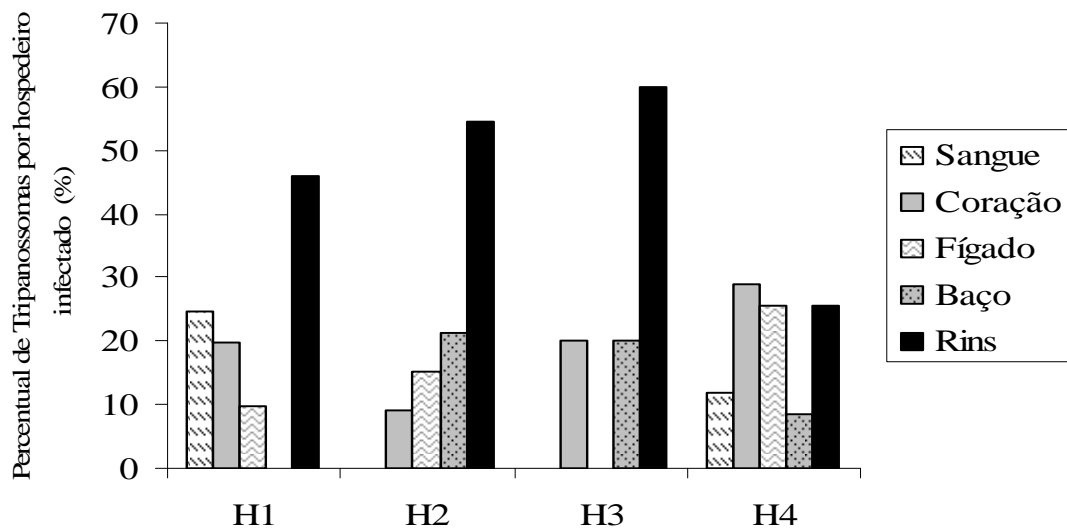


Figura 2. Percentual de tripanossomas encontrados na circulação periférica e visceral em *Leptodactylus ocellatus*.

Destaca-se que os tripanossomas relatados em *L. ocellatus* apresentaram predominância na circulação renal em relação aos outros órgãos examinados.

3.2 Taxonomia dos tripanossomas

Verificou-se variação dos parasitos, segundo a morfologia e morfometria dos tripomastigotas sanguíneos. Variação morfológica foi observada entre as diferentes espécies encontradas e entre parasitos de mesma espécie. Tripanossomas alongados, arredondados com membrana ondulante e flagelo livre e arredondados com ausência de membrana ondulante e flagelo livre foram observados.

Trypanosoma sp. 1

(Figura 3)

Hospedeiro: *Osteocephalus* sp.

Família: Hylidae

Procedência: Mato Grosso, Brasil

Percentual de hospedeiros infectados: 18,18% correspondem a dois hospedeiros infectados

Sítio de infecção: Circulação periférica

Foi verificada infecção por tripanossoma em dois espécimes de *Osteocephalus* sp. A identificação específica não foi possível dada ausência de evidenciação de estruturas internas, como núcleo e cinetoplasto.

Estes indivíduos apresentaram menor afinidade tintorial, corando-se de maneira intensa e o citoplasma apresenta intensa vacuolização. Os tripanossomas apresentam o corpo alongado, com extremidade posterior arredondada; membrana ondulante conspícua com quatro a seis dobras e pequeno flagelo livre, em alguns indivíduos, este não foi visualizado. Em *Trypanosoma* sp.1, não foram realizadas análise morfológica e morfométrica bem como sua comparação com outras espécies. É provável, pelas características mencionadas, que estes parasitos estivessem em processo de degradação.

Faz-se o primeiro registro da infecção por tripanossomas em anuros do gênero *Osteocephalus* e da ocorrência de tripanossomas de anuros no estado do Mato Grosso.

***Trypanosoma* sp. 2**
(Figuras 4-5)

Hospedeiro: *Leptodactylus lineatus* (Schneider, 1799)

Família: Leptodactylidae

Procedência: Mato Grosso, Brasil

Percentual de hospedeiros infectados: 100%, correspondem a três hospedeiros infectados

Sítio de infecção: Circulação periférica

Os dados dos parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 3. Os parasitos apresentaram o corpo alongado com extremidades afiladas, em forma de C ou S, membrana ondulante conspícua e flagelo livre. Foram observadas variações na largura destes tripanossomas e, de acordo com a fórmula de Yule, agrupadas em seis classes e definidas como delgadas e largas (Figs. 4-5) o que foi confirmado pela análise estatística (Kruskall-Wallis – $P < 0.05$).

Nestes tripanossomas, o núcleo oval, alongado e claro está situado na região posterior ($IN < 1$), paralelo ao maior eixo do corpo e com área clara anterior e próxima ao núcleo (Fig.4), entretanto, em alguns indivíduos apresentou-se perpendicular. O cinetoplasto periférico está localizado próximo ao núcleo ($IK > 2$) (Fig. 4-5). Nas formas delgadas, o cinetoplasto apresentou-

se arredondado (Fig.4) e nas formas largas, alongado e perpendicular ao maior eixo do corpo. O citoplasma apresenta vacúolos localizados, principalmente, na região posterior do corpo (Fig.5). A membrana ondulante é conspícua, apresentando de 8 a 10 dobras. O flagelo livre é curto medindo aproximadamente 20µm, cerca de 1/5 do tamanho corporal.

Nos parasitos largos, conspícuas estriações longitudinais foram mais frequentemente observadas que nas formas delgadas, sendo evidentes na região anterior do corpo.

TABELA 3. Dados morfométricos de *Trypanosoma* sp2. em *Leptodactylus lineatus*. Medidas apresentadas em µm, dispostas por média, ± desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).

Morfotipo	Delgado			Largo		
	Média	± desvio padrão	Amplitude	Média	± desvio padrão	Amplitude
CT	116.4	±19.9	(95 - 153)	127.8	±13.2	(110 - 148)
CC	102.2	±20.4	(50 - 125)	105.1	±7.8	(90 - 120)
L	5.0	±2.0	(3.2 - 9.4)	10.4	±1.6	(9 - 15)
F	20.3	±7.2	(8.2 - 30.3)	22.5	±6.3	(12 - 30)
NC	6.3	±2.0	(3.1 - 10)	6.9	±1.6	(3.3 - 10)
NL	4.4	±1.2	(2.6 - 7.2)	4.8	±1.3	(2.6 - 7)
NA	73.3	±12.3	(36.3 - 90.2)	71	±5.7	(60.5 - 80.2)
NP	29.8	±7.1	(13 - 40.1)	34.1	±4.7	(22.1 - 42.2)
KN	3.8	±1.7	(1.6 - 8)	2.7	±1.1	(1.5 - 6)
KC	1.1	±0.3	(0.6 - 1.8)	1.8	±0.5	(0.5 - 2.4)
KL	0.9	±0.3	(0.5 - 1.6)	0.9	±0.4	(0.4 - 2)
KA	77.3	±14.9	(47.1 - 100.4)	73.9	±13.8	(46 - 91)
KP	23.8	±5.4	(13.1 - 31)	24	±4.8	(7.1 - 35)

*CT=comprimento total do corpo, CC=comprimento do corpo, L=largura do corpo, F=comprimento do flagelo livre, NC= comprimento do núcleo, NL=largura do núcleo, N =distância do núcleo à extremidade anterior do corpo, NP=distância do meio do núcleo à extremidade posterior do corpo, NK=distância do meio do núcleo ao meio do cinetoplasto, KA= distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo, KP=distância do cinetoplasto à extremidade posterior do corpo.

O teste de correlação de Spearman indicou correlação de 68%, demonstrando que o aumento do tamanho do corpo resulta em maior distanciamento do cinetoplasto à região anterior do corpo ($r_s=0,68$ e $P<0,001$). O teste de Mann-Whitney indicou haver diferenças significativas entre os indivíduos delgados e largos referentes ao comprimento total ($p<0,05$), à largura ($P<0,001$), à distância do núcleo ao cinetoplasto ($P<0,03$) e à distância do núcleo à região posterior do corpo ($P<0,03$).

As formas sangüíneas de *Trypanosoma* sp. 2, assemelharam-se a *T. bufophlebotomi* e a *T. fallisi*, encontradas em bufonídeos dos EUA e Canadá respectivamente (AYALA, 1971; MARTIN

& DESSER, 1990). *Trypanosoma* sp.2 assemelhou-se ainda a *Trypanosoma* sp. encontrada por GERRERO & AYALA (1977) no Peru, entretanto os autores não mencionaram variação morfológica nesta espécie.

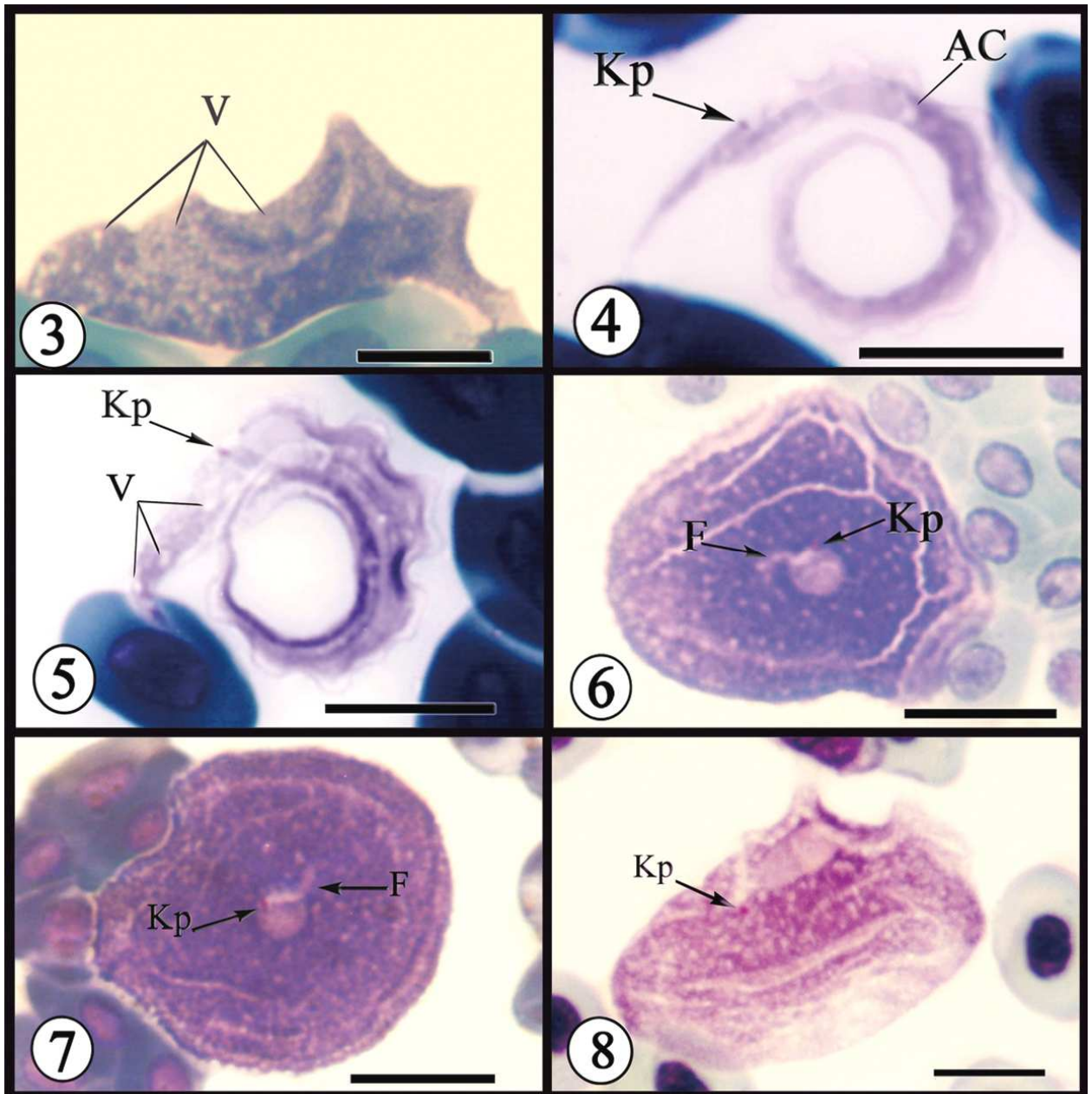
FENG & CHUNG (1940); PÉREZ-REYES (1968) e MARTIN & DESSER (1990) relataram que a variação morfológica em *T. bocagei*, *T. galba* e *T. fallisi*, respectivamente estava associada ao tempo de infecção. Para FENG & CHUNG (1940) as formas jovens são mais largas, enquanto as maduras mais delgadas. MARTIN & DESSER (1990) sugeriram que esta variação está associada à variação da temperatura ao longo das estações do ano, ou ainda que a temperatura possa influenciar a resposta imunológica dos hospedeiros.

Em *Trypanosoma* sp. 2 não foi possível determinar o estágio da infecção pela morfologia dos parasitos. Os hospedeiros, em seu habitat natural poderiam ser reinfectedos inúmeras vezes ou ainda, que esta espécie poderia apresentar variação na largura corporal em resposta a fatores endógenos do hospedeiro, como relatado por GALLIARD *et al.* (1954) e não somente à variação da temperatura.

Trypanosoma sp. 2 apresentou semelhanças morfométricas e quanto à morfologia corporal externa, orientação, morfologia do núcleo e presença de uma área clara pré-nuclear de *T. fallisi* e *T. bufophlebotomi*. Embora *Trypanosoma* sp. 2 apresente maior comprimento do corpo, a posição do cinetoplasto em relação à extremidade posterior, entre estes parasitos, é semelhante. A análise de correlação confirmou que a distância do cinetoplasto varia em relação à extremidade anterior do corpo. Desta forma, o provável é que o tripanossoma cresça por alongamento da região anterior do corpo o que poderia reforçar as semelhanças entre a posição desta organela à região posterior do corpo entre *Trypanosoma* sp. 2, *T. fallisi* e *T. bufophlebotomi*.

A morfologia do cinetoplasto difere entre *Trypanosoma* sp. 2 e as espécies mencionadas. Em *T. bufophlebotomi* o cinetoplasto é marcadamente retangular, em *T. fallisi* é quadrado ou oval e ambos apresentam os pólos fortemente corados, separados por área clara central. Tal característica não foi observada em *Trypanosoma* sp. 2.

O grau de infectividade pode estar relacionado à linhagem evolutiva dos hospedeiros vertebrados uma vez que a infecção pela mesma espécie de tripanossoma entre hospedeiros próximos tenha diminuído ao longo do tempo, por incompatibilidade fisiológica aumentando a distância evolutiva, resultando em especiação destes tripanossomas (MARTIN e DESSER, 1990; 1991b).



Prancha 1. Tripanossomas de anuros, barra 10 μ m. *AC (área clara), F (flagelo), Kp (cinetoplasto), V (vacúolos).
 Figura 3. *Trypanosoma* sp.1 em processo degenerativo, linhas indicam pequenos vacúolos (v). Figuras 4 e 5
Trypanosoma sp.2 encontrados em *L. lineatus*. Figura 4 forma delgada com cinetoplasto (Kp) arredondado e área clara
 anterior ao núcleo (AC). Figura 5 forma larga com cinetoplasto (Kp) perpendicular ao maior eixo do corpo e vacúolos
 (V) localizados principalmente na região posterior do corpo. Figuras 6 e 7 *T. chattoni* encontrado em *L. fuscus*. Figura
 6 tripanossoma com cinetoplasto (Kp) juxtenuclear e pequeno flagelo (F) marcando o citoplasma como canal claro.
 Figura 7 cinetoplasto (Kp) localizado sobre o núcleo. Figura 8 *T. rotatorium* (*lato sensu*) encontrada em
Osteocephalus sp. e em *Leptodactylus chaquensis* forma de corpo curto e extremidades arredondadas com
 cinetoplasto (Kp) arredondado e membrana ondulante.

A semelhança de *Trypanosoma* sp.2 com outras espécies confirmou o polimorfismo deste grupo, já relatado por BARDSLEY & HARMSSEN (1973), MARTIN e DESSER (1990; 1991a), CLARK *et al.* (1995), LUN & DESSER (1996), DESSER (2001) e MARTIN *et al.* (2002).

Registra-se a infecção por tripanossomas em *Leptodactylus lineatus*.

***Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911**
(Figuras 6-7)

Hospedeiro: *Leptodactylus fuscus* Schneider, 1799

Família: Leptodactylidae

Procedência: Mato Grosso, Brasil

Percentual de hospedeiros infectados: 100% corresponde a um hospedeiro infectado.

Sítio de infecção: Circulação periférica

Os dados dos parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 4. *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911 (Figuras 6-7), apresenta o corpo arredondado e um pequeno flagelo. O núcleo é arredondado e claro, localizado no centro do corpo (IN=1). O cinetoplasto alongado encontra-se justaposto ao núcleo (Fig.6); em três espécimes, foi observado sobreposto a ele (Fig. 7). O citoplasma é granular e densamente corado. O flagelo é pequeno, não ultrapassa a metade do corpo, cerca de 1/6 do tamanho corporal e marca o citoplasma como um canal claro. Indivíduos distorcidos, excluídos das análises morfológica e morfométrica, foram observados apresentando variações morfológicas e na pigmentação além de dobras do citoplasma.

Para *T. chattoni*, o teste de correlação de Spearman indicou que o tamanho do núcleo se correlaciona positivamente com o tamanho do corpo. Ou seja, o comprimento e largura do núcleo variaram com o comprimento e largura do corpo ($r_s=0.67$ e $P=0.008$) e ($r_s= 0,72$ e $P=0.01$) respectivamente. O referido teste indicou correlação positiva, 64%, aproximadamente, entre o comprimento e largura do núcleo ($r_s=0.64$ e $P=0.03$). O mesmo ocorreu com o comprimento e largura do cinetoplasto ($r_s.=0,71$ e $P=0,02$) confirmando as análises morfológicas das referidas organelas.

Trypanosoma chattoni, observada no presente estudo, assemelhou-se às formas descritas por MATHIS & LEGER (1911b), e às relatadas por DIAMOND (1965) nos EUA, MIYATA (1978) no Japão, WERNER (1993) na China, JONES & WOO (1986) no Canadá e DESSER (2001) na Costa Rica. Estas foram menores e mais delgadas que as encontradas por MATHIS & LEGER (1911b) e MIYATA (1978), maiores e mais delgadas que as encontradas por JONES & WOO (1986), menores

que as encontradas por WERNER (1993) e mais delgadas que as encontradas por DESSER (2001). Esta variação morfométrica de *T. chattoni* observada no presente estudo e àquelas relatadas na Ásia e Américas pode estar associada à baixa especificidade de *T. chattoni* em relação ao hospedeiro vertebrado, como relataram BARDSLEY & HARMSSEN (1973), WERNER (1993) e DESSER (2001) em diferentes espécies hospedeiras.

TABELA 4. Dados morfométricos de *Trypanosoma chattoni* em *Leptodactylus fuscus*. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).

	CC	L	F	NC	NL	NA	NP	KC	KL	KA	KP
<i>Trypanosoma chattoni</i>	34.5	27.6	5.1	5.1	4.3	17.5	17.2	1.2	0.7	18.7	16.1
	± 3.5	± 3.1	± 1.1	± 0.6	± 0.5	± 2.7	± 2.5	± 0.2	± 0.2	± 2.9	± 2.9
	(27 - 39)	(19 - 31)	(3 - 6)	(4 - 6)	(3.2 - 5.5)	(12.6 - 22.4)	(12.8 - 20.8)	(0.9 - 1.5)	(0.4 - 1.1)	(13.3 - 24.7)	(11.3 - 20.6)

*CC = comprimento do corpo, L = largura do corpo, F = comprimento do flagelo livre, NC = comprimento do núcleo, NL = largura do núcleo, NA = distância do núcleo à extremidade anterior do corpo, NP = distância do meio do núcleo à extremidade posterior do corpo, KA = distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo, KP = distância do cinetoplasto à extremidade posterior do corpo.

MATHIS & LEGER (1911b) caracterizaram o cinetoplasto como intranuclear. VUCETICH & GIACOBBE (1949) encontraram parasito semelhante à *T. chattoni* e relataram, em alguns indivíduos, tal posição do cinetoplasto. Entretanto, DIAMOND (1965) questionou esta posição, uma vez que a referida organela é parte do sistema mitocondrial e não poderia estar localizada no interior do núcleo. O provável é que o deslocamento do cinetoplasto tenha ocorrido durante a preparação do esfregaço sanguíneo. Esta condição ocorreu em baixa frequência, sendo verificada em 0,13% dos tripanossomas observados por JONES & WOO (1986) e em 0,2% no presente estudo.

MIYATA (1978) descreveu *Trypanosoma tsunozomiyatai* em ranídeos do Japão, semelhante a *T. chattoni* relatada pelo autor no mesmo estudo, da qual diferiu quanto à morfometria corporal e presença de uma área clara que circunda a periferia do corpo. Segundo WERNER (1993) o parasito observado por MIYATA (1978) pode ser considerado sinônimo de *T. chattoni*. No presente estudo, esta área clara foi observada em um espécime, provavelmente como consequência da preparação, o que corrobora as considerações de WERNER (1993).

Segundo VUCETICH & GIACOBBE (1949) e WERNER & WALEWSKI (1976), *T. chattoni* é sinônimo de *T. rotatorium*. VUCETICH & GIACOBBE (1949) verificaram a ocorrência de um parasito semelhante a *T. chattoni* em *Bufo arenarum*, na Argentina. Estes autores não consideraram *T. chattoni* espécie válida, mas uma variação morfológica de *T. rotatorium*.

Segundo WERNER & WALEWSKI (1976), as formas perdem o flagelo livre e ocorre retração da membrana ondulante para o interior da célula.

BARDSLEY & HARMSSEN (1973) questionaram a validade de *T. chattoni*. Estes autores sugeriram que DIAMOND (1965) havia relatado formas reprodutivas de outras espécies e questionaram a semelhança do isolado de DIAMOND (1965) comparada à descrição de MATHIS & LEGER (1911b). Entretanto, LUN & DESSER (1996) e MARTIN *et al.* (2002) por análises moleculares confirmaram sua validade como espécie monomórfica.

Somado a isso, a semelhança entre as formas encontradas no presente estudo e as da descrição original por MATHIS & LEGER (1911b) e às caracterizações de DIAMOND (1965) e JONES & WOO (1986) permitiram a identificação deste tripanossoma.

Trypanosoma chattoni, espécie monomórfica, foi relatada por MATHIS & LEGER (1911b), em *Bufo melanostictus* no Vietnam; MIYATA (1978), em *Rana holsti* e *Rana narina*, no Japão; WERNER (1993) em *Bufo gargarizans*, na China; DIAMOND (1965) em *R. pipiens*, nos EUA.; JONES & WOO (1986) em *R. pipiens*, no Canadá; DESSER (2001) em *Rana vaillante*, na Costa Rica, sendo este o primeiro registro para a América Central. A presença deste parasito em diferentes gêneros e espécies de anuros sugere baixa especificidade parasitária (WERNER, 1993).

Este estudo apresenta o primeiro relato do parasitismo por *T. chattoni* em *L. fuscus* e faz o primeiro registro da ocorrência de *T. chattoni* no Brasil e em hospedeiros do gênero *Leptodactylus*.

***Trypanosoma rotatorium lato sensu* (Mayer, 1843) Laveran & Mesnil, 1901**
(Figs. 8-9)

Hospedeiro: *Osteocephalus* sp.

Família: Hylidae

Procedência: Mato Grosso, Brasil

Percentual de hospedeiros infectados: 18,18% correspondem a dois hospedeiros infectados

Sítio de infecção: Circulação periférica

Hospedeiro: *Leptodactylus chaquensis* Cei, 1950

Família: Leptodactylidae

Procedência: Mato Grosso, Brasil.

Percentual de hospedeiros infectados: 50% correspondem a dois hospedeiros infectados

Sítio de infecção: Circulação periférica

Os dados dos parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 5. Os tripanossomas encontrados nestes hospedeiros apresentaram semelhanças morfológicas e foram identificados como *T. rotatorium* (*lato senso*). Estes parasitos apresentam o corpo arredondado e curto. O núcleo oval e alongado está localizado na periferia do corpo, próximo à membrana ondulante. (Fig. 8-9). O cinetoplasto arredondado situa-se próximo ao núcleo ($IK > 2$) e em alguns indivíduos foi observada área clara ao seu redor. O citoplasma é granular e apresenta vacúolos ao longo da extensão citoplasmática. Em alguns indivíduos foi verificada maior pigmentação e formação de canais claros marcando o citoplasma celular (Fig. 8). A membrana ondulante é conspícua apresentando de 4 a 6 dobras; em alguns espécimes, foi observada marcando o citoplasma na forma de canais claros (Fig. 9). O flagelo livre não foi visualizado.

Para estes tripanossomas, o teste de correlação de Spearman demonstrou que quanto maiores o comprimento e a largura do corpo, maiores serão o comprimento e a largura do núcleo, ($r_s = 0.67$ e $P < 0.003$ e $r_s = 0.69$ e $P < 0.003$), respectivamente, indicando que o crescimento do núcleo está associado ao crescimento do corpo do tripanossoma.

Estas formas assemelharam-se morfológicamente às relatadas por MACHADO (1911); KUDO (1922); JACONO (1938); FANTHAM *et al.* (1942); ao terceiro morfotipo, sem flagelo livre de VUCETICH & GIACOBBE (1949); PÉREZ-REYES *et al.* (1960), MIYATA (1978) e WERNER (1993) identificadas como formas de *T. rotatorium*.

Os parasitos encontrados apresentaram variações morfométricas em relação àqueles relatados na Ásia, Américas e Europa, o que pode estar associado à baixa especificidade das formas do complexo *T. rotatorium* em relação ao hospedeiro vertebrado. Variações morfométricas destes parasitos já foram assinaladas por VUCETICH & GIACOBBE (1949), BARDSLEY & HARMSSEN (1973) e DESSER (2001), em função das diferentes espécies hospedeiras.

Segundo WERNER & WALEWSKI (1976) e BARTA *et al.* (1989) há discordância quanto à ocorrência de *T. rotatorium* nas Américas, com base na morfologia do núcleo. WERNER & WALEWSKI (197) relataram que Mayer na descrição de *T. rotatorium* não fez menção a estruturas internas e posteriormente, FRANÇA & ATHIAS (1907) relataram que *T. rotatorium* apresentava núcleo alongado, sendo consideradas como autênticas as espécies que apresentaram este tipo de núcleo. Para WERNER & WALEWSKI (1976) a morfologia do núcleo será sempre um argumento acadêmico para se considerar os diferentes pontos de vistas, não sendo conclusivo para a ocorrência desta espécie em diferentes áreas geográficas.

O polimorfismo desta espécie foi amplamente registrado (MACHADO, 1911; KUDO, 1922; FANTHAM *et al.*, 1942; VUCETICH & GIACOBBE, 1949; RUIZ & ALFARO, 1958; LEHMANN, 1959;

PERES-REYES *et al.*, 1960; CREEMERS & JADIN, 1966; GONÇALVES DA COSTA & SILVA, 1969; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; MIYATA, 1976; MIYATA, 1978; BARTA *et al* 1989; MARTIN *et al.*, 1992; LUN & DESSER, 1996; DESSER, 2001).

TABELA 5. Dados morfométricos de *Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*) em *Osteocephalus* sp. e *Leptodactylus chaquensis*. Medidas apresentadas em µm, dispostas por média, ± desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).

	<i>Trypanosoma rotatorium</i> *			<i>Trypanosoma rotatorium</i> †		
CC	28.6	± 4	(20.5 - 33.9)	32.2	±3.2	(25.2 - 36)
L	18.8	± 4.1	(13.2 - 25.8)	18.5	±2.1	(14.3 - 21.4)
NC	9.5	± 2.4	(3.5 - 13.3)	8.2	±0.8	(7.3 - 9.4)
NL	3.5	± 0.4	(3 - 4.4)	3.3	±0.3	(2.9 - 3.8)
NA	14.2	± 2.9	(11.4 - 20.3)	17.05	±1.8	(15- 20)
NP	15.4	± 4.3	(8.2 - 20.1)	16.7	±3.3	(11.3 - 19.5)
KN	6.05	± 2.1	(4.6 - 8.5)	5.2	±1.07	(4.1 - 5.5)
KC	1.7	±0.3	(1.4 - 2.0)	1.02	±0,1	(0,77 - 1.5)
KL	1.03	±0.2	(0.79 - 1.4)	0.8	±1.1	(0,75 - 01.1)
KA	19.1	± 2.8	(16.3 - 22.4)	18.6	±7.8	(18.1- 23.8)
KP	11.4	± 1.7	(9.2 - 13.4)	10.9	±2.5	(7.1 - 13.8)

**Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*) encontrado em *Osteocephalus* e †*Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*) encontrado em *Leptodactylus chaquensis*. §CC = comprimento do corpo, L = largura do corpo, F = comprimento do flagelo livre, NC = comprimento do núcleo, NL = largura do núcleo, NA = distância do núcleo à extremidade anterior do corpo, NP = distância do meio do núcleo à extremidade posterior do corpo, KA = distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo, KP = distância do cinetoplasto à extremidade posterior do corpo.

No presente estudo, assume-se a semelhança morfológica entre as formas já relatadas e às identificadas como *T. rotatorium*, entretanto permanece a utilização do termo abrangente (*lato sensu*) seguindo as recomendações de DESSER (2001) para se evitar que mais espécies sejam alocadas incorretamente.

Este estudo apresentou o primeiro registro da ocorrência de *T. rotatorium* (*lato sensu*) em anuros do gênero *Osteocephalus* e em *L. chaquensis*.

***Trypanosoma* sp. 3**
(Figs 10-14)

Hospedeiro: *Leptodactylus ocellatus* Linnaeus, 1758

Família: Leptodactylidae

Procedência: Rio de Janeiro, Brasil

Percentual de hospedeiros infectados: 100% correspondem a quatro hospedeiros

Sítio de infecção: Circulação visceral do coração, fígado, baço e rins e circulação periférica

Foi verificada infecção por tripanossomas semelhantes à *T. rotatorium* em todos os anuros da espécie *L. ocellatus* coletados no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O parasito apresentou variação morfológica dentre os hospedeiros analisados, sendo verificados os seguintes tipos morfológicos: longos e delgados (TM1); largos com extremidades arredondadas, com membrana ondulante e flagelo livre (TM2); e arredondados sem membrana ondulante (TM3). Os dados dos parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 6.

Nos hospedeiros jovens analisados, verificou-se variação morfológica dos parasitos. O tipo morfológico mais freqüente foi o TM1, de corpo delgado, alongado e com flagelo livre (Fig. 10). O núcleo oval e alongado situa-se na região posterior ($IN < 1$) e está disposto paralelamente ao maior eixo do corpo. Entretanto, observaram-se indivíduos com núcleo arredondado. O cinetoplasto alongado, em alguns indivíduos côncavo, apresenta extremidades arredondadas e esta localizado próximo à região posterior do corpo ($IK < 2$). O citoplasma é finamente granular, apresenta vacúolos por toda extensão citoplasmática concentrados na extremidade posterior do corpo (Fig. 10), principalmente na porção terminal verificado pela formação de região translúcida. Os tripanossomas TM1 apresentam estriações e grânulos fortemente corados, observados ao longo da extensão citoplasmática (Fig.11), em alguns indivíduos concentram-se na região posterior do corpo próximos ao cinetoplasto. A membrana ondulante (Fig. 10-11) é conspícua, apresentando 8 a 10 dobras aproximadamente e percorre quase toda a extensão do corpo. O flagelo livre com 42,2 μm , mede cerca de $\frac{1}{4}$ do tamanho corporal. Estes tripanossomas foram observados na circulação visceral de todos os órgãos analisados e na circulação periférica. Sítios de concentração, não foram observados.

Segundo teste de correlação de Spearman, o crescimento do corpo do tripanossoma está relacionado com o aumento na distância entre o núcleo, 78%, e o cinetoplasto, 91%, à região anterior do corpo ($r_s = 0.78$ e $P < 0.003$ e $r_s = 0.91$ e $P < 0.003$), respectivamente.

Escassas formas arredondadas (TM3) e uma forma larga (TM2) foram observadas em um hospedeiro jovem, que não apresentou as formas alongadas, entretanto foram consideradas em degeneração.

Estes tripanossomas assemelharam-se a *T. tsukamotoi* MIYATA, 1978 de ranídeos do Japão e às formas alongadas de *T. rotatorium* e *T. leptodactyli* relatadas em *L. ocellatus*, no Brasil por CARINI (1907) e MACHADO (1911)

Segundo MIYATA (1978) *T. tsukamotoi* assemelhou-se a *T. leptodactyli*, entretanto, o autor utilizou somente as diferenças do comprimento do corpo para separar estas espécies, o que sugere tratar-se de sinonímia.

MACHADO (1911) observou variação morfológica em *T. rotatorium* em *L. ocellatus* procedentes do Rio de Janeiro. SCORZA & DAGERT (1958) observaram o desenvolvimento de formas arredondadas de *T. rotatorium* e de formas longas de *T. leptodactyli* em hilídeos e leptodactilídeos na Argentina e verificaram que estas são estágios de um mesmo tripanossoma, corroborando as análises do presente estudo em que não se considerou haver infecção mista em *L. ocellatus*, mas variação morfológica de uma espécie polimórfica. Ressalta-se o comprimento total de aproximadamente 176µm observado nestas formas alongadas (TM1).

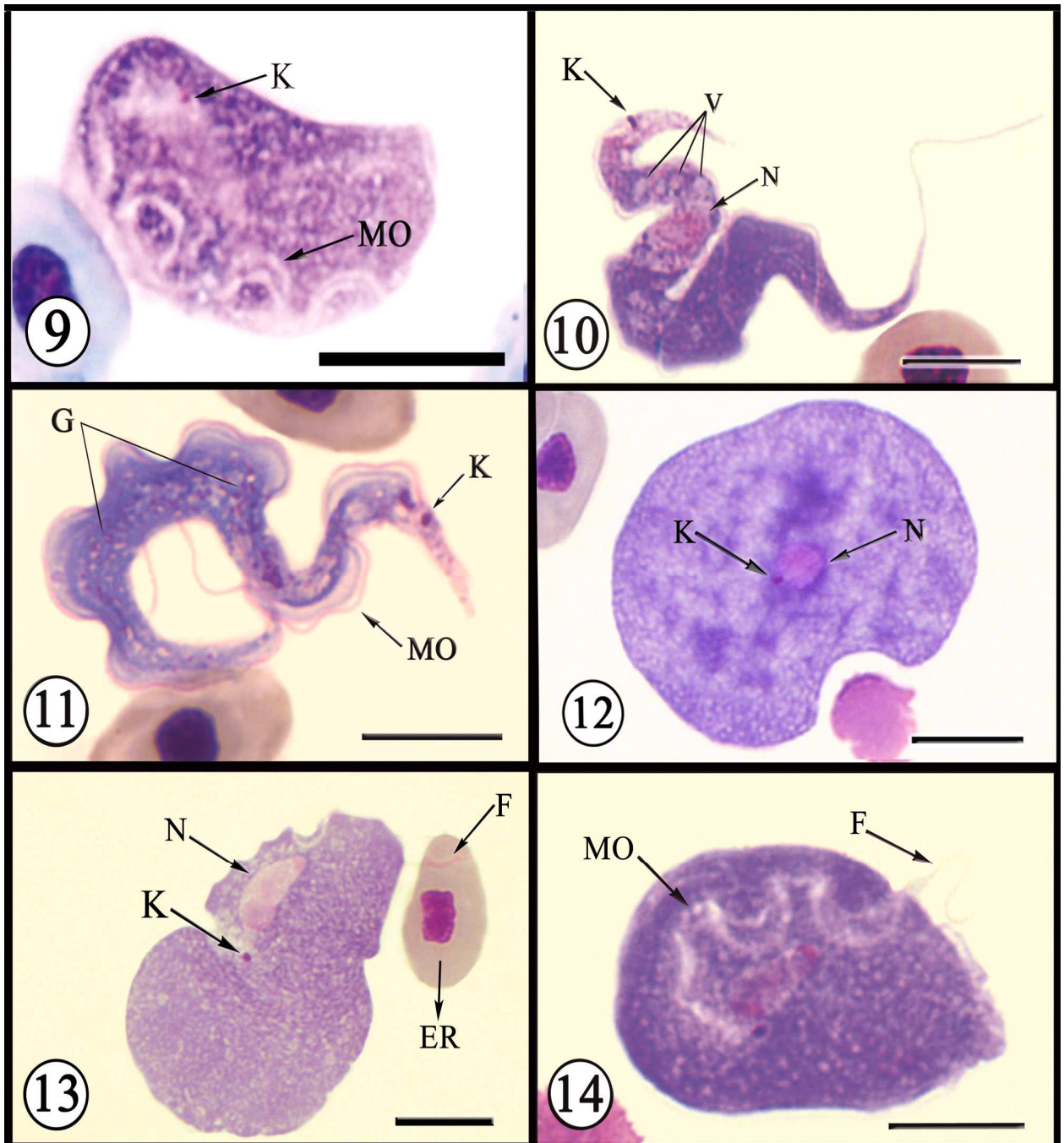
Nos hospedeiros adultos, foram encontradas duas variações morfológicas para este tripanossoma (TM2 e TM3). O tipo morfológico mais freqüente (TM3) apresentou o corpo arredondado, curto, estando ausentes membrana ondulante e flagelo livre (Fig. 12). Os parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 6.

O núcleo arredondado é centralmente localizado, por vezes observado com área clara ao redor do núcleo. O cinetoplasto arredondado situa-se justaposto ao núcleo (Fig. 12). Em alguns indivíduos, este foi observado em sobreposição ao núcleo. O citoplasma é finamente granular, sendo raros, vacúolos. Nestes indivíduos não foi observada a presença de membrana ondulante e flagelo livre. Observou-se que, por várias vezes, apresentavam-se dobrados, com pregas pelo corpo. Estas formas concentraram-se na circulação visceral e foram observadas, sobretudo no coração e rins dos hospedeiros analisados (Fig.15).

Estes tripanossomas assemelharam-se às formas identificadas como *T. rotatorium* relatadas por DUTTON *et al.* (1907); MACHADO (1911); ao quarto morfotipo de VUCETICH & GIACOBBE (1949); RUIZ & ALFARO (1958); PÉREZ-REYES *et al.* (1960) e GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969).

MACHADO (1911) relatou que estas formas se concentraram principalmente na circulação visceral dos rins. FANTHAM *et al.* (1942) e BARDSLEY & HARMSSEN (1973) relataram *T. rotatorium*, semelhantes às relatadas, predominantemente no coração e rins corroborando os resultados do presente trabalho.

DUTTON *et al.* (1907) e MACHADO (1911) relataram que formas arredondadas semelhantes a TM3 precedem a fase de divisão múltipla de *T. rotatorium* no anuro. RAMOS & URDANETA-MORALES (1977) e DESSER (1973) observaram estas formas em *Aedes aegypti* e *Cullex territans* após hematofagia em anuros infectados e verificaram divisão múltipla.



Prancha 2. Tripanossomas de anuros, figuras 9, 12, 13 e 14 barra 10 μ m e figuras 10 e 11 barra 20 μ m. *F (flagelo); G (grânulos); Kp (cinetoplasto), MO (membrana ondulante); N (núcleo); V(vacúolos). Figura 9 *T. rotatorium* (*lato sensu*) encontrado em *Leptodactylus chaquensis*, cinetoplasto alongado indicado pela seta e membrana ondulante delimitada por canal claro. Figuras 10-14 *Trypanosoma* sp.3 encontrados em *L. ocellatus*. Figura 10 (TM1) com cinetoplasto (Kp) alongado e côncavo, presença de vacúolos localizados principalmente na região posterior do corpo e núcleo (N) alongado. Figura 11 (TM1) com grânulos (G) fortemente corados distribuídos ao longo da extensão citoplasmática. Figura 12 (TM3) com cinetoplasto juxtanicolar e núcleo (N) arredondado. Figura 13 (TM2) núcleo (N) com duas regiões, cinetoplasto (Kp) arredondado e tênue marcação do flagelo livre (F) sobre o eritrócito (ER). Figura 14 (TM2) com pequeno flagelo livre

TABELA 6. Dados morfométricos de *Trypanosoma* sp.3 encontrado em *Leptodactylus ocellatus*.

Morfotipo	TM1	TM2	TM3
CT	176.1 ±13.1 (136.6 – 206.1)	45.7 ±19.1 (31.7 – 91.9)	–
CC	132.7 ±10.1 (99.3 – 106.5)	32,8 ±11.2 (17.2 – 70.3)	39.7 ±12.6 (23.1 – 87.9)
L	7.1 ±1.2 (4.0- 9.9)	22.9 ±7.8 (10.5 – 34.8)	31.6 ±8.1 (14.6 – 57.1)
F	42 ±7.7 (17.9– 58.4)	14,8 ±8.3 (5.4 - 38.6)	–
NC	6.7 ±1.3 (2.9 – 9.2)	6.5 ±2.3 (3.6 – 12,6)	5 ±1.9 (2.7 – 12.8)
NL	4.8 ±1.1 (2.9 – 8.8)	3.5 ±1.1 (1.7 - 8)	4.3 ±1.3 (2.3 – 7.9)
NA	84.4 ±8.7 (54.7 – 103.4)	17.2 ±6,8 (8,5 - 44.4)	23.2 ±9.5 (13.3 – 50.6)
NP	48.5 ±4.6 (34.7 – 58.2)	14,3 ±7.6 (6 - 32.4)	19.6 ±6.9 (9.8 – 41.8)
NK	32.6 ±3.7 (23.1 – 40.5)	3.5 ±2.4 (2.5 - 13.4)	2.8 ±1.7 (1.1 – 6.4)
KC	2 ±0.3 (1.3 – 3.0)	1.2 ±0.3 (0.69 - 2.2)	1.27 ±0.4 (0.73 – 2.8)
KL	1.2 ±0.2 (0.75 – 1.8)	1.08 ±0.2 (0.6 - 1.9)	1.2 ±0.4 (0.61 – 2.9)
KA	116.9 ±9.2 (90.3 – 141.6)	20.7 ±7.4 (12,9 - 49.9)	23.6 ±8.6 (13.5 – 48.4)
KP	15.8 ±3.1 (8.2 – 21.2)	11.21 ±5,1 (6.1 - 28.3)	20.8 ±7.8 (4.2 – 39.5)

*Tipo morfológico um, forma delgada e alongada †tipo morfológico dois, forma arredondada com membrana ondulante e flagelo livre §tipo morfológico três, forma redonda sem membrana ondulante e flagelo livre. CT = comprimento total do corpo, CC = comprimento do corpo, L = largura do corpo, F = comprimento do flagelo livre, NC = comprimento do núcleo, NL = largura do núcleo, NA = distância do núcleo à extremidade anterior do corpo, NP = distância do meio do núcleo à extremidade posterior do corpo, NK = distância do meio do núcleo ao meio do cinetoplasto, KA = distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo, KP = distância do cinetoplasto à extremidade posterior do corpo.

No presente estudo, foi observada, em um indivíduo, tênue área clara dividindo o cinetoplasto, que poderia ser indício de divisão, entretanto não foi verificado qualquer outro indício de reprodução, não sendo portanto conclusivo que se tratasse de processo reprodutivo nestas formas.

Indivíduos distorcidos foram visualizados, apresentando variações morfológicas e na pigmentação, além de dobras do citoplasma. Estes foram excluídos das análises morfológica e morfométrica. Indivíduos distorcidos também foram observados por DUTTON *et al.* (1907) e MACHADO (1911) que atribuíram tal distorção à pouca consistência que apresentaram.

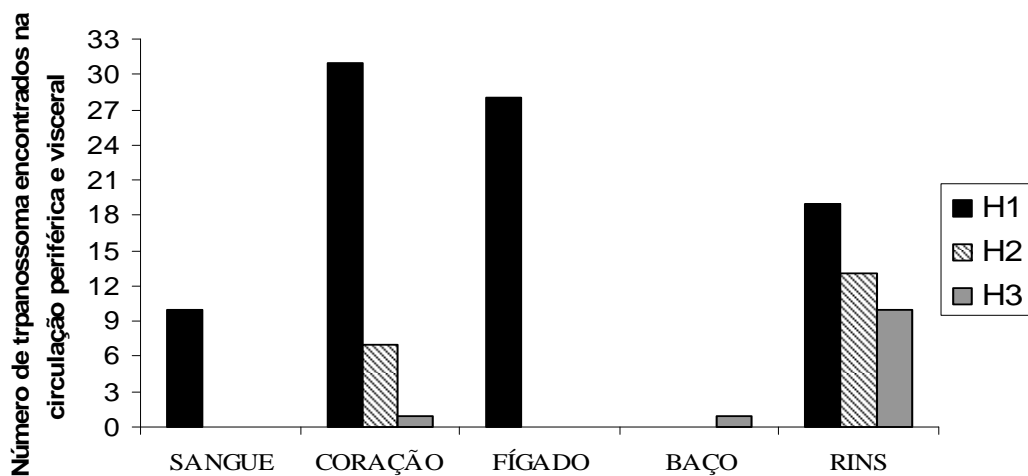


Figura 15. Localização das formas arredondadas sem membrana ondulante e flagelo livre (TM3) em *Leptodactylus ocellatus*. *H1 (hospedeiro 1), H2 (hospedeiro 2) e H3 (hospedeiro 3) referem-se a três diferentes hospedeiros adultos da espécie *L. ocellatus*.

DUTTON *et al.* (1907) e MACHADO (1911) observaram migração do cinetoplasto em direção ao núcleo e alterações na morfologia e na coloração do núcleo. DUTTON *et al.* (1907); PÉREZ-REYES *et al.* (1960) observaram que muitos dos tripanossomas arredondados tornaram-se muito vacuolizados e desintegraram-se. BUTTNER & BOUCART (1955b) sugeriram serem estas, formas latentes de resistência. MACHADO (1911) relatou que a cromatina do núcleo é dissolvida no processo de arredondamento, o que foi confirmado por GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969) mediante testes citoquímicos que confirmaram haver processo degenerativo e que este poderia estar relacionado à ação de anticorpos do hospedeiro.

No presente estudo, estas formas foram observadas em anuros adultos, e em um indivíduo jovem, e foram consideradas em degeneração por ação de fatores endógenos do hospedeiro, corroborando as observações de DUTTON *et al.* (1907), MACHADO (1911) e GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969).

Estudos são necessários para comprovação destas hipóteses, uma vez que o polimorfismo destes tripanossomas continua sendo fato ainda não elucidado.

Tipos morfológicos (TM2) largos com extremidades arredondadas, membrana ondulante conspícua e flagelo livre (Fig. 12-13), foram encontrados em menor frequência em hospedeiros jovens (Fig. 16). Os parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 6.

O núcleo é alongado, encontra-se disposto paralelamente ao maior eixo do corpo e situa-se na região posterior ($N < 1$); ocupa posição periférica e próximo à membrana ondulante (Fig.13). Observou-se que, em alguns indivíduos, apresentava-se alongado, com extremidades afiladas fortemente coradas devido à concentração de material cromático nos pólos originando regiões distintas. O cinetoplasto arredondado e alongado é periférico e situa-se na região posterior do corpo próximo ao núcleo ($IK > 2$). O citoplasma é granular, apresentando pequenos vacúolos distribuídos por toda extensão corporal. A membrana ondulante é conspícua, apresentando 4 a 6 dobras, pode percorrer a extensão corporal em posição periférica ou apresentar-se em posição mediana (ou centralmente localizada) marcando o citoplasma na forma de canais claros que delimitam sua trajetória (Fig.14) O flagelo livre, mede cerca de $15\mu\text{m}$, aproximadamente $1/3$ do tamanho corporal. Estas formas foram observadas na circulação periférica e visceral, sobretudo, no coração e rins (Fig. 16).

Estas formas assemelharam-se à *T. rotatorium* relatada por DUTTON *et al.* (1907); MACHADO (1911); KUDO (1922); ao segundo morfotipo de VUCETICH & GIACOBBE (1949); RUIZ & ALFARO (1958); SCORZA & DAGERT (1958); PÉREZ-REYES (1960) e BARTA *et al.*(1989).

Formas alongadas (TM1) foram observadas predominantemente em anuros jovens. MACHADO (1911), FANTHAM *et al.* (1942), VUCETICH & GIACOBBE (1949), CREEMERS & JADIN (1966) e MIYATA (1976) relataram formas semelhantes a estas em anuros jovens, corroborando as análises do presente estudo.

Em anuros adultos, registrou-se a presença de formas largas com membrana ondulante e flagelo livre (TM2) corroborando as observações de MACHADO (1911) e CREEMERS & JADIN (1966). No presente estudo, (TM3) foi observada tanto em anuros jovens quanto em adultos, não caracterizando, um determinado tipo de infecção, mas formas alteradas por fatores endógenos do hospedeiro, relacionados ao processo de arredondamento.

Sanguessugas foram amplamente relatadas como hospedeiros invertebrados para tripanossomas que parasitam anuros por BILLET (1904), BRUMPT (1906), SCORZA & DAGERT (1958), WOO (1969), DESSER (1976), MARTIN & DESSER (1990) e DESSER (1992) em anuros com infecções naturais ou experimentalmente infectados.

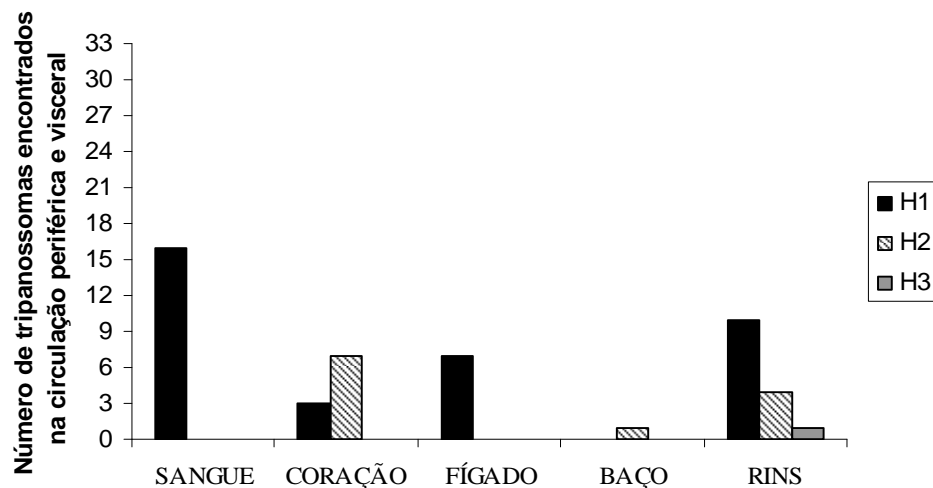


Figura 16. Localização das formas largas com membrana ondulante e flagelo livre (TM2) em *Leptodactylus ocellatus*. *H1 (hospedeiro 1, adulto), H2 (hospedeiro 2, adulto) e H3 (hospedeiro 3, jovem) referem-se a três diferentes hospedeiros da espécie *L. ocellatus*.

Segundo FENG & CHUNG (1940; 1943), AYALA (1971) e RAMOS & URDANETA-MORALES (1977) artrópodos hematófagos podem atuar como hospedeiros invertebrados para este grupo de tripanossomas de anuros. Entretanto, a transmissão dos tripanossomas por artrópodos hematófagos tem sido confirmada apenas para *T. bocagei* e *T. bufophlebotomi*. A transmissão experimental não tem gerado resultados positivos (PESSOA, 1969; BAILEY, 1962; DESSER *et al.*, 1973; 1975) a exceção de FENG & CHUNG (1943) e RAMOS & URDANETA-MORALES (1977).

É notável a dificuldade de se verificar o desenvolvimento e a transmissão destes por artrópodos hematófagos. Nos trabalhos já realizados, tripanossomas metacíclicos não foram observados. Os estudos de transmissão experimental através do hospedeiro invertebrado foram amplamente comprovados com hirudíneos e em duas espécies de artrópodos hematófagos. No Brasil, não há relatos sobre o hospedeiro invertebrado destes tripanossomas.

No presente estudo, formas semelhantes à *T. rotatorium* foram observadas em hilídeos e leptodactilídeos. Dentre os tripanossomas observados, verificou-se grande variação morfológica (Fig. 8-14).

São atribuídas diversas formas à *T. rotatorium* sendo destacadas as grandes formas delgadas, as largas de extremidades afiladas e as arredondadas apresentando ou não membrana ondulante e flagelo livre. O polimorfismo, das formas sangüíneas, foi amplamente relatado por MARCHOUX & SALIMBENI (1907), FRANÇA (1911), MACHADO (1911), KUDO (1922), SCHWETZ (1930), FANTHAM *et al.* (1942), VUCETICH & GIACOBBE (1949), RUIZ & ALFARO (1958), LEHMANN (1959), PÉRES-REYES *et al.* (1960), CREEMERS & JADIN (1966), GONÇALVES DA

COSTA & SILVA (1969), BARDSLEY & HARMSSEN (1973), MIYATA (1976), MIYATA (1978), MARTIN *et al.* (1992), LUN & DESSER, (1996), DESSER (2001) e MARTIN *et al.* (2002).

BARDSLEY & HARMSSEN (1973) atribuíram ao polimorfismo o desenvolvimento seqüencial das formas no hospedeiro vertebrado e invertebrado e especularam sobre a relação entre a morfologia e função metabólica de determinado estágio do tripanossoma no hospedeiro vertebrado. Até o momento, não se sabe qual fator desencadeia o processo de modificação das formas alongadas em formas arredondadas. A seqüência das modificações foi relatada por observação a fresco (DUTTON *et al.*, 1907; FRANÇA & ATHIAS, 1907; MACHADO, 1911; KUDO, 1922; FANTHAM *et al.*, 1942). Estes autores relataram a dificuldade de se obter, em preparações coradas, as seqüências observadas a fresco para melhor compreender as modificações que ocorrem principalmente no núcleo e cinetoplasto.

SCHWETZ (1930) relatou que *T. costatum* e *T. hylae* são variedades morfológicas do grupo *T. rotatorium*. VUCETICH & GIACOBBE (1949) e CREEMERS & JADIN (1966) estabeleceram morfotipos para as variações de *T. rotatorium*. BARDSLEY & HARMSSEN (1973) relataram que as diversas formas identificadas como uma única espécie, *T. rotatorium*, fazem parte de um complexo polimórfico e provavelmente incluem mais de uma espécie. Segundo estes autores, *T. rotatorium* é o nome mais comumente empregado para se identificar estes tripanossomas sendo este um dos maiores problemas na taxonomia do grupo.

VUCETICH & GIACOBBE (1949) e SCORZA & DAGERT (1958) propuseram a ocorrência de uma única espécie de tripanossoma em anuros nas Américas, reconhecendo as demais como variações ou formas de *T. rotatorium*. Posteriormente, AYALA (1970), JONES & WOO (1986), MARTIN & DESSER (1990), MARTIN *et al.* (1992) e DESSER (2001) confirmaram a pluralidade das espécies de tripanossomas nas Américas.

SCORZA & DAGERT (1958) comprovaram por infecções experimentais que as formas largas de *T. rotatorium* e as alongadas de *T. leptodactyli* são estádios polimórficos de uma mesma espécie. MACHADO (1911) observou os mesmos padrões morfológicos em *T. rotatorium* em *L. ocellatus*, em infecções naturais e sugeriu que estas são variações morfológicas que ocorrem por contração celular e perda do flagelo livre. No presente estudo estas formas foram observadas e consideradas uma única espécie polimórfica, corroborando as observações dos autores, entretanto com base em análises ultraestruturais não foram consideradas *T. rotatorium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYALA, S.C. 1971. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. **Journal of Protozoology**, **18(3)**: 433-436.
- BARDSLEY, J.E & HARMSSEN, R. 1973. The trypanosomes of anura. **Advances in Parasitology**, **2**: 1-73.
- BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. 1989. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. **Transactions of the American Microscopical Society**, **108**:6-20.
- BAILEY, J.K. 1962. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. **Experimental Parasitology**, **12**: 155-163.)
- BILLET, A. 1904. Sur le *Trypanosoma inopinatum* de la grenouille verte d'Algerie et sa relation possible avec les Drepanidium. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **57**:161-164.
- BRUMPT, M.E. 1906. Rôle pathogène et mode de transmission du *Trypanosoma inopinatum* Ed. Sergent & Et. Sergent. Mode d' inoculation d'autres trypanosomes. **Comptes Rendus des Seances de Société de Biologie**, **61**: 167-69.
- BUTTNER, A. & BOUCART, N. 1955. Observations sur le cycle évolutif de *Trypanosoma inopinatum* Sergent & Sergent, 1904. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, .
- CLARK, C.G.; MARTIN, D.S. & DIAMOND, L.S. 1995. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, **42(1)**:92-96.
- CREEMERS, J. & JADIN, J.M. 1966. Ultrastructure et biologie de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843. **Acta of Zoology and Pathology Antverpiensia**, **41**: 119-136.
- DESSER, S.S, S.B. MCIVER & RICKMAN, A. 1973. *Culex territans* as a potencial vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. **Journal of Parasitology**, **59(2)**: 353-358.
- DESSER, S.S.1976.The ultrastructure of the epimastigote stages of *Trypanosoma rotatorium* in the leech *Batracobdella picta*. **Canadian Journal of Zoology**, **54**: 1712-1723.
- DESSER, S.S. 2001.The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of the trypanosomes. **Journal of Parasitology**, **87**: 152-160
- DUTTON, J. E.; TODD, J.L.; TOBEY, N.E. 1907. Concerning certain parasitic protozoa observed in Africa. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** **1**: 287-354.
- ELISEI, C.; SCOFIELD, A.; HUBER, F.; FERNANDEZ, K.R.; FORLANO, M.D.; MASSARD, C.L..2002. Estudos preliminares da fauna hemoparasitológica em *Leptodactylus ocellatus*, Seropédica, RJ. XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, p.243.
- FANTHAM, H.B., PORTER, A. & RICHARDSON, L.R.1942. Some haematozoa observed in vertebrates in Eastern. **Parasitology**, **34**: 199-226.
- FENG, L. & CHUNG, H. 1940. *Phlebotomus squamirostris* Newstead, transmitter of *Trypanosoma bocagei* França in the toad, *Bufo bufo gargarizans* (Cantor). **Chinese Medical Journal, Supplement.**, **3**:198-211.

- FENG, L. & CHAO, C.S. 1943. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. **Chinese Medical Journal Supplement**, **62**: 210-217.
- FERREIRA, R.C; CAMPANER, M.; TAKATA, C.L.A.; TAKEDA, G.F. & TEIXEIRA M.M.G. 2003. Anuran trypanosomes: morphological, biological and molecular characterization of Brazilian isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45**: 162.
- FRANÇA, C. 1911. Sur la relation autogénétique entre les grands e le petits trypanosomes de la grenouille. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des ses Filiales**, **70**: 978-979.
- FRANÇA, C. & ATHIAS, M. 1907. Sur les phénomènes de division du *Trypanosoma rotatorium*. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des ses Filiales**, **62**: 1108-1109.
- GALLIARD, H.; BUTTNER, A. & BOUCART, N. 1954. Actions de la somatotropina hypophysaire et de la nutrition sur l'évolution de *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904 (souche Algérienne) chez la grenouille verte. **Annales de Parasitologie**, **29** (3): 179-197.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C.G. & SILVA, A.M. 1969. Hemoparasitos de anfíbios do Brasil: alguns aspectos citológicos de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 (Protozoa, Kinetoplastida). **Atas da Sociedade de Biologia**, **12**(5, 6): 245.
- GUERRERO, S. & AYALA, S.C. 1977. Hemoparásitos de algunos reptiles y anfibios de la selva amazónica del Perú. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo**, **19**(5): 283-288.
- HOARE, C.A. 1972. **The Trypanosomes of Mammals**. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh. **749 p.**
- JACONO, I. 1938. A further contribution to the proposal of a new classification of trypanosomes. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **41** (4): 53-57.
- JONES, S.R.M. & WOO P.T.K. 1986. *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911 in *Rana pipiens* of southern Ontario: morphometrics and a description of the division process. **Systematic Parasitology**, **9**: 57-62.
- KUDO, R. 1922. On the protozoa parasitic in frogs. **Transactions of the American Microscopical Society**, **41**: 59-76.
- LEHMANN, D.L 1959. *Trypanosome boyli* n. sp. From the California yellow-legged frog, *Rana b. boyli*. **Transactions of the American Microscopical Society**, **78**: 370-373.
- LEMONS, M.; RODRIGUES, A. F. S. F.; CARVALHO, V.T.; MORAIS, D.H. & D'AGOSTO, M. 2004. Tripanosomatídeos em *Lithodytes lineatus* (Schneider, 1799) da região da Usina Hidrelétrica do Guaporé - MT. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Supplement**. **13**: 232-232.
- LUN, Z.R. & DESSER, S.S. 1996. Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. **Parasitology Research**, **82**: 22-27.
- MACHADO, A. 1911. Pesquisas citológicas sobre o *Trypanosoma rotatorium* Gruby. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **3**: 108-135.
- MARCHOUX, E. & SALIMBENI, A. 1907. Un trypanosome nouveau chez une *Hyla voisine* de *Hyla lateritriga* Spix et Agassiz. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **62**: 592-594.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1990. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* N. Sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. **The Journal of Parasitology**, **37**(3): 199-206.

- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1991a. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*: A light and electron microscopic study. **Parasitology Research**, **77**: 18-26
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1991b. Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. **Journal of Parasitology**, **77** (3): 498-500.
- MARTIN, D.S., DESSER, S.S. & HONG, H. 1992a. Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. **Journal of Parasitology**, **78**(2):317-322.
- MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R. & DESSER, S.S. 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18s rRNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, **88**(3): 566-571.
- MATHIS, C. & LEGER, M. 1911. Trypanosomes des crapauds du Tonkin. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **70**: 1008-09.
- MIYATA, A. 1976. Anuran haemoprotozoa found in the vicinity of Nagazaky City. I *Trypanosoma rotatorium*. **Tropical Medicine**, **18**(3):125-134.
- MIYATA, A. 1978. Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryuku Islands with descriptions of six new species. **Tropical Medicine**, **20**: 51-81.
- PESSOA, S.B. 1969. Experiências de transmissão do *Trypanosoma cruzi* e de tripanossomas de vertebrados de sangue frio por triatomíneos. **Revista de Saúde Pública**, **3**: 17-20.
- PÉREZ-REYES, R.; BERTA, Y.H.; MONTESINOS, M.C. & VALENCIA, L.C. 1960. Estudios sobre hematozoarios X. Algunos tripanosomas de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica**, **3**(4):201-211.
- PÉREZ-REYES R. 1968. *Trypanosoma galba* n. sp., parasite of Mexican frogs. Morphology and cycle in the vertebrate. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica**, **10** (2): 79-84.
- RAMOS, B. & URDANETA-MORALES, S. 1977. Hematophagous insects as vector for frog trypanosome. **Revista de Biología Tropical**, **25**(2):209-217.
- RUIZ, A. & ALFARO, M. 1958. Presencia de *Trypanosoma rotatorium* en la sangre de ranas de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, **6**(2): 241-244.
- SANTOS, K. C.; ABEL, I. 2005. Hemoparasitos de anfíbios anuros da Reserva do Centro de Educação Ambiental - Ecolândia de Lavras - MG. In: **VI Seminário de Pesquisa e Extensão da UEMG**, 2005, Diamantina.
- SCHWETZ, J. 1930. Notes protozoologiques les hématozoaires des grenouilles et des crapauds de Stanleyville (Congo Belge). **Annales de Parasitologie**, **8**(2):122-134.
- SCORZA, J.V. & DAGERT, C.M. 1958. Sobre la sinonímia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Boletín Venezolano de Laboratorio Clínico**, **3**: 29-36.
- SOUTHWORTH, G.C.; MASON, G. & SEED, J.R. 1968. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24-Hours cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. **Journal of Parasitology**, **54**(2): 255-258.

- VUCETICH, M. & GIACOBBE, O. 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. **Annales del Instituto de Medicina Regional**, **2**: 225-244.
- WERNER, J.K 1993. Blood parasites of amphibians from Sichuan province, people's Republic of China. **Journal of Parasitology**, **79** (3): 356-363
- WERNER, J.K. & WALEWSKI, K. 1976. Amphibian trypanosomes from the McCormick forest, Michigan. **Journal of Parasitology**, **62** (1): 20-25
- WOO P.T.K. 1969. Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, **17**: 981-988.

CAPÍTULO II

Caracterização morfológica, morfométrica e da ultra-estrutura das formas em cultura isoladas de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758)

Resumo

O presente estudo teve como objetivos verificar as formas de cultura de *Trypanosoma* sp. 3 isolada de *Leptodactylus ocellatus*, procedentes do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para tal, amostras de sangue da circulação periférica e visceral foram inoculadas em meio de cultura bifásico constituído de base Agar-sangue e LIBHIT-K. Foram obtidos isolados de *Trypanosoma* sp. 3 de três dos quatro hospedeiros coletados. Os tripanossomas foram observados 4 dias após inclusão e mantidos por 8 meses em culturas, retiradas amostras para análise da ultra-estrutura e criopreservados em nitrogênio líquido. Verificou-se formas epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas que foram caracterizadas quanto a morfologia e morfometria. Processo de divisão binária foi observado em epimastigotas e esferomastigotas, tripomastigotas não foram observadas em divisão. A análise da ultra-estrutura de *Trypanosoma* sp.3 confirmou sua singularidade em relação às demais espécies do gênero, sendo verificados glicosomos alongados e acidocalcisomas, até então não relatados para tripanossomas de anuros. Registra-se a utilização do meio LIBHIT-K como meio eficaz para manutenção de *Trypanosoma* sp.3 e o primeiro registro da ultra-estrutura de tripanossomas de anuros no Brasil.

Palavras-chave: *Trypanosoma*, Isolamento e Manutenção, Acidocalcisomas, Glicosomos, Morfometria, *Leptodactylus ocellatus*.

1.0 INTRODUÇÃO

Tripanossomas foram observados pela primeira vez *in vitro* em 1903 por Novy e McNeal, que conseguiram manter *Trypanosoma lewisi* (Kent,1880) LAVERAN & MESNIL, 1901 em água de condensação da base Agar-sangue, que ficou conhecido como meio N.N. (PONSELLE, 1923). BOUET (1906), utilizando este meio, foi o primeiro a isolar e manter tripanossomas de anuros em meio de cultura.

MATHIS (1906) modificou o meio N.N. por aquecimento da base Agar - sangue e manteve *Trypanosoma rotatorium* por dez subculturas. Nicole, no mesmo ano incluiu ao meio de Novy e McNeal peptona e NaCl obtendo resultados positivos na manutenção destes parasitos (PONSELLE, 1923). O meio N.N.N., como ficou conhecido, é utilizado como meio base para manter diversas espécies do gênero *Trypanosoma*. Desde então, vários estudos foram realizados no intuito de se encontrar um meio eficaz para manter, *in vitro*, diversas espécies do gênero, sobretudo aquelas que parasitam anuros.

Estudos que verificaram a manutenção entre lâmina e lamínula de tripanossomas de anuros relataram principalmente aspectos dos processos degenerativos e reprodutivos, ressaltando-se a variação da morfologia destes tripanossomas.

No Brasil, MACHADO (1911) e PEREIRA *et al.* (1973) isolaram *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) LAVERAN & MESNIL (1901) em diferentes meios e mantiveram estes parasitos por 15 dias em culturas. FERREIRA *et al.* (2003) relataram o isolamento e a manutenção de tripanossomas de anuros, sem, contudo mencionar as espécies encontradas e o meio utilizado.

Estudos da ultraestrutura de tripanossomas de anuros são escassos, face ao grande número de espécies descritas e suas variações morfológicas. No Brasil, não existem estudos da ultraestrutura destes tripanossomas.

A partir do achado de tripanossomas em *Leptodactylus ocellatus* procedentes do Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, realizou-se a caracterização segundo a morfologia e morfometria das formas encontradas em cultura, bem como sua ultraestrutura para melhor caracterização da espécie encontrada, contribuindo para a elucidação taxonômica do grupo.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Captura e dados dos hospedeiros

Foram capturados quatro indivíduos da espécie *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758), sendo dois adultos machos e dois jovens, no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de

Janeiro, Seropédica, RJ (22° 55' 08" S e 43° 46' 31" W). As coletas foram realizadas durante o mês de março e autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com protocolo de licença de coleta nº 042/06 RAN, processo nº. 02010.002541/05-00. A manipulação dos anuros em condições de laboratório foi autorizada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora com protocolo de licença nº. 048/2006.

2.2 Coleta dos parasitos

Os anuros foram anestesiados com inoculação intraperitoneal de lidocaína 2%, (35mL/Kg) e lavados em álcool 70%. O coração foi exposto e amostras de sangue obtidas por punção cardíaca, do cone arterioso, cerca de duas gotas foram incluídas em meio de cultura bifásico. O coração, fígado, baço e rins, após impressão em lâminas, foram lavados em solução tampão fosfato-salina (0,6%), macerados em placas de Petri com tela circular de metal e incluídos em meio de cultura bifásico.

2.3 Cultura dos tripanossomas

Para se acompanhar o desenvolvimento dos tripanossomas, foi utilizado meio de cultura bifásico. O meio de cultura empregado foi constituído de Agar e sangue desfibrinado de coelho e fase líquida, constituída pelo meio LIBHIT-K (Liver Infusion Brain Heart Infusion Tryptose acrescido de Potássio) (GONÇALVES DA COSTA & LAGRANGE, 1981) modificado por SOUZA & GONÇALVES DA COSTA (1997). A composição da fase líquida é uma solução de 68 mM de NaCl; 5 mM de KCl; 56 mM de Na₂HPO₄ acrescida de 0,4% de glucose; 0,2% de triptose e 0,2% de infusão de coração e cérebro. Este meio foi acrescido de 50mL de infusão de fígado e 50 mL de soro fetal bovino por litro de meio preparado e o pH ajustado para 7,4 em solução de HCl. O meio foi filtrado em sistema de milipore com pressão positiva de nitrogênio líquido.

Hemoglobina (5%), obtida por lise de hemácias de carneiro, centrifugadas a 27.000g, filtrada em sistema de milipore para eliminação de fragmentos de membrana, foi adicionada ao meio LIBHIT-K e este, submetido a teste de esterilidade por 24h, a temperatura ambiente, e posteriormente estocado a 4°C.

O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaios rosqueados contendo 1mL de fase sólida e 500µL de fase líquida. O macerado dos órgãos de maior tamanho, como fígado e rins, foram divididos em dois ou mais tubos de ensaio com aproximadamente 50µL de macerado. As culturas foram mantidas em estufa BOD a 24°C.

A primeira passagem para subculturas foi realizada no 1º dia após a detecção dos

parasitos. Em culturas estabelecidas, consideradas com ausência de contaminantes, as passagens para subculturas foram realizadas em intervalos de sete dias. Cada subcultura continha 1mL de Agar - sangue, 500µl de LIBHIT-K e 50µl da solução contendo parasitos (inóculo).

2.4 Desenvolvimento dos tripanossomas em meio de cultura bifásico

Para acompanhar o desenvolvimento dos parasitos em cultura, estas foram observadas no 3º, 4º e 5º dias após a inclusão. Após a detecção dos tripanossomas, as culturas foram observadas diariamente, em preparações entre lâmina e lamínula, observadas em aumento de 400x, em 50 campos, para a detecção de contaminantes.

Para a caracterização das formas em meio de cultura, os tripanossomas foram classificados quanto ao tipo morfológico que apresentaram segundo HOARE (1972) levando-se em consideração a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, presença ou ausência de membrana ondulante e de flagelo livre.

Para a caracterização morfométrica foram analisadas preparações permanentes das culturas, contendo 5µl da fase líquida do meio de cultura, em aumento de 1000x, e medidos 20 indivíduos de cada tipo morfológico seguindo-se a classificação citada.

As medidas utilizadas para a caracterização morfométrica foram: comprimento do corpo (CC), do núcleo (CN) e cinetoplasto (CK); tamanho do flagelo livre (F); largura do corpo (L), do núcleo (LN) e do cinetoplasto (LK); distâncias entre o meio do núcleo e a região anterior do corpo (NA), meio do núcleo e região posterior do corpo (NP), meio do núcleo e o meio do cinetoplasto (NK), meio do cinetoplasto à região anterior do corpo (KA) e meio do cinetoplasto à região posterior do corpo (KP) e calculados os índices nuclear ($IN = NP/NA$) (DIAS & FREITAS, 1943 *apud* HOARE, 1972) e cinetoplasmático (IK) (KEYMER, 1967 *apud* HOARE, 1972). O programa utilizado para análise morfométrica foi *analySIS*® Soft Imaging System GmbH 2003.

Para verificar a alteração da frequência dos tipos morfológicos dos tripanossomas em meio de cultura, separou-se um isolado, proveniente do sangue da circulação periférica que foi utilizado como meio de origem e retiradas amostras durante 13 dias de 5µL da solução do meio. As amostras foram lavadas em LIBHIT-K para retirada de fragmentos de Agar. Estas preparações foram analisadas em aumento de 1000x em 50 campos e contados os tipos morfológicos, considerando-se ainda o estágio reprodutivo em que se encontravam.

2.5 Criopreservação dos Tripanossomas

Foram utilizados 2mL de cultura de tripanossomas no 7º dia de desenvolvimento para criopreservação. As amostras foram acrescidas de glicerol estéril, apresentando a concentração

final de 10% e homogeneizadas à temperatura ambiente. A suspensão de tripanossomas em glicerol foi subdividida em alíquotas de 0,5mL em tubos para criopreservação e incluídas em banho de gelo por 30 minutos. Após este tempo, foram mantidas em congelador até seu congelamento e incluídas em gelo seco por 45 minutos e acondicionadas diretamente em nitrogênio líquido.

2.6 Ultra-estrutura

Formas de cultura de *Trypanosoma* sp. 3 no 7º dia de desenvolvimento foram utilizadas para os experimentos de microscopia eletrônica.

2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e mantidos em refrigerador até o uso. Lamínulas foram recobertas com solução de Poli-L-lisina a 0,1% por 10 minutos. Em seguida as lamínulas foram secas e adicionou-se uma gota de solução concentrada de parasitos fixados às lamínulas. Após 10 minutos de incubação para a adesão das células às lamínulas, estas foram lavadas por 2x5 minutos em tampão cacodilato a 0,1 M. Em seguida as lamínulas foram pós-fixadas por 10 minutos em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,1 M e lavadas 2x5 minutos no mesmo tampão. Desidratação das células foi feita em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70% e 90% 1x5 minutos; 2x5 minutos em 100%). O material foi seco pelo método do ponto crítico, metalizado com uma camada de 20nm de ouro e analisado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM940.

2.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os parasitos foram processados segundo MEIRELLES & SOARES (2001) para fixação rápida de suspensão de células eucarióticas para microscopia eletrônica de rotina. Ao longo do processamento, as sessões de centrifugação foram realizadas por um minuto a 10.000g. A seguir, o líquido sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado a cada adição de reagentes. Esse procedimento foi repetido para todas as sessões de centrifugação.

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e mantidos em refrigerador até o uso. Para o processamento, estes foram transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados. Os sedimentos foram ressuspensos e lavados 2x1 minuto em tampão cacodilato e pós-fixados por 15 minutos em tetróxido de ósmio a 1% / ferricianeto de potássio a 0,8% / 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1M e novamente lavados 2x1 minuto no mesmo tampão. Os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%), por 3 minutos em cada sessão. Os sedimentos foram então incluídos por uma noite

em solução de acetona 100%: Epon. Em seguida os sedimentos foram acondicionados em Epon puro por 4hs e polimerizados por 48 hs a 60°C em Epon puro novo. Cortes ultra-finos foram coletados em grades de microscopia eletrônica de 300 mesh, corados por 50 minutos em acetato de uranila a 5% e por dois minutos em citrato de chumbo, e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM10C.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por estatística descritiva utilizando-se o programa Biostat 2.0.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Observações em Culturas

Dos quatro anuros da espécie *L. ocellatus* analisados, três apresentaram resultados positivos para cultura de tripanossomas, que foram observados no 4º dia após inclusão. Somente em culturas provenientes de um hospedeiro jovem (H3) não foram observados tripanossomas (TAB.1). Este hospedeiro apresentou baixa parasitemia e predominantemente formas arredondadas em esfregaços sangüíneos e em impressões do coração, baço e rins.

As culturas provenientes de macerados do fígado e rins apresentaram contaminação por bactérias e fungos. Somente uma cultura de macerado de baço apresentou-se positiva e nesta, um tripanossoma largo e arredondado, semelhante aos tripomastigotas largos observados em *L. ocellatus*, foi visualizado. Esta cultura foi mantida por 40 dias e nenhum outro parasito foi observado. A ausência de tripanossomas neste meio após o período mencionado pode indicar que as escassas formas na circulação esplênica não se dividiram.

Não foi possível determinar o tipo morfológico dos tripomastigotas sangüíneos que originaram a forma observada, uma vez que as impressões do baço deste hospedeiro apresentaram-se negativas mostrando menor sensibilidade em relação a técnica de cultura de parasitos. O parasito observado não foi verificado em outras culturas.

TABELA 1. Tripanossomas em culturas de amostras provenientes da circulação periférica e visceral de *Leptodactylus ocellatus*.

Hospedeiro	Sangue	Coração	Fígado	Baço	Rins
H 1	+	-	-	+	-
H 2	+	+	-	-	-
H 3	-	-	-	-	-
H 4	+	-	-	-	-

*H1(hospedeiro1); H2 (hospedeiro2); H3 (hospedeiro3) e H4 (hospedeiro4) referem-se a quatro diferentes hospedeiros de *Leptodactylus ocellatus*. + (presença); - (ausência)

Após 21 dias de inclusão em meio de cultura, células sanguíneas dos hospedeiros não foram observadas, sendo considerado o isolamento de *Trypanosoma* sp. 3 que foi mantido em meio de cultura bifásico por aproximadamente 32 passagens, durante oito meses.

No presente estudo as formas tripomastigotas arredondadas de *Trypanosoma* sp. 3, observadas no hospedeiro vertebrado, foram consideradas em degeneração. Segundo CREEMERS & JADIN (1966) formas arredondadas semelhantes às observadas não se dividem ou são infectantes para o hospedeiro vertebrado.

A ausência de tripanossomas em cultura proveniente de um hospedeiro jovem infectado reforça a hipótese de que as formas arredondadas de *Trypanosoma* sp.3 apresentavam-se em degeneração e pode indicar que estas não se dividiram o suficiente para detecção em cultura ou sequer se reproduziram. Este resultado reforça a hipótese de que as formas arredondadas estejam em degeneração corroborando as observações de GONÇALVES DA COSTA & SILVA (1969). Apenas uma forma tripomastigota larga de *Trypanosoma* sp.3 foi observada neste hospedeiro, o que sugere ter apresentado, no meio de cultura, comportamento semelhante ao das formas arredondadas.

MATHIS (1906) e MATHIS & LEGER (1911a) relataram o aparecimento de tripanossomas de anuros no 2º dia e no 4º dia após inclusão em cultura. PONSELLE (1923) observou formas epimastigotas de *T. inopinatum* 24hs após inclusão, resultados semelhantes foram observados por MARTIN & DESSER (1990a) para *T. fallisi*. No presente estudo as formas foram observadas no 4º dia após inclusão. É provável que a variação no tempo de detecção destes tripanossomas esteja associada aos diferentes meios empregados e/ou diferenças biológicas entre as espécies.

MACHADO (1911), VUCETICH & GIACOBBE (1949) e PEREIRA *et al.* (1973) relataram a dificuldade de isolar e manter estes parasitos em meio de cultura o que não foi observado por MATHIS & LEGER (1911), PONSELLE (1923), WALLACE (1956), DIAMOND (1965 APUD JONES & WOO, 1986), STEINERT (1965), CREEMERS & JADIN (1966), PÉREZ-REYES *et al.* (1976), FROMENTIN (1971), MARTIN & DESSER (1990 e 1991a) que relataram o isolamento e manutenção destes tripanossomas em diversos meios por longos períodos de tempo de 6 meses a 7 anos.

O meio LIBHIT-K é utilizado para manutenção *in vitro* de diversas espécies de tripanossomatídeos GONÇALVES DA COSTA (comunicação pessoal, 2006).

Registra-se o isolamento e manutenção de *Trypanosoma* sp.3 proveniente de *L. ocellatus* coletadas no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a utilização do meio LIBHIT-K como meio eficaz para manutenção em cultura de *Trypanosoma* sp.3.

3.2 Morfologia e morfometria dos tripanossomas em culturas

Trypanosoma sp. 3 apresentou polimorfismo quanto as formas de cultura. As formas observadas foram epimastigotas longos e delgados, epimastigotas piriformes, esferomastigotas, apresentando ou não porção livre do flagelo aparente, e tripomastigotas delgados e largos. Os dados dos parâmetros aferidos estão apresentados na Tabela 2.

As primeiras formas observadas foram epimastigotas e tripomastigotas longas e delgadas com extremidades afiladas (Figs.1 e 5). Estas apresentaram semelhanças morfológicas, não sendo possível diferenciá-las a fresco; em preparações coradas, verificou-se somente a variação na posição do cinetoplasto.

Não foi possível determinar a ordem do aparecimento das várias formas observadas em *Trypanosoma* sp. 3. O aparecimento simultâneo destas ao longo das observações impossibilitou a determinação de uma seqüência relativa ao seu desenvolvimento.

Formas epimastigotas (Fig. 1 e 2) apresentam núcleo arredondado, que em alguns indivíduos apresentou-se oval e alongado; está situado na região anterior do corpo ($IN > 1$). O cinetoplasto é alongado, com extremidades arredondadas, em forma de bastão, em alguns indivíduos este se apresentou côncavo, localizado na região anterior do corpo. O citoplasma apresentou vacúolos ao longo da extensão corporal, observados mais facilmente em preparações a fresco. O flagelo livre mede cerca de $20\mu\text{m}$, aproximadamente $\frac{1}{2}$ do comprimento do corpo. Os epimastigotas piriformes (Fig. 2) distinguiram-se dos delgados (Fig. 1) por apresentar corpo mais largo (TAB.2) e região posterior fortemente afilada.

Esferomastigotas (Figs. 3 e 4) apresentaram o corpo curto e arredondado apresentando ou não porção livre do flagelo, aparente. O núcleo arredondado está localizado no centro do corpo ($IN = 1$). O cinetoplasto alongado situa-se na região anterior do corpo. O citoplasma, em alguns indivíduos, apresentou-se fortemente corado nas formas que não apresentaram porção livre do flagelo, aparente e em alguns indivíduos, observou-se a presença de uma área clara localizada na região anterior do corpo próximo ao cinetoplasto. Em preparações a fresco, vacúolos foram observados ao longo da extensão citoplasmática.

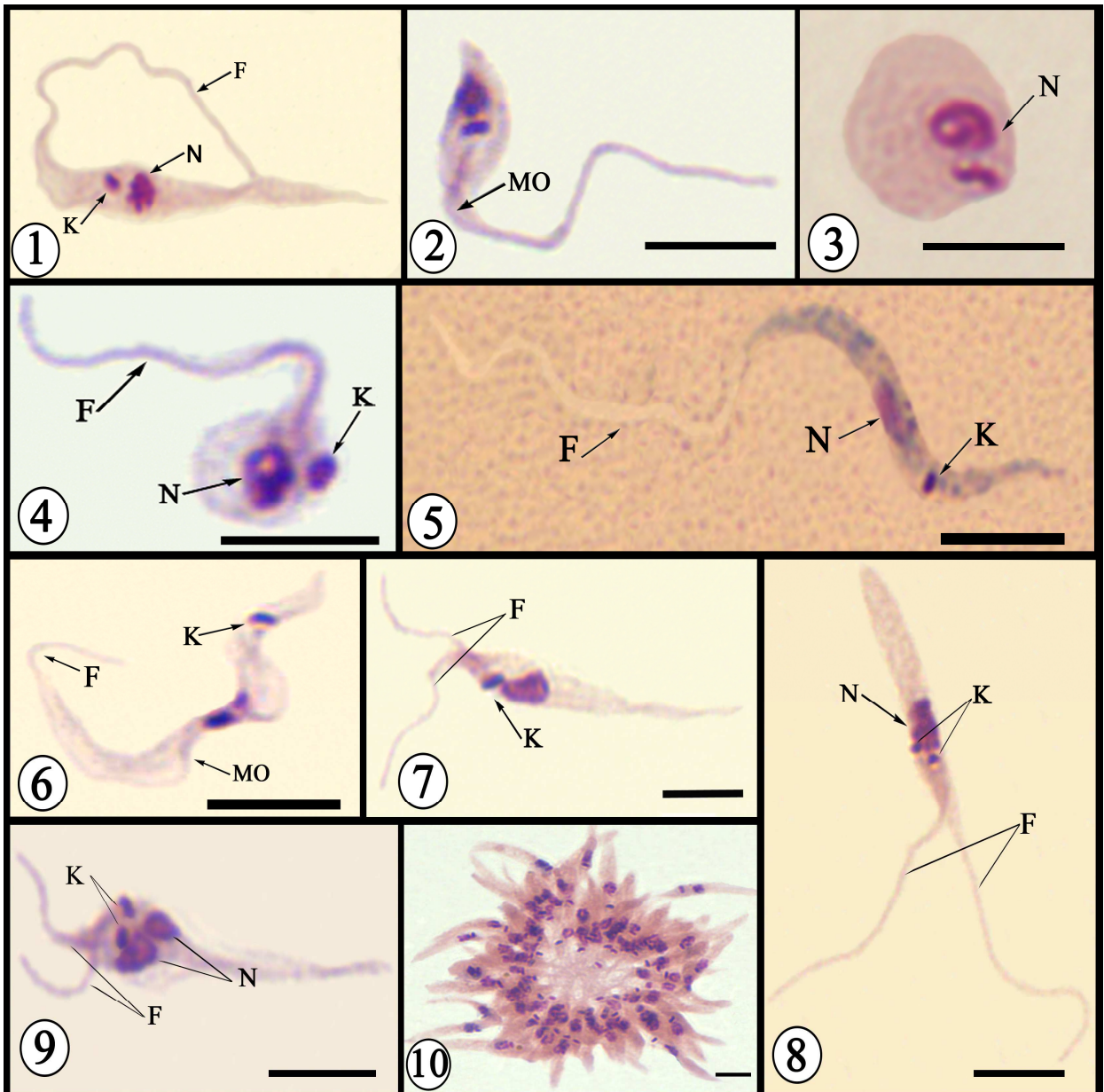
O comprimento do flagelo livre, nas formas que o apresentaram, mede aproximadamente $17\mu\text{m}$ sendo maior que o comprimento do corpo (TAB. 2).

Os tripomastigotas apresentaram variação quanto à largura corporal. Nos tripomastigotas delgados (Fig. 5) o núcleo é oval e alongado, localizado na região posterior do corpo ($IN < 1$). O cinetoplasto alongado e em alguns indivíduos côncavo está localizado na região posterior do corpo, próximo ao núcleo ($IK > 2$).

TABELA 2. Dados morfométricos das formas de *Trypanosoma* sp3. em cultura. Medidas apresentadas em μm , dispostas por média, \pm desvio padrão e amplitude (máximo e mínimo).

Morfotipo	Epimastigotas		Esferomastigotas		Tripomastigotas	
	Alongados	Piriformes	Sem flagelo aparente	Flagelo livre longo	Delgados	Largos
CT	55.47	42.33		31.19	62.22	44.72
	± 13.6 (37.2- 92)	± 6.8 (32.4 - 55.9)	-	± 9 (18.8 - 48.5)	± 14.3 (36.8 - 77.4)	± 18.5 (39.3 - 75.9)
CC	33.65	23.62	10.80	13.57	35.83	31.84
	± 7.8 (22.1 - 51.4)	± 4.3 (16.8 - 32.2)	± 2.3 (7.6 - 15.1)	± 3.8 (7.5 - 19.9)	± 6.9 (22,8 - 43.5)	± 14.8 (24.9 - 60.7)
L	4.26	8.11	7.80	10.34	2.52	3.39
	± 0.9 (2.9 - 6)	± 1.6 (5.9 - 11.5)	± 2.2 (4.8 - 13.4)	± 2.9 (6.4 - 16.2)	± 0.64 (1.7 - 3.4)	± 1.7 (2.1 - 6.6)
F	23.62	19.36		17.20	26.39	12.87
	± 8.23 (10.7 - 40.6)	± 4.1 (12 - 23.9)	-	± 6.6 (7.1 - 28.6)	± 10.47 (14 - 41.5)	± 5.4 (10 - 19.2)
NC	3.67	3.76	3.79	3.90	4.81	4.74
	± 0.6 (2.4 - 4.9)	± 0.6 (3 - 5.2)	± 0.6 (3 - 4.8)	± 0.8 (2.6 - 5.77)	± 1.55 (2.7 - 7.1)	± 2 (3.3 - 8.3)
NL	2.99	3.09	3.19	3.30	1.98	2.35
	± 0.6 (1.6 - 4.8)	± 0.5 (2.2 - 4.4)	± 1.2 (2.3 - 7.2)	± 0.9 (2.4 - 6.4)	± 0.61 (1.3 - 3)	± 1.03 (1.5 - 3.3)
NA	13.08	10.12	5.90	7.23	17.50	13.77
	± 3.9 (7.6 - 26.3)	± 2.6 (6.2 - 15.8)	± 2 (3.2 - 9.6)	± 2.6 (3 - 13.09)	± 4.6 (9.5 - 22.5)	± 6.1 (9.2 - 23.2)
NP	20.32	13.44	4.90	6.77	18.20	18
	± 6.2 (12.2 - 39.7)	± 3.9 (9 - 22.8)	± 2.6 (1.7 - 11.2)	± 2.6 (2 - 11)	± 2.9 (13.3 - 20.9)	± 9.8 (11.6 - 37.5)
NK	3.43	2.66	3.34	3.03	7.40	6.49
	± 1.6 (1.5 - 8.7)	± 0.56 (1.7 - 4.1)	± 1.6 (1.9 - 6.8)	± 1.2 (1 - 5.2)	± 6.3 (1.1 - 17.4)	± 5.1 (2.9 - 17)
KC	2.34	2.16	2.08	2.64	1.82	1.75
	± 0.4 (1.5 - 4.1)	± 0.4 (2.9 - 1.1)	± 0.4 (1.5 - 2.9)	± 0.7 (1.5 - 4.3)	± 0.48 (1.1 - 2.4)	± 0.6 (1.2 - 2.3)
KL	1.16	1.01	1.13	1.21	1.20	0.98
	± 0.2 (0.8 - 1.7)	± 0.12 (0.7 - 1.2)	± 0.1 (0.9 - 1.4)	± 0.3 (0.9 - 2)	± 0.08 (1.1 - 1.3)	± 0.4 (0.8 - 1.8)
KA	10.21	7.76	4.79	5.20	24.90	21.71
	± 3.9 (5.5 - 25.5)	± 2.4 (4.4 - 12.8)	± 2.2 (1.5 - 8.7)	± 1.4 (2.5 - 7.9)	± 10.5 (10.7 - 40)	± 13.9 (12.5 - 54.5)
KP	23.26	15.80	6.02	8.71	10.84	10.13
	± 7.3 (10.5 - 42.5)	± 4 (11.5 - 25)	± 2.1 (2 - 9.9)	± 3.4 (4 - 14.6)	± 5.8 (3.4 - 17.5)	± 6.99 (3.3 - 22.4)

*CT (comprimento total do corpo), CC (comprimento do corpo), L (largura do corpo), F (comprimento do flagelo livre), NC (comprimento do núcleo), NL (largura do núcleo), NA (distância do núcleo à extremidade anterior do corpo), NP (distância do meio do núcleo à extremidade posterior do corpo), NK (distância do meio do núcleo ao meio do cinetoplasto), KA (distância do cinetoplasto à extremidade anterior do corpo), KP (distância do cinetoplasto à extremidade posterior do corpo).



Prancha 1. Formas de cultura de *Trypanosoma* sp.3, barra 10 μ m. *F (flagelo), K(cinetoplasto), MO (membrana ondulante) e N (núcleo). Figura 1. Epimastigota delgado. Figura 2. Epimastigota piriforme com extremidade posterior do corpo fortemente afilada. Figura 3. Esferomastigota sem a porção livre do flagelo aparente. Figura 4. Esferomastigota com flagelo livre. Figura 5. Tripomastigota delgado. Figura 6. Tripomastigota largo com membrana ondulante conspícua e flagelo livre. Figuras 7- 10. Epimastigotas em processo reprodutivo. Figura 7. Epimastigota piriforme em início de divisão iniciada pela duplicação do flagelo livre. Figura 8. Epimastigota delgado apresentando dois flagelos e dois cinetoplastos. Figura 9. Epimastigota piriforme apresentando flagelo livre, cinetoplasto e núcleo duplicados. Figura 10. Epimastigotas delgados em rosetas.

O citoplasma densamente corado apresentou um vacúolo localizado anterior e próximo ao núcleo. O flagelo livre mede cerca de 26µm, aproximadamente o tamanho do comprimento do corpo, em alguns indivíduos foi evidenciada marca do flagelo na preparação em forma de canal claro (Fig. 5).

Nos tripomastigotas largos (Fig. 6) o núcleo é oval e alongado, com variação quanto à localização, sendo observado na região anterior, mediana e posterior do corpo. O cinetoplasto alongado, em alguns indivíduos, apresentou-se côncavo, com variação quanto à localização, sendo observado na região mediana do corpo, próximo ao núcleo e na região posterior do corpo. A membrana ondulante é conspícua, com 3 ou 4 dobras, e o flagelo livre mede 12µm, aproximadamente ½ do comprimento do corpo. Estes foram observados no 7º dia de desenvolvimento, em baixas freqüências, aproximadamente 0,86% das formas observadas.

Verificou-se que estas formas, em isolados mantidos por longos períodos em culturas, ocorreram após o 12º dia após inclusão.

Formas anômalas foram verificadas ao longo das observações, sendo mais freqüentes em culturas após o 6º dia de desenvolvimento.

Verificou-se a variação da freqüência de formas epimastigotas e esferomastigotas em observações em cultura (Fig. 11). Ao longo de 13 dias verificou-se a predominância de formas epimastigotas delgadas em relação às demais observadas (Fig. 11). Epimastigotas piriformes atingiram número máximo entre o 1º e 2º dias de observação, 57% das formas observadas, enquanto as formas epimastigotas delgadas atingiram no 4º dia, 75% das formas observadas. Variações no aumento e declínio da freqüência foram verificadas, sincronicamente, entre as formas epimastigotas até o 13º dia de observação em que apresentaram, aproximadamente, números semelhantes de indivíduos.

Esferomastigotas foram observadas em menor freqüência que epimastigotas. Verificou-se aumento na freqüência de esferomastigotas com porção livre do flagelo no 11º dia de observação, em que foram mais freqüentes que epimastigotas piriformes.

O polimorfismo das formas de cultura dos tripanossomas de anuros foi amplamente relatado (MACHADO, 1911; PONSELLE, 1923; PACKCHANIAN, 1934; STEINERT, 1958, 1965; PÉREZ-REYES *et al.*, 1960; LEHMANN, 1962; LEHMANN & SORSOLI, 1962; PÉREZ-REYES, 1968a e PÉREZ-REYES, 1968b; AYALA, 1971; FROMENTIN, 1971, BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; PEREIRA *et al.*, 1973; REILLY & WOO, 1982b; MARTIN & DESSER, 1990; 1991a).

Formas semelhantes às observadas no presente estudo foram relatadas por AYALA (1971) em *T. bufophlebotomi* em dois diferentes sistemas *in vitro* e em flebotomínios; FENG & CHUNG

(1940) e FENG & CHAO (1943) em *T. bocagei* em flebotomídeos; SCORZA & DAGERT (1958) e MIYATA (1976), em *T. rotatorium* em sanguessugas. MARTIN & DESSER (1991a) em *T. fallisi*, relataram a ausência de esferomastigotas e rosetas em sanguessugas. PÉREZ-REYES (1968) e MARTIN & DESSER (1991a) relataram que ocorre semelhança entre as formas de cultura e as formas em desenvolvimento no hospedeiro invertebrado.

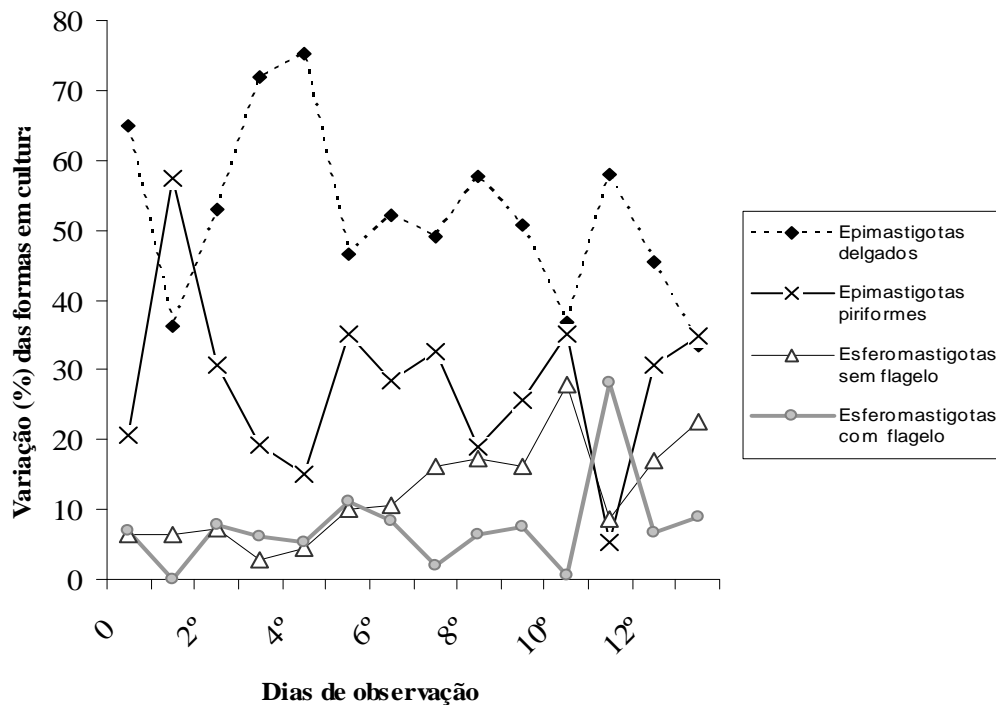


Figura 11. Frequência (%) da variação das formas em cultura de *Trypanosoma* sp. 3 ao longo de 13 dias de observação

PEREIRA *et al.* (1973) relataram aparecimento simultâneo de diferentes formas de cultura em *T. rotatorium* proveniente de *L. ocellatus* do Estado do Rio de Janeiro, bem como REILLY & WOO (1982b) para *T. andersoni* e *T. grylli* que corroboram os resultados do presente trabalho. Segundo os autores citados, não existem dados sobre os fatores que desencadeiam as alterações morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento das várias formas de cultura desses tripanossomas.

PONSELLE (1923) e REILLY & WOO (1982b) relataram a presença de tripomastigotas em culturas de *T. inopinatum* e *T. andersoni* 10 dias após inclusão; REILLY & WOO (1982b) em *T. grylli* no 13º dia; MARTIN & DESSER (1990a) em *T. fallisi* entre o 4º e 6º dias e relataram que estas ocorrem somente quando os nutrientes disponíveis em culturas esgotam-se. Estes autores

verificaram a presença de vacúolos próximos ao núcleo semelhantes aos relatados no presente estudo e especularam sobre a possível função osmorregulatória.

STEINERT & BONÉ (1956) e MARTIN & DESSER (1990a) relataram em culturas que as formas tripomastigotas ocorrem em baixas frequências e que o aparecimento pode ocorrer tardiamente em isolados mantidos por longos períodos em cultura e que tendem a perder sua infectividade ao hospedeiro vertebrado (MARTIN & DESSER, 1990a e 1991b). No presente estudo verificou-se que o aparecimento das formas tripomastigotas variou, sendo observadas em menor período de tempo nos isolados mais recentes, corroborando as observações de MARTIN & DESSER (1990a).

STEINERT & BONÉ (1956) e STEINERT (1958; 1965) verificaram que a uréia é um dos fatores que desencadeiam a transformação de formas epimastigotas de *T. mega* em tripomastigotas. CREEMERS & JADIN (1966) também utilizaram uréia associada à fase líquida do meio de cultura e obtiveram, assim como os autores mencionados, aumento do número dos tripomastigotas. Entretanto, esta ação da uréia foi questionada por FROMENTIN (1971).

Não existem outros relatos dos fatores que desencadeiam as transformações das formas de cultura de tripanossomas de anuros em tripomastigotas, o que continua sendo fato ainda não elucidado.

LEHMANN & SORSOLI (1962) relataram a presença de formas anômalas em culturas de *T. ranarum*. Estes autores verificaram por testes citoquímicos que estas eram formas em degeneração. AYALA (1971) também verificou formas com morfologia anômala em culturas de *T. bufophlebotomi*. No presente estudo, estas foram consideradas em degeneração por seu aspecto morfológico, corroborando as observações de LEHMANN & SORSOLI (1962) e AYALA (1971).

LEHMANN & SORSOLI (1962) observaram formas de desenvolvimento de *T. ranarum* ao longo de 15 dias e verificaram variação na frequência entre as formas epimastigotas delgadas e piriformes e relataram que as formas esferomastigotas ocorrem em baixas frequências corroborando as observações do presente estudo.

3.3 Reprodução das formas de culturas

Formas epimastigotas e esferomastigotas de *Trypanosoma* sp. 3 foram observadas em processo de divisão binária; divisão múltipla não foi observada.

O processo de divisão ocorreu em baixas frequências, atingindo máximo no 10º dia de observação, aproximadamente 10% das formas observadas. O processo de divisão (Figs. 7; 8 e 9), observado em microscopia óptica, é verificado pela duplicação do flagelo livre, com

desenvolvimento do pequeno flagelo (Fig. 8), seguido da divisão do cinetoplasto, do núcleo e posterior divisão do citoplasma. Formas em transição entre os diferentes estágios, foram observadas. Esferomastigotas sem a porção livre do flagelo aparente dividiram-se por duplicação do cinetoplasto, seguida da divisão do núcleo e posterior divisão do citoplasma.

A formação de rosetas foi verificada para as formas de cultura, à exceção dos tripomastigotas. Estas foram observadas em baixas frequências, sendo mais numerosas no 9º dia de observação, aproximadamente, 5% das formas observadas. As rosetas apresentaram número variável de indivíduos e tipos de formas resultando na formação de rosetas constituídas por um tipo morfológico (Fig. 10) ou mais de um tipo morfológico.

PÉREZ-REYES (1960), PEREIRA *et al.* (1973), AYALA (1971), LEHMANN & SORSOLI (1962) e REILLY & WOO (1982b) relataram processo de divisão múltipla em formas de cultura em diversas espécies de tripanossomas de anuros. No presente estudo tal processo não foi observado, sendo verificado somente processo de divisão binária que é o processo mais comumente relatado para estes tripanossomas (MACHADO, 1911; PONSELLE, 1923; PÉREZ-REYES *et al.*, 1960; STEINERT, 1965; FROMENTIN, 1971; BARDSLEY & HARMSSEN, 1973; PEREIRA *et al.*, 1973; REILLY & WOO, 1982b e MARTIN & DESSER, 1991a).

A formação de rosetas foi verificada por MACHADO (1911), STEINERT (1958), PÉREZ-REYES *et al.* (1960), FROMENTIN (1971), REILLY & WOO (1982 b) e MARTIN & DESSER (1991a) em que relataram a presença de rosetas formadas por um ou vários tipos morfológicos, como observado no presente estudo.

Formas de cultura que apresentaram divisão do núcleo anterior a do cinetoplasto foram relatadas por PONSELLE (1923), REILLY & WOO (1982 b) e consideradas como formas anômalas. No presente estudo, estas formas apresentaram, além do segundo núcleo, a presença de um segundo flagelo livre. O que pode ser indício de processo reprodutivo, sendo necessários outros estudos para a comprovação desta hipótese.

3.4 Ultra-estrutura

3.4.1 Microscopia eletrônica de Varredura

Formas de cultura de *Trypanosoma* sp.3 foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram verificadas longas formas epimastigotas delgadas, apresentando as extremidades afiladas e flagelo que percorre a porção anterior do corpo aderido à membrana plasmática (Fig. 12). O flagelo emerge lateralmente a partir da bolsa flagelar (Fig. 14). Foram observadas formas epimastigotas piriformes e esferomastigotas, com curto flagelo livre contendo

sulcos (Fig. 13, 15 e 16), indicando os ramos mitocondriais no citoplasma. Em algumas formas foi possível verificar marcação de grânulos arredondados (Fig. 17), abaixo da membrana plasmática, localizados ao longo da extensão citoplasmática que provavelmente referem-se a vacúolos. Formas epimastigotas foram verificadas em divisão, pelo surgimento de um segundo flagelo, caracterizado por seu pequeno tamanho (Fig. 16), ou pela presença de um segundo flagelo desenvolvido (Fig. 18). Epimastigotas piriformes em divisão apresentaram numerosos sulcos proeminentes. É provável, pelo estágio de divisão, que estes sulcos tenham ocorrido pela duplicação da mitocôndria que ocorre após o início da duplicação do flagelo (PÉREZ-REYES, 1969; WOO, 1969; HOARE, 1972; REILLY & WOO, 1982).

3.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Formas de cultura de *Trypanosoma* sp. 3 foram também observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Formas epimastigotas longas e delgadas apresentam o núcleo oval e alongado, contendo duas regiões distintas (Fig.19). A heterocromatina concentra-se na região posterior do núcleo, próximo ao envoltório nuclear, enquanto o nucléolo, quando presente, está centralmente localizado e é difuso (Figs. 19 e 20).

O cinetoplasto, localizado no interior da mitocôndria, é longo e delgado, com extremidades arredondadas, em alguns indivíduos apresentou-se côncavo (Fig. 21). As redes de fibrilas de DNA (kDNA) apresentam-se dispostas paralelamente ao eixo maior do corpo (Figs. 19 e 21). Os ramos mitocondriais estendem-se no sentido antero-posterior, em localização periférica (Fig. 20). O corpúsculo basal, quando observado, apresenta-se próximo à membrana mitocondrial (Fig. 21). Dele parte o flagelo, formado por típico axonema com estrutura de 9+2 pares de microtúbulos. Corpo paraxial está presente ao longo do axonema (Fig. 21). O flagelo emerge da bolsa flagelar (Figs. 21) e apresenta-se aderido à membrana plasmática.

O citoplasma é finamente granular, apresentando ribossomos livres. Abaixo da membrana citoplasmática correm paralelamente, e em espiral, os microtúbulos subpeliculares. Inclusões lipídicas, elétron-luscentes e de variados tamanhos, foram observadas em toda extensão citoplasmática e em alguns indivíduos concentraram-se na região posterior do corpo (Fig. 19). O complexo de Golgi (Fig. 21) é bem desenvolvido, com aproximadamente 6 cisternas longas, e localiza-se na região posterior do corpo, próximo à bolsa flagelar.

Acidocalcisomas foram observados em diversos tamanhos, dispersos no citoplasma celular. Esta organela é envolvida por membrana, apresentando regiões elétron-luscentes e elétron-densas em seu interior (Figs. 22).

Os glicosomos são alongados (Fig. 22), com extremidades arredondadas e dispostos em fileiras justapostas no citoplasma celular. Estas organelas, envoltas por membrana, apresentam matriz com material elétron-denso. O retículo endoplasmático liso apresenta cisternas longas (Fig. 22) e localiza-se na periferia do corpo, algumas vezes próximo às fileiras de glicosomos.

No Brasil não existem dados sobre a ultra-estrutura dos tripanossomas que parasitam anuros. O presente estudo demonstrou que *Trypanosoma* sp. 3 apresenta características que lhe são peculiares como glicosomos alongados e em fileiras justapostas.

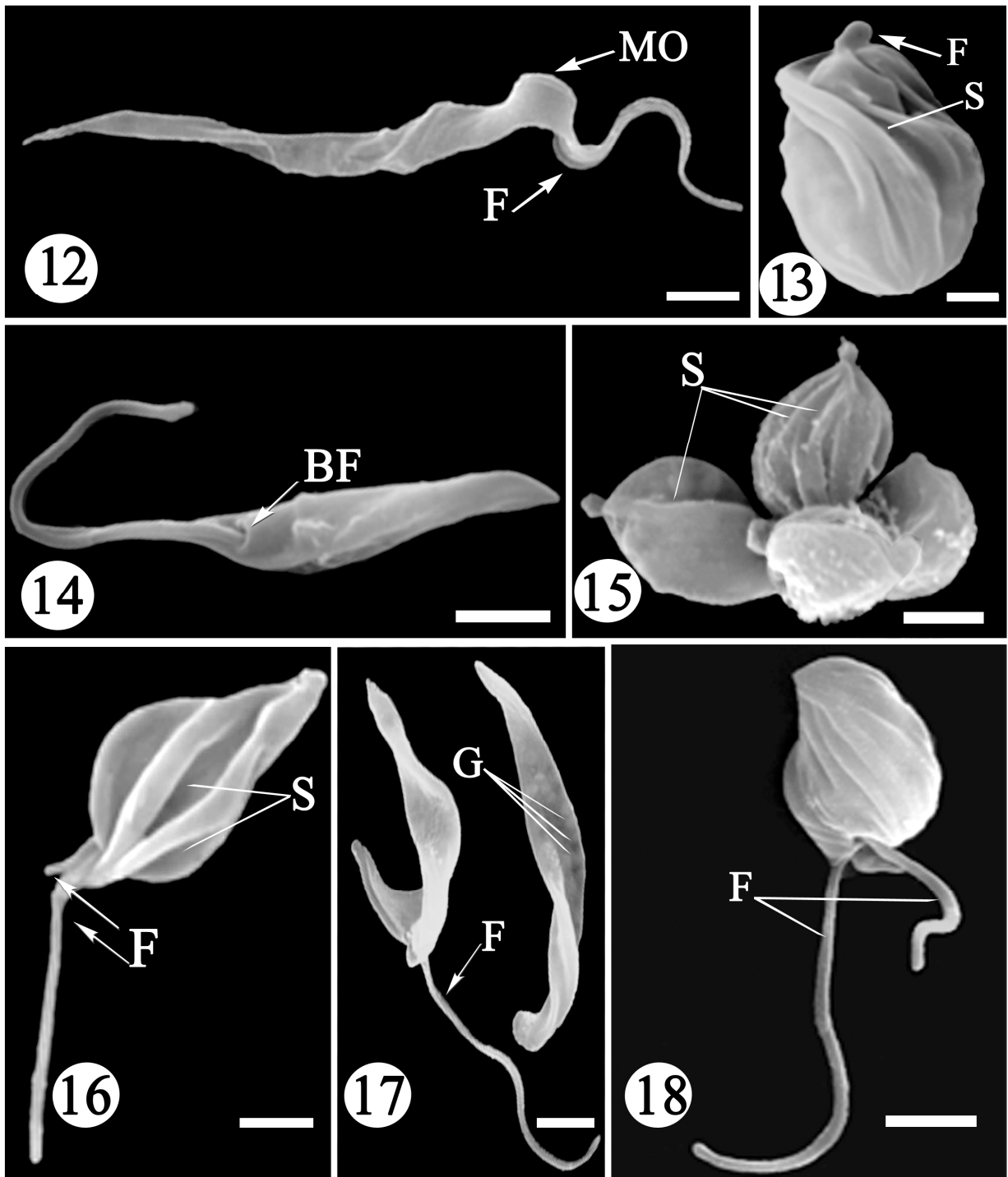
MARTIN & DESSER (1990) observaram a presença de nucléolo difuso em *T. fallisi*. A heterocromatina localizava-se na periferia do envoltório nuclear, semelhante aos resultados observados no presente estudo. A presença de duas áreas cromáticas no interior do núcleo (Fig. 19) foi também observada por microscopia óptica (Fig. 13 e 14) das formas largas dos tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. 3.

A mitocôndria alongada, com numerosos ramos, observada em *Trypanosoma* sp. 3, assemelhou-se à relatada por DESSER (1976) em *T. rotatorium* e constitui característica comum a diversas outras espécies do gênero (STEINERT, 1960; VICKERMAN, 1969; CORTES *et al.*, 1972; MOLYNEUX & ROBERTSON, 1974; PÉREZ-REYES *et al.*, 1976; DESSER, 1977; JONES & WOO, 1989; DE SOUZA & CUNHA-E-SILVA, 2003 e MATTHEWS, 2005).

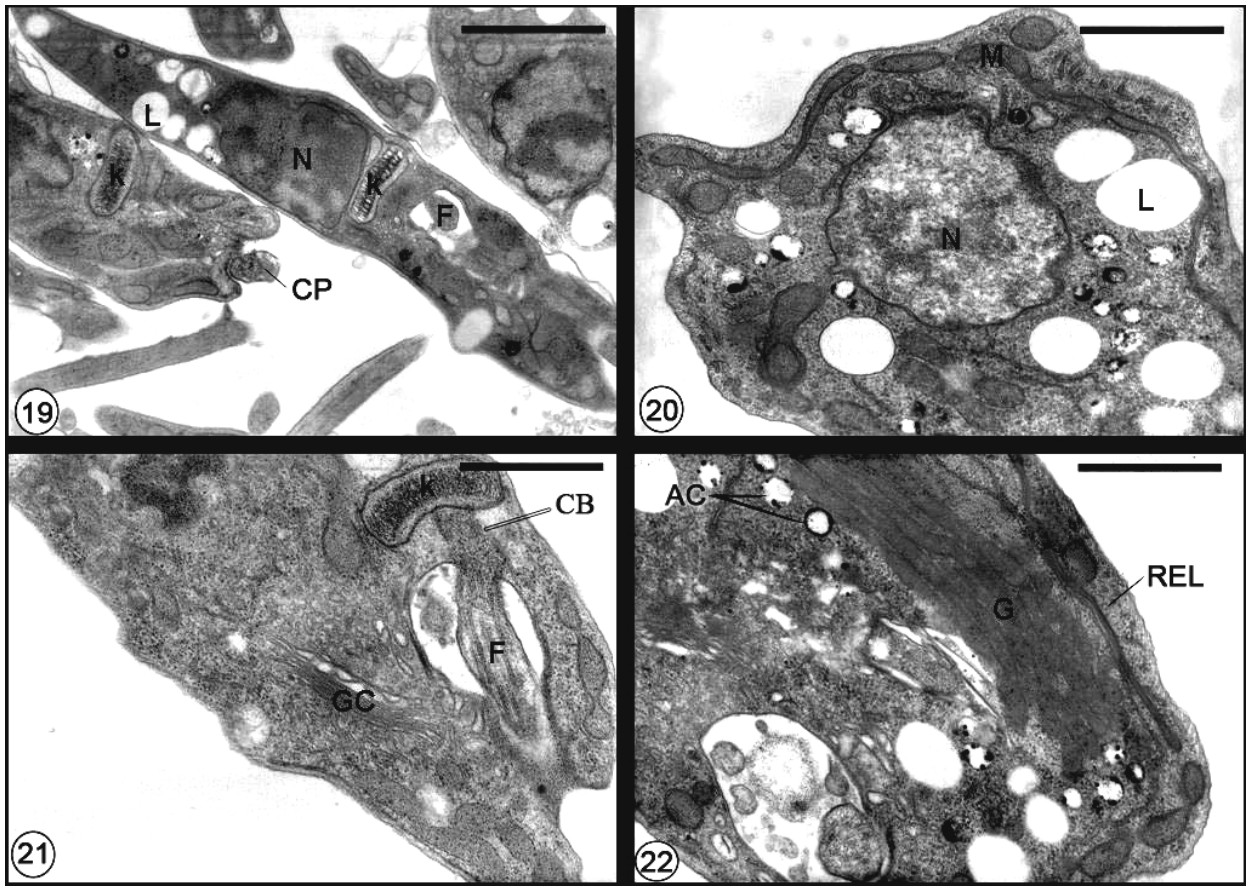
O arranjo típico de 9+2 pares de microtúbulos foi relatado por DE SOUZA & SOUTO-PADRÓN (1984) e DE SOUZA (1999) como característica comum à família Trypanosomatidae, sendo semelhante ao arranjo de outras estruturas flagelares de células eucarióticas.

A presença de vacúolos lipídicos foi relatada em *T. rotatorium*, *T. galba* e *T. fallisi* por DESSER (1976), CREEMERS & JADIN (1966), CORTES *et al.* (1972), PÉREZ-REYES *et al.* (1976) e MARTIN & DESSER (1990), respectivamente. *Trypanosoma fallisi* apresentou concentração destes vacúolos principalmente na região posterior do corpo, como relatado para *Trypanosoma* sp.3. Verificou-se variação quanto à localização destes vacúolos em *T. rotatorium*, *T. galba* e *Trypanosoma* sp.3.

Trypanosoma sp.3 apresentou complexo de Golgi desenvolvido, como observado em *T. galba* por PÉREZ-REYES *et al.* (1976). MARTIN & DESSER (1990) verificaram resultados semelhantes em tripomastigotas de *T. fallisi*, em epimastigotas o complexo de Golgi apresentou-se pouco desenvolvido (MARTIN & DESSER, 1990). Resultados semelhantes foram observados em *T. mega* por STEINERT & NOVIKOFF (1960) e *T. rotatorium* por CREEMERS & JADIN (1966). Ausência de complexo de Golgi foi relatada por CORTES *et al.* (1972) em *T. montezumae* e DESSER (1976) em *T. rotatorium*.



Prancha 2. Ultra-estrutura por microscopia eletrônica de varredura das formas de cultura de *Trypanosoma* sp.3, figura 13 barra 1 μ m e figuras 12, 14 – 18 barra 2 μ m. *BF (bolsa do flagelo), F (flagelo), G (grânulos), MO (membrana ondulante) e S (sulcos). Figura 12. Epimastigota delgado com flagelo aderido à membrana plasmática. Figura 13. Esferomastigota com curto flagelo livre. Figura 14. Epimastigota delgado com flagelo emergindo da bolsa flagelar. Figura 15. Esferomastigotas com flagelo livre curto e sulcos marcando o citoplasma, indicando os ramos mitocondriais. Figura 16. Epimastigota piriforme com sulcos e em início de processo reprodutivo pela presença do segundo flagelo livre. Figura 17. Epimastigotas delgados apresentando grânulos subpeliculares ao longo da extensão citoplasmática. Figura 18. Epimastigota piriforme em processo reprodutivo com segundo flagelo livre desenvolvido.



Prancha 3. Ultra-estrutura por microscopia eletrônica de transmissão de *Trypanosoma* sp. 3, figura 19 barra 3.2 μ m e figuras 20 – 22 barra 0.75 μ m. *AC (acidocalcisomas), CB (corpúsculo basal), CP (corpo paraxial), F (flagelo), G (Glicosomos), GC (complexo de Golgi), L (inclusões lipídicas), N (núcleo) e REL (retículo endoplasmático liso). Figura 19. Corte longitudinal de epimastigota delgado apresentando núcleo alongado com concentração de heterocromatina na porção posterior; cinetoplasto com fibrilas de kDNA orientadas paralelamente ao maior eixo do corpo; inclusões lipídicas e flagelo com corpo paraxial. Figura 20. Corte transversal mostrando núcleo com nucléolo difuso e centralmente disposto; ramos mitocondriais periféricos e inclusões lipídicas. Figura 21. Corte longitudinal mostrando cinetoplasto côncavo; corpúsculo basal localizado próximo a membrana mitocondrial e complexo de Golgi. Figura 22. Corte transversal mostrando glicosomos alongados; acidocalcisomas e retículo endoplasmático liso localizado na periferia do corpo.

Os acidocalcisomas relatados em *Trypanosoma* sp.3 assemelharam-se às organelas observadas por DO CAMPO *et al.* (1995) em *T. cruzi* e por VERCESI & DO CAMPO (1996) em *Trypanosoma brucei*. Estas organelas ácidas, responsáveis pela concentração de íons inorgânicos, já foram relatadas em tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania*, *Phytomonas* e *Herpetomonas* (MIRANDA *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2004a; MIRANDA *et al.*, 2004b e MEDEIROS *et al.*, 2005).

Estruturas semelhantes aos acidocalcisomas observados em *Trypanosoma* sp.3 foram relatadas em *T. montezumae*, *T. rotatorium* e *T. galba* (CORTES *et al.*, 1972; DESSER, 1976 e PÉREZ-REYES *et al.*, 1976) como “vacúolos”. MOLYNEUX & ROBERTSON (1974) e LOM *et al.* (1980) verificaram estes “vacúolos” em tripanossomas parasitos de aves e peixes.

O presente estudo faz o primeiro relato da presença de acidocalcisomas em tripanossomas que parasitam anuros. Os dados do presente estudo mostraram que estas organelas localizaram-se próximas à membrana nuclear e às fileiras de glicosomos. Segundo MIRANDA *et al.* (2000) a associação de acidocalcisomas a diferentes organelas pode indicar possível relação entre elas. RUIZ *et al.* (2001) e DE SOUZA *et al.* (2000) sugeriram que estas organelas estão associadas à adaptação do parasito a alterações ambientais, bem como à regulação do pH e à osmorregulação.

Como relatado, os tripomastigotas alongados de *Trypanosoma* sp.3 apresentaram grânulos fortemente corados ao longo da extensão citoplasmática que provavelmente referem-se a acidocalcisomas. Estes grânulos inicialmente denominados “grânulos de volutina” (DE SOUZA 1984; 1999), foram amplamente relatados para tripomastigotas, e referem-se à acidocalcisomas.

Os glicosomos observados em *Trypanosoma* sp.3 diferiram dos relatados de diversas espécies do gênero, que em geral são pequenos e arredondados (LEWIS & BALL, 1980; LOM *et al.* 1980; DE SOUZA, 1984; OPPERDOES *et al.* 1984; OPPERDOES & MICHELS, 1993). Glicosomos alongados foram relatados em *T. bouffardi*, *Leptomonas samueli* e *Phytomonas* sp. (MOLYNEUX & ROBERTSON, 1974; SOUTO-PADRON & DE SOUZA, 1982 e ATTIAS *et al.* 1988). Entretanto, diferem dos encontrados em *Trypanosoma* sp. 3 quanto a sua disposição. Estas organelas desempenham importante função na via glicolítica dos tripanossomatídeos (OPPERDOES *et al.* 1984) e estão associadas à obtenção de ATP a partir da quebra das grandes cadeias de ácidos graxos (MICHELS *et al.* 2000 e PARSONS *et al.* 2001). A presença de inúmeras vesículas lipídicas associadas a glicosomos maiores e alongados poderia indicar um possível sistema de reserva e utilização energética dos parasitos. LORENZ *et al.* (1998) observaram glicosomos com morfologia alterada em *T. brucei* que eram semelhantes, em forma e disposição, aos relatados em *Trypanosoma* sp. 3. Este sistema poderia ser considerado como via alternativa de reserva e biotransformação energética, o que precisa de comprovação. *Trypanosoma* sp. 3 diferiu dos outros tripanossomas de anuros por características ultra-estruturais (TAB.3).

A presença de citóstoma e citofaringe foi relatada para *T. mega*, *T. galba*, *T. rotatorium* e *T. fallisi* (STEINERT & NOVIKOFF, 1960; PÉREZ-REYES *et al.*, 1976; DESSER, 1976; MARTIN & DESSER, 1991). CORTES *et al.* (1972) relataram ausência em *T. montezumae*; no presente estudo estas estruturas também não foram observadas.

É provável que as espécies que apresentam citóstoma e citofaringe apresentem reservosomos, como relatado para *T. fallisi*. Entretanto, tal hipótese necessita de comprovação.

TABELA 3. Comparação entre as organelas celulares e estruturas intracelulares em tripanossomas de anuros.

	<i>Trypanosoma</i> sp.3	<i>T. rotatorium</i>	<i>T. rotatorium</i>	<i>T. mega</i>	<i>T. fallisi</i>	<i>T. galba</i>	<i>T. montezumae</i>
	Presente Estudo	Creemers & Jadin (1966)	Desser (1976)	Steinert & Novikoff (1960)	Martin & Desser (1991)	Pérez-Reyes <i>et al.</i> (1976)	Cortés <i>et al.</i> (1976)
Acidocalcisoma	+	NC	NC	NC	-	NC	NC
Citóstoma	-	NC	+	+	+	+	-
Complexo de Golgi	+	+	-	+	+	+	-
Glicosoma	Alongados	NC	Redondos	Redondos	Redondos	Redondos	NC
Reservossoma	-	NC	NC	NC	+	NC	NC
Simbiontes	-	-	-	NC	+	NC	-
Vacuólos lipídicos	+	+	+	NC	+	+	NC

*NC (não citado pelos autores); + (presença); - (ausência).

Os estudos de MACHADO (1911), COSTA & SILVA (1969) e PEREIRA *et al.* (1973) com tripanossomas de anuros, identificados como *T. rotatorium*, encontrados em regiões próximas aos do presente estudo assemelharam-se morfológicamente tanto as formas sangüíneas quanto as isoladas em cultura. Entretanto, os resultados obtidos pela ultraestrutura no presente estudo, indicaram separação entre *T. rotatorium* e *Trypanosoma* sp. 3.

Trypanosoma sp. 3 apresentou diferenças morfológicas em relação às espécies relatadas, o que reforça sua singularidade. Além disto, este estudo faz o primeiro relato da ultra-estrutura de formas de culturas de tripanossomas que parasitam anuros no Brasil.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTIAS, M.; ROITMAN; CAMARGO, E.P.; DOLLET, M. & DE SOUZA 1988. Comparative analysis of the fine structure of four isolates of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **Journal of Protozoology**, **35** (3): 365-370.
- AYALA, S.C. 1971. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma buphleboto*. **Journal of Protozoology**, **18**(3): 433-436.
- BARDSLEY, J.E & HARMSSEN, R. 1973. The trypanosomes of anura. **Advances in Parasitology**, **2**: 1-73.
- BOUET, G. 1906. Culture du trypanosome de la grenouille (*Trypanosoma rotatorium*). **Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et de ses Filiales**, **20**: 564-577.
- CREEMERS, J. & JADIN, J.M. 1966. Ultrastructure et biologie de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843. **Acta of Zoology and Pathology Antverpiensia**, **41**: 119-136.
- CORTES, M.; PÉREZ-REYES, R. & TAY, J. 1972. Ultraestructura de las formas de cultivo de um tripanossoma parasito de ranas, *Trypanosoma montezumae*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, **14**: 183-190.
- DE SOUZA, W 1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, **86**: 197- 283.

- DE SOUZA, W. & SOUTO-PADRÓN, T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. **Journal of Parasitology**, **66(2)**: 229-235.
- DE SOUZA, W. 1999. Short Review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94 (1)**: 17-36
- DE SOUZA, W. & CUNHA-E-SILVA, N.L. 2003. Cell fractionation of parasitic protozoa. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98(2)**: 151-170.
- DESSER, S.S. 1976. The ultrastructure of the epimastigote stages of *Trypanosoma rotatorium* in the leech *Batracobdella picta*. **Canadian Journal of Zoology**, **54**: 1712-1723.
- DESSER, S.S. 1977. Ultrastructural observations on the epimastigote stages of *Trypanosoma avium* in *Simulium rugglesi*. **Canadian Journal of Zoology**, **55**: 1359-1367.
- DO CAMPO, R.; SCOTT, D.A.; VERCESI, A.E. & MORENO, S.N.J. 1995. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, **310**: 1005-1012.
- FENG, L. & CHUNG, H. 1940. *Phlebotomus squamirostris* Newstead, transmitter of *Trypanosoma bocagei* França in the toad, *Bufo gargarizans* (Cantor). **Chinese Medical Journal, Supplement**, **3**: 198-211.
- FENG, L. & CHAO, C.S. 1943. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. **Chinese Medical Journal, Supplement**, **62**: 210-217.
- FERREIRA, R.C; CAMPANER, M.; TAKATA, C.L.A.; TAKEDA, G.F. & TEIXEIRA M.M.G. 2003. Anuran trypanosomes: morphological, biological and molecular characterization of Brazilian isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45**: 162.
- FROMENTIN, H. 1971. Contribution à l'étude compare des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre *Trypanosoma*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, **46(4)**: 337-445.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C. & SILVA, A.M. 1969. Hemoparasitos de anfíbios do Brasil: alguns aspectos citológicos de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 (Protozoa, Kinetoplastida). **Atas da Sociedade de Biologia**, Rio de Janeiro, **12(5, 6)**: 245.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C. & LAGRANGE, P.H. 1981. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **76(4)**: 367-381.
- HOARE, C.A. 1972. **The Trypanosomes of Mammals**. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh. **749 p.**
- JONES, S.R.M. & WOO P.T.K. 1986. *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911 in *Rana pipiens* of southern Ontario: morphometrics and a description of the division process. **Systematic Parasitology**, **9**: 57-62.
- JONES, S.R.M.; S.R.M. & WOO P.T.K. 1989. Use of kidney impressions for the detection of trypanosomes of Anura. **Journal of Wildlife Diseases** **25 (3)**: 413-415.
- LAVERAN, A. & MESNIL, F. 1901. Sur la structure de trypanosome des grenouilles et sur l'extension du genre *Trypanosoma* Gruby. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **53**: 678-680.
- LEHMANN, D.L. 1962. Cultures forms of *Trypanosoma ranarum* (Lankester, 1871). II Effect of temperature upon reproduction and cyclic development. **Journal of Protozoology**, **9(3)**: 325-326.

- LEHMANN, D.L. & SORSOLI, W.A. 1962. The cultural forms of *Trypanosoma ranarum* (Lankester, 1871). I. Relation between cyclic development of cultures forms, oxygen consumption in the presence of glucose, and malonate inhibition. **Journal of Protozoology**, **9(1)**: 58-60.
- LEWIS, J.W. & BALL, S.J. 1980. Ultrastructure of the epimastigotes of the fish trypanosome *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1883, in the crop of the leech vector, *Hemiclepsis marginata*. **Journal of Parasitology**, **66(6)**: 948-953.
- LOM, J.; PAULIN, J.J. & NOHÝNKOVÁ, E. 1980. The fine structure of the fish trypanosome, *Trypanosoma danilewskyi*: I. Presence of a cytopharyngeal complex in blood stream trypomastigotes. **Protistologica**, **3**: 365-373.
- LORENZ, P.; MAIER, A.G.; BAUMGART, E.; ERDMANN, R. & CLAYTON, C. 1998. Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. **European Molecular Biology Organization Journal**, **17 (13)**:3542 – 3555.
- MACHADO, A. 1911. Pesquisas citológicas sobre o *Trypanosoma rotatorium* Gruby. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **3**: 108-135.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1990. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. **The Journal of Parasitology**, **37(3)**: 199-206.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S.1991a. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*: A light and electron microscopic study. **Parasitology Research**, **77**: 18-26
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S.1991b. Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. **Journal of Parasitology**, **77(3)**: 498-500.
- MATHIS, C. 1906. Sur une modification au milieu de Novy-Mc Neal pour la culture des trypanosomes. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **61**: 550-552.
- ATHIS, C. & LEGER, M. 1911. Trypanosomes des crapauds du Tonkin. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **70**: 956-958.
- MATTHEWS, K.R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, **118**: 283-290.
- MEDEIROS, L. C. A. S.; MOREIRA, B. L. M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J. & BARRABIN, H. 2005. A proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Herpetomonas* sp. **Molecular and Biochemical Parasitology** **140**: 175-182.
- MEIRELLES, R.M.S. & SOARES, M.J. 2001. Quick fixation of eukaryotic cell suspensions for routine transmission electron microscopy. **Acta Microscopica**, **10 (1)**: 19-22.
- MIRANDA, K.; BENCHIMOL, M.; DOCAMPO, R. & DE SOUZA, W 2000. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, **86**: 373-384.
- MIRANDA, K.; DOCAMPO, R.; GRILLO, O.; FRANZEN, A.; ATTIAS, M.; VERCESI, A.; PLATTNER, J.H. & DE SOUZA, W 2004a. Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. **Histochemistry and Cell Biology** **121 (5)**: 407-418.
- MIRANDA, K.; RODRIGUES, C. O.; HENTCHEL, J.; VERCESI, A.; PLATTNER, H.; DE SOUZA W. & DOCAMPO, R. 2004b. Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. **Microscopy and Microanalysis** **47**: 647-655.

- MITCHELS, P.A.M.; HANNAERT, V. & BRINGAUD, F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae – new data and views. **Parasitology Today**, **16 (11)**: 482 – 490.
- MISSET, O.; BOS, O.J.M. & OPPERDOES, F.R. 1986. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. **European Journal of Biochemistry**, **157**: 441-453.
- MIYATA, A. 1976. Anuran haemoprotozoa found in the vicinity of Nagazaky City. I *Trypanosoma rotatorium*. **Tropical Medicine**, **18(3)**:125-134.
- MIYATA, A. 1978. Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryuku Islands with descriptions of six new species. **Tropical Medicine**, **20**: 51-81.
- MOLYNEUX, D.H. & ROBERTSON, E. 1974. Ultrastructure of the bloodstream forms of an avian trypanosome *Trypanosoma bouffardi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **68(4)**: 369 -377.
- OPPERDOES F.R.; BAUDHUIN, P. ; COPPENS, I.; ROE, C.; EDWARDS, S.W.; WEIJERS, P.J. & MISSET, O. 1984. Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (Microbodies) of the Protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. **The Journal Of Cell Biology** **98**: 1178-1184.
- OPPERDOES, F.R. & MICHELS, P.A.M. 1993. The glycosomes of the Kinetoplastida. **Biochimie**, **75**: 231-234.
- PACKCHANIAN, A. 1934. Scientific apparatus and laboratory methods. **Science**, **80(2079)**: 407-408.
- PARSONS, M.; FURUYA, T.; PAL, S. & KESSLER, P. 2001. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, **115**:19–28.
- PEREIRA, N.M.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; COLOMBO, T. & TRAVASSOS, J.M.C. 1973. Formas de cultura de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 - isolado da rã *Leptodactylus ocellatus* de Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **71(4)**: 357-366.
- PÉREZ-REYES R. 1968a. *Trypanosoma galba* n. sp., parasite of Mexican frogs. Morphology and cycle in the vertebrate. **Revista Latinoamericana de Microbiologia Parasitologica**, **10 (2)**: 79-84.
- PÉREZ-REYES R. 1968 b. Dos especies nuevas de tripanosomas parásitos de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia Parasitologica (Mex) Jan-Mar.**, **11**: 37-40.
- PÉREZ-REYES, R. 1969. Ciclo de vida de *Trypanosoma montesumae* Pérez-Reyes *et al.*, 1960, un flagelado parásito de ranas con división asimétrica. **Revista Latinoamericana de Microbiologia Parasitologica** **11(2)**: 57-60.
- PÉREZ-REYES, R.; BERTA, Y.H.; MONTESINOS, M.C. & VALENCIA, L.C. 1960. Estudios sobre hematozoarios X. Algunos tripanosomas de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia Parasitologica**, **3(4)**:201-211.
- PÉREZ-REYES, R.; TAY, J. & CORTÉS, M. 1976. Ultraestructura de los epimastigotes de *Trypanosoma galba*, um parasito de ranas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia Parasitologica**, **18**: 47-58.
- PONSELLE, A. 1923. La culture de *Trypanosoma inopinatum* trypanosome pathogène de la grenouille. **Annales de Parasitologie**, **1(2)**: 155- 158.

- REYLLI B.O. & WOO, P.T.K. 1982. The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). **Canadian Journal of Zoology**, **60**:116-123.
- REILLY B.O. & WOO, P.T.K. 1982a. The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 (Kinetoplastida). **Canadian Journal of Zoology**, **60**: 134-38.
- REILLY B.O. & WOO, P.T.K. 1982b. The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). **Canadian Journal of Zoology**, **60**: 124-33.
- RUIZ, F.A.; RODRIGUES, C.O. & DOCAMPO, R. 2001. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, **276 (28)**: 26114–26121.
- SCORZA, J.V. & DAGERT, C.M. 1958. Sobre la sinonímia Del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Boletín Venezoelano de Laboratorio Clínico**, **3**: 29-36.
- SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. 1982. Fine Structure and cytochemistry of peroxisomes (microbodies) in *Leptomonas samueli*. **Cell Tissue Research**, **222**: 153 – 158.
- SOUZA, C.S.F. & GONÇALVES DA COSTA, S.C. (1997). Estudo comparativo de imunomoduladores na leishmaniose tegumentar experimental. **Tese de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz**, **95p**.
- STEINERT, M. 1958. Action morphogénétique de l'urée sur le trypanosome. **Experimental Cell Research** **15**: 431-433.
- STEINERT, M. 1960. Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega*. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, **8**: 542 – 546.
- STEINERT, M. 1965. Morphogenesis versus division in *Trypanosoma mega*. **Journal of Protozoology**, **12 (2)**: 291-292
- STEINERT, M. & BONÉ, G.J. 1956. Induced change from culture form to bloodstream form in *Trypanosoma mega*. **Nature**, **178**: 362.
- STEINERT, M. & NOVIKOFF, A.B. 1960. The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. **Journal of Biophysical and biochemical Cytology**, **8**: 563 -569.
- STEINERT, M. & VAN ASSEL, S. 1967. The loss of kinetoplastic DNA in two species of Trypanosomatidae treated with acriflavine. **Journal of Cell Biology**, **34**: 489 – 503.
- VERCESI, A & DOCAMPO, R. 1994. Sodium–proton exchange stimulates Ca²⁺ release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal** **315**: 265-270.
- VERCESI, A, MORENO, S.N. & DOCAMPO, R. 1996. Inhibition of Ca²⁺ release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Biochemical Journal** **315**: 265-270
- VICKERMAN, K. 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, **5**: 163-193.
- VUCETICH, M. & GIACOBBE, O. 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. **Anales de Instituto de Medicina Regional**, **2**: 225-244.
- WALLACE, F.G. 1956. Cultivation of *Trypanosoma ranarum* on a liquid medium. **Journal of Protozoology**, **3**: 47-49.

Woo P.T.K. 1969. The development of *Trypanosoma canadensis* of *Rana pipiens* in *Placobdella* sp. **Canadian Journal of Zoology**, **47**:1257-1259.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz-se o primeiro registro da infecção por tripanossomas em *Leptodactylus lineatus* e em anuros do gênero *Ostheocephalus*.

Registra-se *Leptodactylus chaquensis* e *Ostheocephalus* sp. como novos hospedeiros para *Trypanosoma rotatorium* (*lato sensu*) e a ocorrência de *Trypanosoma chattoni* em espécies do gênero *Leptodactyllus* e no Brasil.

Constata-se a presença de tripanossomas polimórficos, em *Leptodactylus ocellatus* no estado do Rio de Janeiro.

Recomenda-se o exame de impressão de órgãos, principalmente dos rins, como técnica de alta sensibilidade para diagnóstico de tripanossomas de anuros.

Os grânulos fortemente corados, observados em tripomastigotas alongados de *Trypanosoma* sp.3 referem-se a acidocalcisomas e os vacúolos, também observados em tripomastigotas alongados, referem-se a vacúolos lipídicos.

As formas sangüíneas e as de cultura de *Trypanosoma* sp.3 são semelhantes às de *T. rotatorium*, entretanto, a análise da ultra-estrutura demonstra tratar-se de espécies distintas.

A ausência de citóstoma e citofaringe e a presença de glicosomos alongados verificados em *Trypanosoma* sp.3 reforçam a sua singularidade.

Destaca-se a necessidade de estudos moleculares e bioquímicos de *Trypanosoma* sp.3 para complementar sua caracterização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.R. & AYALA, S.C. 1968. Trypanosome transmitted by *Phlebotomus* first report from the Americas. **Science**, **161**:1023-1025.
- ATTIAS, M.; ROITMAN; CAMARGO, E.P.; DOLLET, M. & DE SOUZA 1988. Comparative analysis of the fine structure of four isolates of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **Journal of Protozoology**, **35 (3)** : 365-370.
- AYALA, S.C. 1970. Two new trypanosomes from California toads and lizards. **Journal of Protozoology**, **17(3)**: 370-373.
- AYALA, S.C. 1971. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma buphlebotoi*. **Journal of Protozoology**, **18(3)**: 433-436.
- BARDSLEY, J.E & HARMSSEN, R. 1968. The trypanosomes of Ranidae. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **Canadian Journal of Zoology**, **47**: 283-288.
- BARDSLEY, J.E & HARMSSEN, R. 1970. The trypanosomes of Ranidae II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **Canadian Journal of Zoology**, **48**: 1317-1319.
- BARDSLEY, J.E & HARMSSEN, R. 1973. The trypanosomes of anura. **Advances in Parasitology**, **2**: 1-73.
- BARTA, J.R.; & DESSER, S.S. 1984. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**, **20(3)**: 180-189.
- BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. 1989. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. **Transactions of the American Microscopical Society**, **108**:6-20.
- BAILEY, J.K. 1962. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. **Experimental Parasitology**, **12**: 155-163.
- BILLET, A. 1904. Sur le *Trypanosoma inopinatum* de la grenouille verte d'Algerie et sa relation possible avec les Drepadinium. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **57**:161-164.
- BOUET, G. 1909. Sur le quelques trypanosomes des vertébrés à sang froid de l'Afrique Occidentale Française. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, **66**: 609-611.
- BRUMPT, M.E. 1904. Contribution a l'étude de l'évolution des hémogregarines et des trypanosomes. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **56**: 165-167.
- BRUMPT, M.E. 1906. Rôle pathogène et mode de transmission du *Trypanosoma inopinatum* Ed. & Et. Sergent. Mode d' inoculation d'autres trypanosomes. **Comptes Rendus des Seances de Societe de Biologie**, Paris, **61**: 167-69.
- BRUMPT, E. 1923. Description de deux trypanosomes nouveaux; *Trypanosoma sergenti* et *Trypanosoma parroti* du *Discolglossus pictus*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, **1**: 337-341.
- BRUMPT, E. 1924. Un cas de rupture de la rate avec hémopéritoien au cours d'une infection expérimentale à *Trypanosoma inopinatum* chez la grenouille verte (*Rana esculenta*). **Annales de Parasitologie**, **2(4)**: 325.

- BRUMPT, E. 1928. Un nouveau trypanosome: *Trypanosoma neveu-lemairei* n. sp. de la grenouille verte (*Rana esculenta*). **Annales de Parasitologie**, **6(1)** :18-22.
- BUTTNER, A. & BOUCART, N. 1955a. Sur certaines particularités biologiques d'un trypanosome de la grenouille verte *Trypanosoma inopinatum* Sergent & Sergent, 1904. **Annales de Parasitologie**, **30(5-6)**: 431-445.
- BUTTNER, A. & BOUCART, N. 1955b. Observations sur le cycle évolutif de *Trypanosoma inopinatum* Sergent & Sergent, 1904. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, .
- CLARK, C.G.; MARTIN, D.S. & DIAMOND, L.S. 1995. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, **42(1)**:92-96.
- CREEMERS, J. & JADIN, J.M. 1966. Ultrastructure et biologie de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843. **Acta of Zoology and Pathology Antverpiensia**, **41**: 119-136.
- CORTES, M.; PÉREZ-REYES, R. & TAY, J. 1972. Ultraestructura de las formas de cultivo de um tripanosoma parasito de ranas, *Trypanosoma montezumae*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, **14**: 183-190.
- DE SOUZA, W 1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, **86**: 197- 283.
- DE SOUZA, W. & SOUTO-PADRÓN, T. 1984. The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. **Journal of Parasitology**, **66(2)**: 229-235.
- DE SOUZA, W. 1999. Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94 (1)**: 17-36
- DE SOUZA, W.; PORTO CARREIRO, I.; MIRANDA, K. & CUNHA-E-SILVA, N.L. 2000. Two special Organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, **72(3)**: 420-432.
- DE SOUZA, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, **8**: 269-285.
- DE SOUZA, W. & CUNHA-E-SILVA, N.L. 2003. Cell Fractionation of Parasitic Protozoa. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98(2)**: 151-170.
- DESSER, S.S, S.B. MCIVER & RICKMAN, A. 1973. *Culex territan* as a potencial vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. **Journal of Parasitology**, **59(2)**: 353-358.
- DESSER, S.S, S.B. MCIVER & JEZ, D. 1974. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. **Internatinal Journal for Parasitology**, **5**: 507-509.
- DESSER, S.S.1976.The ultrastructure of the epimastigote stages of *Trypanosoma rotatorium* in the leech *Batrachobdella picta*. **Canadian Journal of Zoology**, **54**: 1712-1723.
- DESSER, S.S. 1977. Ultrastructural observations on the epimastigote stages of *Trypanosoma avium* in *simulium rugglesi* . **Canadian Journal of Zoology**, **55**: 1359-1367.
- DESSER, S.S. 2001.The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of the trypanosomes. **Journal of Parasitology**, **87**: 152-160

- DIAMOND, L.S. 1950. A new trypanosome, *Trypanosoma pipientis* n. sp. From the leopard frog *Rana pipiens*. **Journal of Parasitology**, **36**: (Suppl.) 24-25.
- DIAMOND, L.S. 1965. A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. **Wildlife Diseases**, **44**: 1-85
- DO CAMPO, R; SCOTT, D.A.; VERCESI, A.E. & MORENO, S.N.J. 1995. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, **310**: 1005-1012.
- DUTTON, J. E.; TODD, J.L.; TOBEY, N.E. 1907. Concerning certain parasitic protozoa observed in Africa. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** **1**: 287-354.
- ELISEI, C.; SCOFIELD, A.; HUBER, F.; FERNANDEZ, K.R.; FORLANO, M.D.; MASSARD, C.L. 2002. Estudos preliminares da fauna hemoparasitológica em *Leptodactylus ocellatus*, Seropédica, RJ. XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, p.243.
- EWERS, W.H. 1968. Blood parasites of some New Guinea reptiles and Amphibia. **Journal of Parasitology** **54**: 172-174.
- FANTHAM, H.B., PORTER, A. & RICHARDSON, L.R. 1942. Some haematozoa observed in vertebrates in Eastern. **Parasitology**, **34**: 199-226.
- FENG, L. & CHUNG, H. 1940. *Phlebotomus squamirostris* Newstead, transmitter of *Trypanosoma bocagei* França in the toad, *Bufo bufo gargarizans* (Cantor). **Chinese Medical Journal Supplement.**, **3**: 198-211.
- FENG, L. & CHAO, C.S. 1943. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. **Chinese Medical Journal, Supplement.**, **62**: 210-217.
- FERREIRA, R.C; CAMPANER, M.; TAKATA, C.L.A.; TAKEDA, G.F. & TEIXEIRA M.M.G. 2003. Anuran trypanosomes: morphological, biological and molecular characterization of Brazilian isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45**: 162.
- FRANÇA, C. 1911. Sur la relation autogénétique entre les grands e le petits trypanosomes de la grenouille. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des ses Filiales**, **70**: 978-979.
- FRANÇA, C. 1925. Notes parasitologiques sur l'Angola. **Annales de Parasitologie**, **3(3)**: 255-262.
- FRANÇA, C. & ATHIAS, M. 1907. Sur les phénomènes de division du *Trypanosoma rotatorium*. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des ses Filiales**, **62** : 1108-1109.
- FRANÇA, C. & LAVERAN, A. 1911. Sur la relation autogénétique entre les grands et les petits trypanosomes de la grenouille. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des ses Filiales**, **70**: 978- 979.
- FROMENTIN, H. 1971. Contribution à l'étude compare des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre *Trypanosoma*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, **46(4)**: 337-445.
- GALLIARD, H.; BUTTNER, A. & BOUCART, N. 1954. Actions de la somatotropina hypophysaire et de la nutrition sur l'évolution de *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904 (souche Algérienne) chez la grenouille verte. **Annales de Parasitologie**, **29(3)**: 179-197.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C. & SILVA, A.M. 1969. Hemoparasitos de anfíbios do Brasil: alguns aspectos citológicos de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 (Protozoa, Kinetoplastida). **Atas da Sociedade de Biologia**, Rio de Janeiro, **12(5-6)**: 245.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C. & LAGRANGE, P.H. 1981. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **76(4)**: 367-381.

- GUERRERO, S. & AYALA, S.C. 1977. Hemoparásitos de algunos reptiles y anfibios de la selva amazónica del Perú. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo**, **19(5)**: 283-288.
- HALMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P. & GIBSON, W.C. 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadpsidae). **Internatinal Journal for Parasitology**, **35**:431-443.
- HOARE, C.A. 1972. **The Trypanosomes of Mammals**. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh. **749 p.**
- JACONO, I. 1938. A further contribution to the proposal of a new classification of trypanosomes. **Journal of tropical medicine and hygiene** **41 (4)**: 53-57.
- JONES, S.R.M. & WOO P.T.K. 1986. *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911 in *Rana pipiens* of southern Ontario: morphometrics and a description of the division process. **Systematic Parasitology**, **9**: 57-62.
- JONES, S.R.M.; S.R.M. & WOO P.T.K. 1989. Use of kidney impressions for the detection of trypanosomes of Anura. **Journal of Wildlife Diseases** **25 (3)**: 413-415.
- KUDO, R. 1922. On the protozoa parasitic in frogs. **Transactions of the American Microscopical Society**, **41**: 59-76.
- KUDO, R. 1969. Protozoology. **Compañia Editorial Continental, S.A. México**. 905p.
- LAIRD, M. 1951. Notes on a small collection of blood smears obtained from amphibians and reptiles in Maryland during the spring of 1950. **Journal of Parasitology**, **37**: 323-324.
- LAVERAN A. 1904. Sur um nouveau trypanosome d'une Grenouille. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **56**: 158-162.
- LAVERAN, A. & MESNIL, F.1901. Sur la structure de trypanosome des grenouilles et sur l'extension du genre *Trypanosoma* Gruby. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **53**: 678-680.
- LAURENT, M. & STEINERT, M. 1970. Electron Microscopy of Kinetoplasic DNA from *Trypanosoma mega*. **Proceedings of the National Academy of Science**, **66(2)**: 419-424.
- LEHMANN, D.L 1959. *Trypanosome boyli* n. sp. From the California yellow-legged frog, *Rana boylei*. **Transactions of the American Microscopical Society**, **78**: 370-373.
- LEHMANN, D.L. 1962. Cultures forms of *Trypanosoma ranarum* (Lankester, 1871). II Effect of temperature upon reproduction and cyclic development. **Journal of Protozoology**, **9(3)**: 325-326.
- LEHMANN, D.L. & SORSOLI, W.A. 1962. The cultural forms os *Trypanosoma ranarum* (Lankester, 1871). I. Relation between cyclic development of cultures forms, oxygen consumption in the presence of glucose, and malonate inhibition. **Journal of Protozoology**, **9(1)**: 58-60.
- LEHMANN, D.L. 1966b. Culture media for *Trypanosoma ranarum* and *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **60**: 452-454.
- LEMONS, M.; RODRIGUES, A. F. S. F.; CARVALHO, V.T.; MORAIS, D.H. & D'AGOSTO, M. 2004. Tripanosomatídeos em *Lithodytes lineatus* (Shneider, 1799) da região da Usina Hidrelétrica do Guaporé - MT. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Supl.** **13**: 232-232.

- LEWIS, J.W. & BALL, S.J. 1980. Ultrastructure of the epimastigotes of the fish trypanosome *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1883, in the crop of the leech vector, *Hemiclepsis marginata*. **Journal of Parasitology**, **66(6)**: 948-953.
- LOM, J.; PAULIN, J.J. & NOHÝNKOVÁ, E. 1980. The fine structure of the fish trypanosome, *Trypanosoma danilewskyi*: I. Presence of a cytopharyngeal complex in blood stream trypomastigotes. **Protistologica**, **3**: 365-373.
- LORENZ, P.; MAIER, A.G.; BAUMGART, E.; ERDMANN, R. & CLAYTON, C. 1998. Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. **European Molecular Biology Organization Journal**, **17 (13)**: 3542 – 3555.
- LUN, Z.R. & DESSER, S.S. 1996. Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. **Parasitology Research**, **82**: 22-27.
- MACHADO, A. 1911. Pesquisas citológicas sobre o *Trypanosoma rotatorium* Gruby. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **3**: 108-135.
- MACKERRAS, M.J. 1961. The hematozoa of Australian frogs and fish. **Australian Journal of Zoology** **9**: 123-140.
- MARCHOUX, E. & SALIMBENI, A. 1907. Un trypanosome nouveaux chez une *Hyla voisine* de *Hyla lateritriga* Spix et Agassiz. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales** **62**:592-594.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1990. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. **The Journal of Parasitology**, **37(3)**: 199-206.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1991a. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*: A light and electron microscopic study. **Parasitology Research**, **77**: 18-26
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1991b. Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. **Journal of Parasitology**, **77(3)**: 498-500
- MARTIN, D.S., DESSER, S.S. & HONG, H. 1992a. Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. **Journal of Parasitology**, **78(2)**:317-322.
- MARTIN, D.S., DESSER, S.S. & WERNER, K. 1992b. Allozyme comparison and infectivity of cultured stages of *Trypanosoma fallisi* from southern Ontario and a trypanosome of toads from northern Michigan. **Journal of Parasitology**, **78(6)**:1083-1086.
- MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R. & DESSER, S.S. 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18s rRNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, **88(3)**: 566-571.
- MASLOV D.A.; PODLIPAEV, A.S.; LUKES, J. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96(3)**: 397-402.
- MATHIS, C. 1906. Sur une modification au milieu de Novy-Mc Neal pour la culture des trypanosomes. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales**, **61**: 550-552.
- MATHIS, C. & LEGER, M. 1911a. Trypanosomes des crapauds du Tonkin. **Comptes Rendus de la**

Société de Biologie et des Ses Filiales, 70: 956-958.

MATHIS, C. & LEGER, M. 1911b. Trypanosomes des crapauds du Tonkin. **Comptes Rendus de la Société de Biologie et des Ses Filiales, 70:** 1008-09.

MATTHEWS, K.R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science, 118:** 283-290.

MEDEIROS, L. C. A. S.; MOREIRA, B. L. M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J. & BARRABIN, H. 2005. A proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Herpetomonas* sp. **Molecular and Biochemical Parasitology 140:** 175-182.

MEIRELLES, R.M.S. & SOARES, M.J. 2001. Quick fixation of eukaryotic cell suspensions for routine transmission electron microscopy. **Acta Microscopica, 10 (1):** 19-22.

MIRANDA, K.; BENCHIMOL, M.; DOCAMPO, R. & DE SOUZA, W 2000. THE FINE STRUCTURE OF ACIDOCALCISOMES IN *TRYPANOSOMA CRUZI*. **PARASITOLOGY RESEARCH, 86:** 373-384.

MIRANDA, K.; DOCAMPO, R.; GRILLO, O.; FRANZEN, A.; ATTIAS, M.; VERCESI, A.; PLATTNER, J.H. & DE SOUZA, W 2004a. Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. **Histochemistry and Cell Biology 121 (5):** 407-418.

MIRANDA, K.; RODRIGUES, C. O.; HENTCHEL, J.; VERCESI, A.; PLATTNER, H.; DE SOUZA W. & DOCAMPO, R. 2004b. Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. **Microscopy and Microanalysis 47:** 647-655.

MISRA, K.K. & CHANDRA, A.K. (1995). *Trypanosoma microhylis* n. sp. from indian anuran Amphibia, *Microhyla ornate*. **Acta Protozoologica, 34:** 303-306.

MITCHELS, P.A.M.; HANNAERT, V. & BRINGAUD, F. 2000. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. **Parasitology Today, 16 (11):** 482 – 490.

MISSET, O.; BOS, O.J.M. & OPPERDOES, F.R. 1986. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. **European Journal of Biochemistry, 157:** 441-453.

MIYATA, A. 1976. Anuran haemoprotozoa found in the vicinity of Nagazaky City. I *Trypanosoma rotatorium*. **Tropical Medicine, 18(3):**125-134.

MIYATA, A. 1978. Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryuku Islands with descriptions of six new species. **Tropical Medicine, 20:** 51-81.

MOLYNEUX, D.H. & ROBERTSON, E. 1974. Ultrastructure of the bloodstream forms of an avian trypanosome *Trypanosoma bouffardi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 68(4):** 369 -377.

NIGRELLI, R. F. 1944. Trypanosomes in North American amphibian. *Zoologica* **30:** 47-56. **Journal of Parasitology, 30:9.**

OPPERDOES F.R.; BAUDHUIN, P.; COPPENS, I.; ROE, C.; EDWARDS, S.W.; WEIJERS, P.J. & MISSET, O. 1984. Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (Microbodies) of the Protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. **The Journal Of Cell Biology 98:** 1178-1184.

OPPERDOES, F.R. & MICHELS, P.A.M. 1993. The glycosomes of the Kinetoplastida. **Biochimie, 75:** 231-234.

PACKCHANIAN, A. 1934. Scientific apparatus and laboratory methods. **Science, 80(2079):** 407-408.

- PARSONS, M.; FURUYA, T.; PAL, S. & KESSLER, P. 2001. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, **115**:19–28.
- PEREIRA, N.M.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; COLOMBO, T. & TRAVASSOS, J.M.C. 1973. Formas de cultura de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843-isolado da rã *Leptodactylus ocellatus* de Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **71**(4): 357-366.
- PÉREZ-REYES, R.; HASHIMOTO, B.Y.; MONTESINOS, C.M. & VALENCIA, L.C. 1960. Estudios sobre hematozoarios X. Algunos tripanosomas de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, **3** (4):201 – 211.
- PÉREZ-REYES R. 1968a. *Trypanosoma galba* n. sp., parasite of Mexican frogs. Morphology and cycle in the vertebrate. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica**, **10** (2): 79-84.
- PÉREZ-REYES R. 1968 b. Dos especies nuevas de tripanosomas parásitos de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica (Mex) Jan-Mar.**, **11**: 37-40.
- PÉREZ-REYES, R.1969. Ciclo de vida de *Trypanosoma montesumae* Pérez-Reyes *et al.*, 1960, un flagelado parásito de ranas con división asimétrica. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica** **11**(2): 57-60.
- PÉREZ-REYES, R.; TAY, J. & CORTÉS, M. 1976. Ultraestructura de los epimastigotes de *Trypanosoma galba*, um parasito de ranas. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica**, **18**: 47-58.
- PÉREZ-REYES, R.; BERTA, Y.H.; MONTESINOS, M.C. & VALENCIA, L.C. 1960. Estudios sobre hematozoarios X. Algunos tripanosomas de ranas mexicanas. **Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitológica**, **3**(4):201-211.
- PESSOA, S.B. 1969. Experiências de transmissão do *Trypanosoma cruzi* e de tripanosomas de vertebrados de sangue frio por triatomíneos. **Revista de Saúde Pública**, **3**: 17-20.
- PONSELLE, A. 1923a. La culture de *Trypanosoma inopinatum* trypanosome pathogène de La grenouille. **Annales de Parasitologie**, **1**(2): 155- 158.
- PONSELLE, A. 1923b. La culture dès trypanosomes et lês conditions physico-chimiques qui La determinant. **Annales de Parasitologie**, **1**(2): 181- 184.
- RAMOS, B. & URDANETA-MORALES, S. 1977. Hematophagous insects as vetctor for frog trypanosome. **Revista de Biología Tropical**, **25** (2):209-217.
- REYLLI B.O. & WOO, P.T.K. 1981. The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). **Canadian Journal of Zoology**, **60**:116-123.
- REILLY B.O. & WOO, P.T.K. 1982a. The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reylli and Woo, 1982 (Kinetoplastida). **Canadian Journal of Zoology**, **60**: 134-38.
- REILLY B.O. & WOO, P.T.K. 1982b. The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reylli and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). **Canadian Journal of Zoology**, **60**: 124-33.
- RUIZ, A. & ALFARO, M. 1958. Presencia de *Trypanosoma rotatorium* en la sangre de ranas de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, **6**(2): 241-244.

- RUIZ, F.A.; RODRIGUES, C.O.; & DOCAMPO, R. 2001. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, **276 (28)**: 26114–26121.
- SANTOS, K. C.; ABEL, I. 2005. Hemoparasitos de anfíbios anuros da Reserva do Centro de Educação Ambiental - Ecolândia de Lavras - MG. **In: VI Seminário de Pesquisa e Extensão da UEMG**, 2005, Diamantina. VI Seminário de Pesquisa e Extensão da UEMG.
- SCHWETZ, J. 1930. Notes protozoologiques les hématozoaires dès grenouilles et dès crapauds de Stanleyville (Congo Belge). **Annales de Parasitologie**, **8(2)**:122-134.
- SCORZA, J.V. & DAGERT, C.M. 1958. Sobre la sinonímia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Boletín Venezolano de Laboratorio Clínico**, **3**: 29-36.
- SIDDALL, M.E. & DESSER, S.S.1992. Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. **Journal of Parasitology**, **78(3)**: 562-563.
- SOARES, M.J. & DE SOUZA, W. 1988. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research** **77**: 461-468.
- SOUTHWORTH, G.C.; MASON, G. & SEED, J.R.1968. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24-Hours cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. **Journal of Parasitology**, **54(2)**: 255-258.
- SOUTO-PADRON, T. & DE SOUZA, W. 1982. Fine Structure and cytochemistry of peroxisomes (microbodies) in *Leptomonas samueli*. **Cell Tissue Research**, **222**: 153 – 158.
- SOUZA, C.S.F. & GONÇALVES DA COSTA, S.C. (1997). Estudo comparativo de imunomoduladores na leishmaniose tegumentar experimental. **Tese de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz**, **95p**.
- STEINERT, M. 1958. Action morphogénétique de l'urée sur le trypanosome. **Experimental Cell Research** **15**: 431-433.
- STEINERT, M. 1960. Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega*. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, **8**: 542 – 546.
- STEINERT, M. 1965. Morphogenesis versus division in *Trypanosoma mega*. **Journal of Protozoology**, **12 (2)**: 291-292
- STEINERT, M. & BONE, G.J. 1956. Induced change from culture form to bloodstream form in *Trypanosoma mega*. **Nature**, **178**: 362.
- STEINERT, M. & NOVIKOFF, A.B. 1960. The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. **Journal of Biophysical and biochemical Cytology**, **8**: 563 -569.
- STEINERT, M. & VAN ASSEL, S. 1967. The loss of kinetoplastic DNA in two species of Trypanosomatidae treated with acriflavine. **Journal of Cell Biology**, **34**: 489 – 503.
- VERCESI, A & DOCAMPO, R. 1994. Sodium-proton exchange stimulates Ca²⁺ release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal** **315**: 265-270.
- VERCESI, A, MORENO, S.N. & DOCAMPO, R. 1996. Inhibition of Ca²⁺ release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Biochemical Journal** **315**: 265-270

- VERMELHO, A. B.; HOGGE, L. & BARRETO-BERGTER, E. 1986. Isolation and characterization of a neutral glycosphingolipid from the epimastigote form of a *Trypanosoma mega*. **Journal of Protozoology**, **33** (2): 208-213.
- VICKERMAN, K. 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, **5**: 163-193.
- VUCETICH, M. & GIACOBBE, O. 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. **Annales de Instituto de Medicina Regional**, **2**: 225-244.
- WALLACE, F.G. 1956. Cultivation of *Trypanosoma ranarum* on a liquid medium. **Journal of Protozoology**, **3**: 47-49.
- WERNER, J.K. 1993. Blood parasites of amphibians from Sichuan province, people's Republic of China. **Journal of Parasitology**, **79** (3): 356-363.
- WERNER, J.K. & WALEWSKI, K. 1976. Amphibian trypanosomes from the McCormick forest, Michigan. **The Journal of Parasitology**, **62**(1): 20-25.
- WOO P.T.K. 1969a. The development of *Trypanosoma canadensis* of *Rana pipiens* in *Placobdella* sp. **Canadian Journal of Zoology**, **47**:1257-1259.
- WOO P.T.K. 1969b. Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, **17**: 981-988.
- WOO, P.T.K. 1969c. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, **47**:921-923.
- WOO, P.T.K. 1983. Sensivity of diagnostic techniques in determining the prevalence of anuran trypanosomes. **Journal of Wildlife Diseases** **19** (1): 24-26.
- WOO, P.T.K. & BOGART, J.P. 1983. *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distributions and prevalences. **Canadian Journal of Zoology**, **62**:820-824.
- ZICKUS, T. 2002. The first data of the fauna and distribution of the blood parasites of amphibians in Lithuania. **Acta Zoologica Lituanica**, **12**(2): 197-202.