UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Ocorrência de hemoparasitas do Gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Denise Dutra Menezes Leal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biologia Geral e aplicada.

BOTUCATU-SP
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Ocorrência de hemoparasitas do Gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Mestranda: Denise Dutra Menezes Leal

Orientadora: Lucia Helena O'Dwyer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biologia Geral e aplicada.

BOTUCATU-SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Leal, Denise Dutra Menezes.
Ocorrência de hemoparasitas dos Gêneros *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul / Denise Dutra Menezes Leal. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.
Orientadora: Lúcia Helena O'Dwyer
Assunto CAPES: 21300003

1. Anuro - Doenças 2. Parasitologia 3. Doenças parasitárias em animais 4. Anfíbio - Parasito - Brasil
CDD 597.80981

Palavras-chave: Anuros; hemogregarina; Hemoparasitas; *Trypanosoma*

Dedicatórias

Dedico os meus irmãos, a minha mãe, ao meu pai (in memorian) e a Inácio Bianchi pelo grande apoio que me deram.

"O importante é ....sermos capazes, a qualquer momento, de sacrificar o que somos pelo o que poderíamos vir a ser." (Charles Dubois)

Agradecimentos

Agradecimentos

- À minha orientadora Lucia Helena O'Dwyer a ao Prof. Dr. Reinaldo José da Silva pelo incentivo e compreensão quando precisei.

- A Profa. Dra.Vanda Lúcia Ferreira pela ajuda na coleta de anuros no Pantanal.

- Aos técnicos e secretária (Nilza) do Departamento de Parasitologia, pela amizade e carinho.

- Aos colegas e amigos da sala de estudos do Departamento pela ajuda e amizade. Em especial a Karina Santos, Tatiana, Betina, Elen, Giane.

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução geral..... 02
1.1. Hemogregarinas..... 03
1.1.1. Relatos de Hemogregarinas de anuros no mundo..... 04
2. Gênero *Trypanossoma*..... 05
Referências bibliográficas..... 15

Artigo 1: Ocorrência de hemoparasitas do Gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.....22
Resumo..... 23
Abstract..... 24
Introdução..... 25
Material e Métodos..... 27
Resultados..... 28
Discussão 40
Referências bibliográficas..... 43

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, tem-se notado um crescente interesse no melhor entendimento das doenças e das causas de mortalidade que atingem a vida selvagem. As principais razões deste interesse seriam a preocupação com a saúde animal, principalmente naquelas espécies ameaçadas de extinção; o interesse em zoonoses que podem ser transmitidas ao ser humano pelos animais silvestres; o uso de animais silvestres pelos ecologistas para monitoramento ambiental de poluição; e o interesse veterinário, não só para o próprio benefício da vida selvagem, mas porque estes animais podem agir como reservatórios de infecções para animais de fazenda e de estimação (Simpson, 2000).

Anfíbio é a designação dos membros da Classe Amphibia, que inclui as salamandras (Ordem Caudata), as cobras-cegas (Ordem Gymnophiona), e sapos, rãs e pererecas (Ordem Anura). Os anfíbios ocupam uma posição inferior na cadeia alimentar e quando abundantes são extremamente importantes no fluxo de energia, particularmente em terras úmidas (pântanos), florestas tropicais e ecossistemas aquáticos. São animais vulneráveis a várias substâncias químicas despejadas no ambiente, a alterações do ecossistema e também, são suscetíveis a inúmeros agentes infecciosos (Orchard, 1999). A destruição de seu habitat possui um fator importante na vida do animal, pois são afetados severamente por este problema (Sala et al., 2000). Desde 1989, sabe-se que as populações destes animais são prejudicadas por outros fatores ainda pouco estudados, mesmo em áreas não degradadas (Blaustein & Wake, 1990; Reaser, 1996; Silvano & Sergala, 2005), o que justifica seu estudo.

Desde a década de 1960 até hoje, foram descritas 313 espécies de anfíbios. No Brasil, nos últimos 10 anos já foram descobertas 97 novas espécies. Na avaliação mundial de diversidade destes animais o Brasil sai na frente com 765 espécies distribuídas em 3 ordens, 13 famílias e 98 gêneros. Somente anuros totalizam 737 espécies (Silvano & Segalla, 2005).

Para Barta & Desser (1984), os anuros, por viverem em habitats terrestres e aquáticos, são expostos a diversos vetores hematófagos e conseqüentemente ocupam uma posição ideal para adquirir parasitas sangüíneos intra e extracelulares, incluindo vírus, riquétsias, protozoários, leveduras e microfilárias (Desser, 2001). Entre os parasitas sangüíneos descritos nestes animais, já foram relatados protozoários do gênero *Trypanosoma*, e também, do grupo das hemogregarinas (Tabela I). Em relação a esses hemoparasitas, existe uma grande dificuldade em se estabelecer as espécies e muito pouco se sabe a respeito do seu ciclo biológico. No Brasil, só foi encontrado um relato de freqüência de hemogregarinas em anuros (Souza & Borriello Filho, 1974) e nenhum, de *Trypanosoma.*

1.1. Hemogregarinas

O termo hemogregarina é usado para descrever coletivamente parasitas sangüíneos pertencentes à subordem Adeleorina do Filo Apicomplexa (Jakes et al., 2003). Os principais gêneros deste grupo são *Hepatozoon* (família Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (família Haemogregarinidae).

Historicamente, parasitas sangüíneos de anfíbios, serpentes, lagartos, crocodilianos, aves e mamíferos foram incluídos no gênero *Haemogregarina,* como resultado da similaridade morfológica de gamontes entre hemogregarinas de diferentes gêneros (Smith, 1996). Espécies de *Haemogregarina* não podem ser distinguidas de *Hepatozoon* tendo como base somente a aparência de seus gamontes intraerictrocíticos e merontes hepáticos. A identificação genérica é dependente da natureza do desenvolvimento esporogônico no vetor (Desser et al., 1995). As espécies de *Hepatozoon* contêm oocistos com vários esporocistos no artrópode vetor e são transmitidas aos vertebrados pela ingestão do invertebrado infectado. Para o gênero *Haemogregarina*, os oocistos não possuem esporocistos e a transmissão é feita pela inoculação de esporozoítas via saliva (Desser, 1993).

Em anuros, foram descritas 15 espécies de *Haemogregarina* e uma espécie de *Hepatozoon* (Levine, 1988). As descrições dos parasitas encontrados nestes animais geralmente se basearam na aparência e dimensões dos gamontes intraeritrocíticos. Como os vetores e desenvolvimento esporogônico são desconhecidos para hemogregarinas de sapos, fica impossível determinar o gênero correto destes parasitas (Desser et al., 1995). O quadro ficou mais confuso com a descoberta de uma nova hemogregarina em sapos brasileiros (Petit et al., 1990).

Aproximadamente uma dúzia de espécies de hemogregarinas foi descrita em rãs, na África, Ásia e Europa (Levine, 1988; Desser, 2001). A maioria das descrições das espécies de *Hepatozoon* é baseada somente nos estágios sangüíneos e pouco do ciclo de vida tem sido elucidado (Desser, 1993). O modo de transmissão destes parasitas nunca foi esclarecido. Nenhum dos vetores e nem o desenvolvimento esporogônico das hemogregarinas de rãs é conhecido, com exceção do *Hepatozoon leptodactyli* de rãs brasileiras do gênero *Lepytodactylus* (Desser et al., 1995).

Espécies de *Hepatozoon* que infectam anuros são caracterizadas por possuírem oocistos grandes contendo vários esporocistos nas células dos túbulos de Malpighi de um

mosquito vetor. A transmissão para um hospedeiro vertebrado ocorre através da ingestão do vetor infectado (Desser et al., 1995; Smith, 1996).

Foi demonstrado por Desser et al. (1995) que *Culex territans*, um mosquito que se alimenta de anfíbios em Ontário, serve como hospedeiro definitivo e vetor de *Hepatozoon castebianae* em *Rana catesbeiana* (rã touro). O desenvolvimento esporogônico de *H. catesbianae*, descrito no túbulo de Malpighi do inseto, revelou que o parasita era uma espécie de *Hepatozoon* e não de *Haemogregarina.* Resultados experimentais de transmissão de reação cruzada obtida pelos autores sugerem que o parasita pode ser específico para rãs touros. A infecção de *H. catesbianae* se inicia quando as rãs ingerem os mosquitos *C. territans* que se alimentaram de outras rãs infectadas (Hayes, 1961; Murphey et al., 1967); segundo os autores, foi comum observar uma aglomeração destes invertebrados ao redor de rãs que se aqueciam ao sol.

O hemoparasita *Hepatozoon* é comum em rãs (Ranidae) e sapos (Bufonidade) em todo o mundo. Há pouco ou nenhum registro de hemogregarinas em pererecas (Hylidae), sugerindo que um habitat arbóreo não é ideal para o estabelecimento de relacionamento entre vetor-parasita (Smith, 1996).

1.1.1. Relatos de hemogregarinas de anuros no mundo

Fantham et al. (1942) descreveram um hemoparasita no sangue de *Bufo americanus* em Quebec, parecido com uma espécie de *Hepatozoon*, que foi chamado erroneamente de *Plasmodium.*

Também foram registrados no Egito por Mohamed & Mansour (1963,1966 a,b,c) quatro diferentes espécies de hemogregarinas (*Haemogregarina aegpytia, Haemogregrina faiyumensis, Haemogregarina pestanae* e *Haemogregarina boueti*) em sapos da espécie *Bufo regularis*. Dos 689 sapos examinados 210 estavam infectados por *H. boueti*. Destas infecções 84 eram puras enquanto que o restante era de infecções mistas. Formas jovens de *Hepatozoon* no sangue periférico e formas em desenvolvimento no fígado foram observadas, isto ocorreu tanto em animais capturados nos meses quentes como nos meses frios do ano. O hemoparasita *H. pestanae* foi encontrado em apenas em um indivíduo. A infecção era pura e com alta carga parasitária e possuía vários estágios de desenvolvimento do parasito. Dentre as várias regiões do Egito em que estes animais foram capturados, *H. faiyumensis* foi vista em três animais dos 13 capturados em uma localidade específica. Destes três animais, um possuía infecção pura e nos outros dois infecções mistas como, *H. boueti* e *H. aegyptia.*

Hassan (1992) também descreveu outro parasita no sangue de *B. regularis* denominado de *Hepatozoon magni*.

No estudo feito com rãs da Costa Rica, encontrou-se gamontes de duas espécies de *Hepatozoon*. Os gamontes encontrados na espécie *Rana forreri* eram menores do que os gamontes obeservados em *Rana vaillanti* e que também ocupavam uma posição diferente dentro dos vacúolos parasitóforos. Já as duas espécies de *Hepatozoon* (*H. clamate* e *H. catesbianae*) registradas em *Rana catesbeiana* e *R. clamitans* em Ontário (Barta & Desser, 1984) apresentavam gamontes morfologicamente indistingüíveis, mas, com efeito citopatológico no núcleo do eritrócito bem diferente. *Rana catesbeiana* e *R. clamitans* foram suscetíveis à infecção experimental com ambas espécies de *Hepatozoon* (Kim et al., 1998; Desser, 2001).

Em um outro experimento conduzido por Smith et al. (2000) em Ontário, observou-se multiplicação assexuada de *Hepatozoon clamatae* e *H. catesbianae* nos eritrócitos de rãs (*Rana clamitans melanota, R. catesbeiana* e *R. pipiens*). Este foi o primeiro caso documentado de estágio esporogônico de *Hepatozoon* em hemácias de um vertebrado.

No Brasil, Souza & Borriello Filho (1974), examinaram 100 sapos das espécies *Bufo marinus*, *B. crucifer* e *Melanophryniscus moreirae* no período de agosto de 1963 a janeiro de 1974. Neste experimento, apenas a espécie *B. crucifer* estava parasitada por hemogregarinas intraeritrocíticas, que foram denominadas grandes, pequenas e médias. As hemácias tinham dimensões normais, porém o núcleo poderia estar deslocado. Não houve semelhança entre a hemogregarina encontrada neste hospedeiro com outras já descritas no mundo. Os autores acreditaram que este achado poderia ser o primeiro relato do parasita neste indivíduo. Os pesquisadores procuraram na época manter cautela em relação ao gênero *Haemogregarina*, pois eles só tinham conhecimento do estágio sangüíneo do parasita e nenhum conhecimento do ciclo de vida.

2. GÊNERO *TRYPANOSOMA*

Existe pouco material recente a respeito de tripanossomas em anuros, além da falta de uma descrição detalhada provando que a espécie encontrada corresponde a achados feitos por outros pesquisadores. A literatura é algumas vezes muito antiga e cheia de incertezas. Ainda hoje, se discute se somente os aspectos morfológicos são suficientes para denominar uma espécie. A dificuldade está no problema em diferenciar as fases do *Trypanosoma*, por este

possuir um grande polimorfismo (Bardsley & Harmsen, 1973; Barta et al., 1989; Werner, 1993; Martin et al., 2002; Žičhus, 2002).

Embora *Trypanosoma* sp. seja declarado um hemoparasita comum entre anfíbios, não se encontraram relatos a respeito destes parasitas sangüíneos no Brasil.

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas digenéticos, cujo ciclo biológico envolve dois hospedeiros. São flagelados pertencentes à família Trypanosomatidae que têm como característica a presença de flagelo e cinetoplasto. Este é o gênero de hemoparasitas mais freqüentemente observado em anfíbios (Barta & Desser, 1984).

De acordo com Bardsley & Harmsen (1973), muitos que estudaram estes hemoflagelados não detectaram sinais de reprodução, especialmente em sangue periférico de rãs ou em outros órgãos do animal. A ausência de reprodução do flagelado em rãs adultas levou alguns pesquisadores a postularem que não havia reprodução do hemoparasita nestes animais. Os altos níveis de infecção seriam através da reinoculação do vetor. Apesar disso, outros pesquisadores registraram vários tipos de divisão em anuros.

A fissão binária foi registrada como sendo o principal modo de reprodução em *T. ranarum, T. lavalia, T. gaumontis, T. montrealis, T. rotatorium, T. clamatae* e *T. montezumae*. As combinações de fissões binárias e múltiplas de outros tripanossomas, também foram vistas em diferentes estágios do ciclo de vida do hospedeiro vertebrado (Bardsley & Harmsen, 1973).

Segundo Martin et al. (2002), tradicionalmente, as descrições de todas as espécies de *Trypanosoma* são baseadas em aspectos morfológicos das formas tripomastigotas observadas na circulação sangüínea. As diversas espécies podem diferir no tamanho e forma do corpo, na posição do núcleo e do cinetoplasto, bem como no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo. Os parâmetros morfométricos analisados são o comprimento corporal, incluindo flagelo livre, comprimento do flagelo livre, distância do cinetoplasto em relação à extremidade posterior e ao núcleo, dimensões nucleares e sua distância das extremidades anterior e posterior. Tais descrições, para a maioria das espécies, são freqüentemente confundidas pela extrema variabilidade morfológica, pela ocorrência de espécies morfologicamente idênticas em diferentes hospedeiros no mundo, pela ausência de descrição de um ciclo de vida completo e dados do hospedeiro específico, ou a probabilidade que diferentes espécies contenham estágios evolutivos parecidos.

Devido a todos estes problemas de classificação, Werner (1993) e Žičhus (2002) sugeriram que estudos moleculares e morfológicos destes tripanossomas sejam realizados para que ocorra a correta classificação de suas espécies.

A espécie de *Trypanosoma* mais descrita e estudada no mundo é o *Trypanosoma rotatorium.* Esta espécie já foi descrita em vários continentes tendo como característica o polimorfismo, sendo este, portanto, o motivo pelo o qual o parasita muitas vezes é classificado erroneamente como outra espécie. Para Bardsley & Harmsen (1973), o principal aspecto de classificação de *T. rotatorium* seria de uma espécie que é encontrada no mundo todo, que é muito complexa, e que possui agregados originados do mesmo ancestral comum. E estes agregados contem características pouco acentuadas que os levem a denominá-los como espécies distintas. Na época, um ou dois destes agregados foram reconhecidos como espécies separadas, *T. pipientis* e *T. ranarum*, descritos por Diamond (1965) em Minnesota.

Já Werner (1993) disse que o parasita *T. rotatorium* possui um pequeno tripomastigota com um núcleo alongado, ao invés de um grande tripomastigota com o núcleo redondo, historicamente sustentado por França & Athias (1906), Diamond (1965) e Miyata (1978) e Barta et al. (1989). O tamanho pequeno e a forma do parasita corresponderam à primeira descrição da espécie feita por Mayer (1843).

Mayer (1843) publicou uma nova espécie de *Trypanosoma*, erroneamente, como sendo *Paramecium loricatum* devido a seu corpo largo. Desta nova espécie, Laveran & Mesnil (1912) observaram duas formas distintas do parasita, denominando-os como *Amoeba rotatorium* e *Paramecium loricatum.* Na época, pesquisadores europeus verificaram que os parasitas descritos eram do gênero *Trypanosoma* e passaram a chamar de *T. rotatorium* a combinação das duas espécies descritas por Laveran & Mesnil (1912), *Amoeba rotatorium* – corpo curto, flagelo longo, e *Paramecium loricatum* – corpo largo e flagelo ausente. Kudo (1922) também descreveu, na América do Norte, um tripanossoma que se parecia com o europeu, e por isso também recebeu o nome de *T. rotatorium*.

Há agora evidências que o *T. rotatorium* descrito por Mayer (1843) não é a mesma espécie norte americana descrita por Kudo (1922). Segundo o autor, o parasita assemelha-se ao *T. loricatum*, mas existe opinião contrária a esta questão, como a de Barta et al. (1989) que questionaram a diversidade genética de *T. loricatum* em relação ao *T. rotatorium;* além disso, o *T. rotatorium* sensu Kudo (1922) também é parecido com *T. miyagii* (Miyata, 1978) encontrado em ranídeos no Japão (Werner, 1993).

Noller (1913 e 1917), afirmou que tripanossomas de anuros podem ter pouca especificidade para o hospedeiro, dessa forma, *T. rotatorium* pode infectar numerosas espécies de rãs. Outra parasita que foi encontrado parasitando sapos e rãs é o *T. inopinatum,* que também tem ampla distribuição em várias espécies de anuros.

Segundo Kudo (1922), os tripanossomas são mais numerosos em vasos de órgãos, como fígado e especialmente rim, do que em sangue periférico ou sangue de coração. O pesquisador estudou o parasito *T. rotatorium* no sangue de rãs (*R. clamitans*). A morfologia do parasito era polimórfica, possuindo formas largas e alongadas, misturadas com formas intermediárias. Depois de algum tempo, alguns flagelados assumiam formas arredondadas. A maior parte tinha a extremidade mais ou menos afilada; o flagelo corria ao longo da margem da membrana ondulante, estendendo-se da região anterior do corpo. O cinetoplasto e núcleo podiam ser vistos em indivíduos ativamente móveis; o citoplasma era granulado, podendo conter espaços próximos à margem posterior do corpo e em muitos indivíduos estrias longitudinais foram vistas. A forma do cinetoplasto era oval ou alongada, próximo à ponta da região posterior final do corpo. O núcleo era arredondado e estava próximo ao cinetoplasto. Segundo Kudo (1922) o tripanossoma, depois de perder o seu flagelo, torna-se arredondado e sofre divisão ativa, produzindo numerosos organismos pequenos e arredondados. Cada corpo formado tinha o seu inicio ovóide e depois adquiria o formato de pêra, da região final mais arredondada formava-se um flagelo. Estas formas jovens eram ativas e livres e se dividiam por fissão longitudinal, aumentando em número (Kudo, 1922).

Kudo (1922) encontrou no sangue de *R. clamitans, Trypanosoma parvum.* Foram examinados 14 animais entre julho e setembro de 1920. O corpo do parasita era fino e geralmente curvo em formato de arco ou "S". A região posterior final era afilada com a extremidade arredondada. Já a extremidade anterior final era mais pontiaguda. O citoplasma era geralmente denso da região anterior ao meio do corpo, na qual uma área clara era vista na região posterior ao núcleo. O cinetoplasto estava localizado muito próximo à ponta final do corpo, sendo relativamente largo ou alongado. O flagelo que se iniciava do lado externo da membrana ondulante, não foi visto originar-se do cinetoplasto, mas de uma região próxima a ele. O núcleo era largo e estava localizado entre o meio e o terço anterior do corpo, o formato era esférico ou oval. No sangue destes animais também estava presente em menor número, *T. rotatorium,* mas nenhuma hemogregarina foi vista.

Fantham et al. (1942) em Quebec, descreveram novas espécies de *Trypanosoma*: *T. gaumontis*, *T. lavalia* e *T. montrealis* em *Bufo americanus*. De acordo com Barta & Desser (1984) nenhuma das três espécies de *Trypanosoma* descritas por Fantham et al. (1942) foram encontradas em sapos examinados em áreas próximas aos achados originais.

Diamond (1950), examinou 45 rãs (*R. pipiens*) coletadas próximas a Minneapolis/Minnesota, encontrando um tripanossoma (*T. pipientis*) não patogênico e monomórfico nestes animais. O corpo do parasita era alongado, delgado, afilado e com a

extremidade pontiaguda; o citoplasma possuía grânulos finos e também era estriado com delicados mionemas; o cinetoplasto era proeminente e a membrana ondulante pouco desenvolvida. O mesmo *Trypanosoma* foi visto em uma das sete rãs adultas De acordo com o pesquisador. o vetor natural deste parasita é a sanguessuga *Placobdella phalera*.

Lehmann (1959), no verão de 1958, coletou nove rãs da espécie *Rana b. boyli* (Baird, 1854) na região da Califórnia. Em quatro animais foram vistos tripanossomas que ele denominou de *T. boyli*. Foi a primeira espécie de tripanossoma de anuros a ser descrita na costa oeste do Estados Unidos. A característica do parasita era de uma forma moderadamente larga; a membrana ondulante era bem desenvolvida; o núcleo oval; a membrana nuclear estava presente em metade dos indivíduos e possuía um endosomo de forma e tamanho variável. O cinetoplasto apresentava formato arredondado; não havia flagelo; o axonema iniciava-se próximo ao cinetoplasto e acompanhava a região mais larga do corpo. Mionemas, em número de quatro ou cinco, também apareceram no citoplasma. O posicionamento central do cinetoplasto diferencia este parasita de outros como *T. guamontis, T. lavalia, T. montrealis, T. pipientis* e *T. parvum*. Havia uma tendência entre os pesquisadores da época a classificarem todos os tripanossomas encontrados em rãs como sendo *T. rotatorium*. Segundo Lehman (1959), *T. rotatorium* aparece em rãs adultas e apresenta-se de várias formas, como longos; estreitos; circulares e ovais. As formas largas de *T.rotatorium* não podem ser comparadas a *T. boyli*, pois geralmente não possuem mionemas; o núcleo tem a forma alongada e compacta, estendendo-se do centro do corpo ao cinetoplasto localizado posteriormente e o flagelo livre tem uma extensão considerável.

Mathews e Zaentz (1963) e Lee (1963 a,b) encontraram em rãs altos níveis de açúcar no sangue quando expostas a altas temperaturas. Por conseqüência, um aumento da parasitemia de tripanossomas ocorreu no sangue periférico.

Diamond (1965), observou em *R. pipiens* que a maior parte dos tripanossomas (*T. schmidti*) presentes no sangue periférico sofreram lise no 17ª dia de infecção. Foi sugerido por ele que talvez o animal tenha produzido anticorpos contra o parasita.

Southworth et al. (1968), em Louisiana, coletaram 196 *Rana clamitans* em Louisiana, nos meses de agosto e setembro de 1966 e junho e julho de 1967 e demonstraram que *T. rotatorium* tem uma peridiocidade diurna em anfíbios. Durante a manhã os parasitas foram encontrados na circulação periférica e durante a noite, a maior parte deles estava nas vísceras. Bardsley & Harmsen (1969), em experimento com *R. catesbeiana*, constataram que a presença de *T. rotatorium* estava diretamente influenciada pela temperatura e pela atividade do hospedeiro, ou seja, quando a temperatura e atividade do animal estavam altas, o parasita

migrava para a circulação periférica. Este fato os levou a suspeitar que o vetor do *T. rotatorium* pode não ser aquático, devido ao hábito de muitas espécies de rãs saírem da água para aquecer-se ao sol, quando a parasitemia podia estar alta. Portanto, o parasita podia estar mais disponível aos dípteros hematófagos do que as sanguessugas.

A temperatura é muito importante na fisiologia de anuros e esta tem um papel indireto na parasitemia, além de outros fatores ambientais e da resposta imune do hospedeiro (Bardsley & Harmsen 1973).

Woo (1969) tentou transmitir *T. chrysemydis* (específico de tartarugas), para *R. pipiens* e não obteve sucesso. De acordo com o pesquisador esta falha na infecção pode indicar uma resistência natural ou imunidade adquirida de uma infecção anterior.

Ayala (1970), na California, descreveu uma nova espécie de *Trypanosoma* parasitando animais de sangue frio. Os flagelados foram diagnosticados em cinco dos 32 *Bufo boreas halophilus* e em um de sete sapos da mesma espécie examinados em 1967, e foram nomeados *T. bufophlebotomi*. Quatro espécies descritas, três parasitando *B. americanus* em Quebec, na América do Norte (*T. lavalia, T. guamontis* e *T. montrealis*) e *T. rotatorium* na Carolina do Norte, foram consideradas morfologicamente distintas de *T. bufophlebotomi.*

Em pesquisas na Venezuela, Ramos & Urdaneta-Morales (1977) conseguiram transmitir experimentalmente *T. rotatorium*, utilizando *Aedes aegypti* que havia se alimentado de anuros com alta parasitemia, para os seguintes hospedeiros: *Colostethus trinitatis* (rã), *Hyla crepitans, Lepytodacylus insularum*, *L. macrosternum*, *L. sibilatrix* e *Pseudis paradoxus.* Entretanto, a transmissão para *B. marinus* não foi bem sucedida. De acordo com os autores, os tripanossomas encontrados eram muito grandes, foliáceos e com movimento rotatório típico de *T. rotatorium*. Alguns dos flagelados eram longos e delgados, e outros tinham uma forma intermediária; este polimorfismo foi indicado como característica da espécie (Scorza & Dagert, 1958).

Nas ilhas de Kyushu e Ryukyu (Japão), foram capturadas 10 espécies de rãs. Os tripanossomas encontrados foram: *T. nagasakiense* em *Hyla arborea japonica* de Nagasaki; *T. rotatorium* (Mayer, 1843) em *R. rugosa* e *R. nigromaculata* de Nagasaki e em *Rhacophorus japonicus* de Okinawa; *T. loricatum* em *R. narina* e *R. holsti* de Okinawa e em *R. nigromaculata* de Nagasaki; *T. ishigakiense* em *R. limnocharis limnocharis* de Ishigaki; *T. miyagii* em *R. namiyei*, *R. narina*, *R. holsti* e *R. ishikawe* de Okinawa e em *R. subaspera* de Amami; *T. tsukamotoi* em *R. namiyei* de Okinawa; *T. rugosae* em girinos de *R .rugosa* de Nagasaki, *R. limnocaris limnocharis* de Ishigaki. Outros tripanossomas foram observados e possuíam a morfologia aparentemente diferente destes citados acima. Na época, Miyata

(1978) não soube determinar se estas espécies encontradas eram novas ou representavam variáveis de espécies conhecidas.

Em anuros a distribuição geográfica de tripanossomas algumas vezes é muita extensa em algumas espécies ou muito restrita. Por exemplo: *T. rotatorium, T chattoni, T. loricatum* e *T. tsunezomiyatai* podem ser encontrados em várias partes do mundo. Enquanto que *T. miyagii, T. tsukamotoi, T. ishigakiense* e *T. nagasakiense* são de uma área limitada do Japão. A especificidade de hospedeiros em anuros também pode ser limitada para algumas espécies de tripanossoma ou mais ampla para outras espécies. Segundo o autor, as rãs positivas para tripanossoma geralmente estavam parasitadas por mais de uma espécie do parasita. Além disso, *Dactylosoma* foi também encontrado no mesmo animal (Miyata, 1978).

Em um estudo realizado no Canadá, três espécies de *Trypanosoma* foram descritas em anfíbios. Uma delas, *T. rotatorium* (Mayer, 1843) foi encontrada em espécies aquáticas de *Rana.* A outra espécie, menor, *Trypanosoma pipientis* (Diamond, 1950), foi diagnosticada somente em dois exemplares de *Rana septentrionales.* Já o *T. ranarum* foi encontrado no sangue de *B. americanus* e em todas as espécies examinadas de *Rana,* exceto *R. setentrionales* (Barta & Desser, 1984).

Woo & Bogart (1984), coletaram 275 pererecas no oeste da América do Norte das espécies, *Pseudacris triserita*, *Hyla crucifer*, *H. versicolor*, *H. chrysocelis* e *H. avivoca*. Dos 275 animais examinados, 46 estavam infectados com quatro espécies de tripanossomas. Os tripanossomas encontrados foram identificados através da observação de tripomastigota no sangue do vertebrado, sendo que *T. andersoni*, *T. grylli* e *T. pipientis* foram confirmados pela inoculação das espécies em hospedeiro suscetível. Também foram vista infecções mistas em três rãs das 46 infectadas pelo hemoparasita. Nos animais positivos foram encontrados os seguintes tripanossomas: *T. andersoni* e *T. grylli* em *H. versicolor* e *H. avivoca* de Ohio e *H. chrysocelis* da Carolina do Sul; *T. pipientis* em *P. triserita*, *H. crucifer* e *H. versicolor* de Ontário. Foi observado também em *H. versicolor*, *T. ranarum* que é típico de *Rana* .

Werner et al (1988), coletaram 201 sapos americanos (*B. americanus*), de 1982 a 1987, na região leste de Michigan. Cinqüenta e quatro sapos estavam infectados com *T. bufophlebotomi*, 33 sapos com *T. schmidti-like* sp. e três sapos com *T. pseudopodia*. Outros sete indivíduos estavam infectados com um pequeno tripanossoma similar a *T. pipientis*. Provavelmente, esta pequena forma representa um estágio do desenvolvimento de *T. schmidti*. Dos sete sapos infectados, quatro deles tinham a forma grande de *T. schmidti* e verificou-se a similaridade de núcleo-cinetoplasto entre as duas formas de tripomastigota. Das infecções cruzadas realizadas pelos autores entre sapos (*B. americanus*) e rãs (família Ranidae), foi

demonstrado que nenhum dos cinco sapos inoculados com *T. ranarum* iniciaram a infecção e nenhum dos quatro girinos de *R. catesbeiana* inoculados com *T. bufophlebotomi* infectaram-se. Entretanto, a inoculação de ambos tripanossomas entre indivíduos de mesma espécie ou de espécie similar iniciou a infecção. Verificou-se, através de infecções experimentais, que *T. bufophlebotomi* encontrado em sapos desta região não é o *T. ranarum* encontrado em ranídeos. *Trypanosoma ranarum* tem duas formas tripomastigotas (tipo I e tipo II) (Diamond, 1965). *Trypanosoma bufophlebotomi* demonstra similaridade com a forma tipo I, mas difere em alguns aspectos. Neste estudo, os pesquisadores não encontraram a forma do tipo II nos 201 sapos examinados, mas encontraram em ranídeos. Para Woo & Bogart (1984), *T. ranarum* é um parasita comum de rãs da família Ranidae e Hylidae na região leste da América do Norte.

Na Província de Sichuan (China) foram examinados 246 anfíbios de abril a junho de 1990 e seis espécies de tripanossomas foram encontradas, sendo que duas não foram identificadas. O parasita *T. rotatorium* foi visto em *R. limnocharis* e *R. nigromaculata*; *T. chattoni* e *T. rotatorium*-like com a prevalência de 52% e 24%, respectivamente e estavam infectando *B. gargazians*. Esferomastigotas similares a *T. tsunezomiyatai* foram observadas em *R. limnocharis* com a prevalência de 38%. Além destes resultados, foi observado pelo autor que a diferença de altitude onde habitavam os animais influenciavam na quantidade de parasitas. Em regiões de altitude de 500 a 1000m a prevalência de parasitas foram de 91% em *R. nigromaculata*, 60% em *R. limnocharis* e 62% em *B. gargazians*; em montanhas geladas acima de 1800m a prevalência foi de 50% em *Leptobrachium boringii* e 20% em *Rana boulengeri*, e em terras montanhosas acima de 3000m os animais *Batrachuperus karlschmidti*, *Bufo tibetanus*, *Nanorana pleskei*, *R. chensinensis*, *Scutiger boulengeri* e *Scutiger tuberculatus* apresentaram resultado negativo para parasitas (Werner,1993).

Na Costa Rica, os parasitas mais encontrados no sangue de anuros são tripanossomas (Desser, 2001), fato constatado em quatro de sete espécies amostradas. Em *Rana vaillanti* encontrou-se nove tripanossomas morfologicamente distintos, sendo que cinco espécies de tripanossomas foram achadas em hospedeiros aquáticos. Dos oito tipos de tripanossomas observados em anuros, somente dois eram suficientemente diferentes para serem designados como espécies: *T chattoni* e *T. loricatum*. Embora estas espécies sejam cosmopolitas em distribuição, diferenças morfométricas e outras diferenças têm sido registradas entre formas de populações isoladas geograficamente de mesma espécie de rã e entre diferentes espécies de hospedeiro (Diamond, 1965; Woo, 1969; Bardsley & Harmsen, 1973; Miyata, 1978; Barta & Desser, 1984).

Žičhus (2002) realizou pela primeira vez na Lituânia um estudo sobre hemoparasitas em anuros. Segundo o autor, não havia trabalhos desta natureza feitos na região e nem em estados Bálticos vizinhos. O pesquisador coletou 152 espécimes de anuros (*R. sculenta-lessonae, R. temporaria, B. bufo* e *B. viridis*) em nove localidades da Lituânia, no período de junho a outubro de 1998 a 2000. Ele encontrou somente tripanossomas parasitando estes animais, que caracterizou como sendo do complexo *T. rotatorium*. Diferentes formas do tripanossoma parasitavam o sangue dos animais, que ele determinou como forma I, II, III e IV. Na forma I a parte final do corpo era obtusa, enquanto que nas outras formas era pontiaguda e estreita; o flagelo era livre e a membrana ondulante visível. Na forma II, o corpo do parasita era largo e arredondado, o flagelo livre não estava visível e a membrana ondulante estava somente na região final do corpo. Na forma III, o corpo do parasita era pontiagudo e a largura era mais o menos a mesma em todas as partes; o núcleo e a membrana ondulante não eram bem visíveis enquanto o flagelo mostrava-se claramente visível. Na forma IV, a região final do corpo era pontiaguda, a região anterior era maior do que a região posterior, o flagelo e a membrana eram visíveis com núcleo nítido (Žičhus, 2002). O autor verificou que a infecção foi mais alta em *R. sculenta-lessonae* (65,1%) do que em *R. temporaria*. Fato que pode ser atribuído, talvez, à diferença de habitat destes animais ou, também, à densidade de vetores.

Segundo Mackenzie (1999), a abundância de parasitos é um bom bioindicador de poluição química, pois existe uma relação direta e positiva com a quantidade de ectoparasitos e inversa com os endoparasitos. Muitos destes parasitos são extremamente sensíveis às variações ambientais, tendo assim a sua transmissão afetada por estes fatores.

Silva et al. (2005), em sua pesquisa com *T. humboldti* em *Schroederichthys chilensis* (tubarão gato), verificou que o número de endoparasitos diminuiu com a contaminação, e a de ectoparasitos aumentou. Os produtos tóxicos romperiam a membrana do tripanossoma, produzindo dano nuclear, podendo afetar alguma etapa do desenvolvimento do parasito.

Barrow (1953) demonstrou que sanguessugas (*Batrachobdella picta*) infectadas por *T. diemyctyli* (parasita de tartarugas) perdiam a infecção quando passavam muito tempo sem se alimentar.

Woo (1969), baseado no estudo de Barrow, examinou a longevidade de *T. chrysemydis* (parasita encontrado em tartarugas) em *Chrysemys picta marginata* (sanguessuga e vetor natural do parasita). A perda de infecção foi observada quando as sanguessugas ficavam longos períodos sem se alimentar de sangue; provavelmente estes vetores na natureza retêm a infecção pela vida toda quando se alimentam regularmente.

Segundo Desser et al. (1975) sanguessugas foram consideradas vetores de *Trypanosoma*, embora haja evidências que dípteros também façam este papel. Espécies de *Phlebotomus* mostraram serem vetores de tripanossomas em rãs na china (Feng & Chao, 1943) e na Califórnia (Ayala, 1971). Os experimentos conduzidos por Desser et al. (1975) na tentativa de infectar experimentalmente *R. pipiens* com *T. rotatorium*, utilizando o mosquito *Culex territans* como vetor, falharam. Segundo os autores, isto aconteceu talvez pelo fato de o mosquito alimentar-se somente de *R. clamitans.*

Nos experimentos de Barta & Desser (1984), os ectoparasitas encontrados em anfíbios foram sanguessugas (*Batracobdella picta*), observadas tanto em girinos quanto em adultos de *R. clamitans, R. catesbeiana* e *R. setentrionales.* A freqüência de parasitas sangüíneos em anfíbios aquáticos foi bem maior do que nas espécies terrestres (*Hyla crucifer, B. americanus, R. sylvatica* e *Plethodon Cinereus*).

Do exposto verificamos que há grande interesse dos parasitologistas em relação aos hemoparasitas de anfíbios e há ainda na literatura muitas incertezas sobre a identificação destes parasitas. Há de se ressaltar também que no Brasil estes estudos são escassos e assim, pesquisas nesta linha contribuirão sobremaneira para o conhecimento destes protozoários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

AYALA , S.C. Two new trypanosomes from California Toads and Lizards. **J. Protozool.,** v.17, n. 3, p. 370-373, 1970.

AYALA, S.C. Trypanosomes in wild California sandflies and extrinsic stages in *Trypanosoma bufophlebotomi*. **J. Protozool.,** v.18, p. 433-436, 1971.

BARDSLEY, J.E.; HARMSEN, R. Trypanosomes of Ranidae. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). **Can. J. Zool.,** v. 47, p. 283-288, 1969.

BARDSLEY, J.E.; HARMSEN, R., The trypanosomes of anura. In: Dawes, B. (ed.). **Advances in parasitology.** London: Academic Press, 1973. v.7, p.1-73.

BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **J. Wildl. Dis.,** v. 20, n. 3, p.180-189, 1984.

BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern north american ranids in the context of host phylogeny. **Trans. Am. Microsp. Soc**., v.108, p.6-20, 1989.

BARROW, J.H. JR. the biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batracobdellla picta* (Verril). **Trans. Amer. Microsc. Soc**., v.72, p. 197-216, 1953.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. Declining amphibian populations: a global phenomenon? **Trends Ecol. Evol.**, v.5, p.203, 1990.

DESSER, S.S.; MCLVER, S.B.; JEZ, D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. **Int. J. Parasitol.,** v. 5, p. 50-59, 1975.

DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: J.P. Kreier (ed.). **Parasitic protozoa**, New york : Academic Press, p. 247-272, 1993.

DESSER, S.S.; HONG, H.; MARTIN, D.S. The life history,ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbianae* n. comb., an apicomplexan parasite od the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algoquin Park, Ontário. **J. Parasitol.**, v.81, n.2, p. 212-222, 1995.

DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **J. Parasitol.**, v.87, n.1, p.152-160, 2001.

DIAMOND, L.S. A new species of trypanosome, *Trypanosoma pipientis* n. sp., from leopard frog, *Rana pipiens*. **J. Parasitol**., v. 36, p. 24-25, 1950.

DIAMOND, L.S. Study of the morfology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. **Wildl. Dis**., v.44, p.1-77, 1965.

FANTHAM, H.B.; PORTER, A.; RICHARDSON, L.R. Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. **Parasitology,** v. 34, p. 199-226, 1942.

FENG, L.S.; CHAO, C.S. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris.* **Chin. Med. J.,** v.62, p. 210-217, 1943.

FRANÇA, C.; ATHIAS, M. Recherches sur les trypanomes des amphibiens. I. Les trypanosomes de la *Rana esculenta*. **Arch. de Inst. Bacteriol. (camara pestana),** v.1, p.127-165, 1906.

HASSAN, I.M. On haemogregarine parasites of the toad *Bufo regularis* in Qena Governorate, upper Egypt with description of a new species, *Haemogregarina magni*. **Invertebr. Parasitol.,** v. 9, p. 379-385, 1992.

HAYES, R.O. Host preferences of *Culiseta melanura* and allied mosquitoes. **Mosq. News,** v.21, p.179-187, 1961.

JAKES, K.; O'DONOGHUE, P.J.; CAMERON, S.L. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (Haemogregarina) *boigae*, *Hepatozoon* sp., *Haemogregarina clelandi* and *Haemoproteus chelodina* form Australian reptilies to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. **Parasitol. ,** v.126, p.555-559, 2003.

KIM, B.; SMITH, T.G.; DESSER, S.S. The life history and host specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) and ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frogs and mosquitoes from Ontario. **J. Parasitol.,** v. 84, n. 4, p. 789-797, 1998.

KUDO, R. On the protozoa parasitic in frogs. **Trans. Am. Microsc. Soc.,** v.40, p.59-76, 1922.

LAVERAN, A.; MESNILL, F. **Trypanosomes et trypanosomiases**. Paris: Masson, 1912. p.861-870.

LEE, H. Carbohydrate metabolism of the frog. I. The blood sugar of the frog in summer. **J. Chosen med. Ass.,** v.26, n.5, p.451-459, 1936a.

LEE, H. IV. Blood sugar content of the frog in autumn. **J. Chosen med. Ass.,** v.26, n.6, p.499-504, 1936b.

LEHMAN, D.L. *Trypanosoma boyli,* n. sp. from the Califórnia red-legged frog, *Rana b. boyli*. **Trans. Am. Micros. Soc.** v.78, p. 370-373, 1959.

LEVINE, N.D. **The protozoan phylum apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press, Florida, 1988. p.115-134,

MACKENZIE, K. Parasites as pollution indicators in marine ecosystems a proposed early warning system. **Mar. Poll. Bull**. , v. 38, n.11, p.955-959, 1999.

MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant trypanosomes *Trypanosoma chanttoni, Trypanosoma fallisi, Trypanosoma mega, Trypanosoma neveulemairei, and Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **J. Parasitol.,** v. 88, n. 3, p. 566-571, 2002.

MATHEWS, S.A; ZAENTZ, S.D. The effect of epinephrine on blood glucose in *Rana pipiens*. **Am. Zool.,** v.3, n.4, p. 549-550, 1963.

MAYER, A.F.J.K. **Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in Raiis anelectricis et de haemotozois.** Bonnae: Caroli Georgii, 1843. p.18.

MIYATA, A. Anuran trypanosomes in Kyushu and Rhyukyu island, with descriptions of six new species. **Trop. Med**., v.20, p.51-80, 1978.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. *Haemogregarina aegyptia* sp. nov. from Africa toads (*Bufo regularis*) and its relationship to *Haemogregarina tunisiensis* Nicolle, 1904. **Proc. Zool. Soc.,** v. 1, p. 33-46, 1963.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. Development of *Haemogregarina boueti* in the toad *Bufo regularis*. **J. Protozool.,** v.13, p. 259-264, 1966a.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. *Haemogregarina faiyumensis* n. sp. in the toad *Bufo regularis* in Egypt. **J. Protozool.**, v. 13, p. 269-271, 1966b.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. Development of *Haemogregarina pestanae* in the toad *Bufo regularis.* **J. Protozool.,** v. 13, p. 265-269, 1966c.

MURPHEY, F.J.; BURBUTIS, P.P.; BRAY, D.Y. Bionomics of *Culex salinarius* and other mosquito species. **Mosq. News,** v.27, p.366-374, 1967.

NÖLLER, W. Die blutprotozoen des wasser-frosches und ihre Uebertragung. I. Teil. **Arch. Protistenk**, v.31, p. 169-240, 1913.

NÖLLER, W. Blut- und insektenflagellatenzüchtung auf platen. **Arch. Schiffs. Trop. Hyg**., v.21, p. 53-94, 1917.

ORCHARD, S. A. The Gordian knots of the international declining amphibian populations task force (DAPTF). In: CAMPBELL, A. (Ed). **Declines and disappearances of Australian frogs.** Camberra Environment Australia, 1999. p.9-13.

PETIT, G.; LANDAU, I.; BACCAM, D.; LAINSON, R. Description et cycle biologique d' *Hemolivia stellata* n.g., sp., hémogrégarine de crapauds Brésiliens. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.,** V. 65, n.1, p. 3-15, 1990.

RAMOS, B.; URDANETA-MORALES, S. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. **Rev. Biol. Trop.,** v. 25, n. 2, p. 209-217, 1977.

REASER, J.K. The elucidation of amphibian declines: are amphibian populations disappering? **Amph. Rept. Conserv**., v.1, p.4-9, 1996.

SALA, O.E. et al. Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science, v.287, p. 1770-1774, 2000.

SCORZA, J.V.; DAGERT, C. Sobre la sinonimia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Bol. Venez. Lab. Clin.,** v.3, p.29-36, 1958.

SILVA, V.; VALENZUELA, A.; RUIZ, P.; OYARZÚN, C. *Trypanosoma humboldti* en *Schroederichthys chilensis* (Cohodrichthyes, Elasmoranchii, Scyliorhinidae) como indicador no destructivo de contaminacion. **Gayana**, v.69, n.1, p.160-165, 2005.

SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.79-86, 2005.

SIMPSON, V.R. Veterinary advances in the investigations of wildlife diseases in Britain. **Res. Vet. Sci**., v.69, p.11-16, 2000.

SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **J. Parasitol**., v.82, p.565-585, 1996.

SMITH, T. G.; KIM, B.; HONG, H.; DESSER, S.S. Intraerythrocytic development of species of *Hepatozoon* infecting ranid frogs: evidence for convergence of life cycle characteristics among apicomplexans. **J. Parasitol.,** v.86, n.3, p.451-458, 2000.

SOUTHWORTH, G.C.; MASON, G.; SEED, I.R. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24 hour cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Lousiana. **J. Parasitol.,** v. 54, p. 255-258, 1968.

SOUZA, M.A.; BORRIELLO FILHO, A. Uma nova hemogregrina no sangue de *Bufo crucifer* WIED, 1821 do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,** v.72, n.3/4, p.275-282, 1974.

WERNER, J.K.; DAVIS, J.S.; SLAGHT, K.S. Trypanosomes of *Bufo americanus* from northern Michigan. **J. Wildl. Dis.,** v.24, n.4, p.647-649, 1988.

WERNER, J. K. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. **J. Parasitol.,** v. 79, n. 3, p. 356-363, 1993.

WOO, P.T.K. The life cycle of *trypanosoma chrysemydis.* **Can. J. Zool.,** v.47, p.1139-1151, 1969.

WOO, P.T.K.; BOGART, J.P. *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distributions and prevalences. **Can. J. Zool.,** v.62, p.820-824, 1984.

ŽIČHUS, T. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lituania. **Acta Zool. Lituanica,** v.12, n.2, p.197-202, 2002.

[1] Referências apresentadas segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas.**NBR 6023**: Informação e documentação-Referências-Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serious sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996.468p.

Artigo I: *Ocorrência de hemoparasitas do Gênero Trypanosoma (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul*

Ocorrência de hemoparasitas do Gênero *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Denise Dutra Menezes Leal[1]✉, Reinaldo José da Silva[2], Vanda Lúcia Ferreira[3]
Lucia Helena O'Dwyer[2]

[1]Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. Email: lealdenise@yahoo.com.br

[2]Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

[3] Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

RESUMO

Os animais silvestres estão expostos a inúmeros patógenos, dentre eles estão os hemoparasitas. Podem-se destacar espécies do gênero *Trypanosoma* e do grupo das hemogregarinas, que ocorrem com freqüência parasitando anuros (rãs, pererecas e sapos). Normalmente, a descrição destes hemoparasitas é feita através da morfologia dos estágios observados no sangue periférico do hospedeiro e as pesquisas sobre o ciclo biológico desses hemoparasitas são escassas. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença de hemogregarinas e *Trypanosoma* spp. em anuros capturados nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul e fazer a caracterização morfológica e morfométrica dos seus hemoparasitas. As espécies de anuros examinadas foram: *Dendropsophus nanus*, *D. minutus*, *Leptodactylus chaquensis*, *L. podicipinus*, *L. labyrinthicus, L. fuscus*, *Bufo granulosus*, *B. schneideri*, *Phyllomedusa hypocondrialis*, *Trachicephalus venulosus, Scinax fuscovarius e Hypsiboas albopunctatus*. Dos 40 animais estudados, foram encontrados quatro (10%) positivos para hemogregarinas e oito (20%) positivos para *Trypanosoma* spp. Foram observados gamontes de hemogregarinas com morfologia variável e, além das formas intra-eritrocíticas, também foram observados gamontes fora das hemácias, o que é incomum no sangue de hospedeiros vertebrados. As formas de *Trypanossoma* encontradas eram muito polimórficas, como descrito na literatura, sendo na sua maioria, larga e oval. Porém, os parasitas observados apresentavam outras diferenças morfológicas entre eles como presença ou não de cinetoplasto, presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante, e em alguns parasitos foram observadas estrias no citoplasma. Não foi possível caracterizarmos as espécies de *Trypanosoma*, pois, não foi possível saber se as diferentes formas encontradas representam realmente espécies diferentes ou diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie.

Palavras-chave: Anuros, hemogregarinas, *Trypanosoma*, hemoparasitas.

ABSTRACT

Wild animals are exposed to endless number of pathogen, among them are the hemoparasites. *Trypanosoma* genus and hemogregarines group species can be evidenced frequently as anuran (frogs, tree frogs and toads) parasites. Usually, the identification of these hemoparasites is made through its morphology stages observation in the peripheral blood of the host and studies based on the biological cycle of these hemoparasites are scarce. The objective of the present study was to evaluate the presence of hemogregarines and *Trypanosoma* spp. in anurans captured in the São Paulo and Mato Grosso do Sul states and to perform the morphologic and morphometric characterization of these hemoparasites. The examined species of anurans had been: *Dendropsophus nanus*, *D. minutus*, *Leptodactylus chaquensis*, *L. podicipinus*, *L. labyrinthicus*, *L. fuscus*, *Bufo granulosus*, *B. schneideri*, *Phyllomedusa hypocondrialis*, *Trachicephalus venulosus*, *Scinax fuscovarius* and *Hypsiboas albopunctatus*. From the total of the 40 studied animals, four (10%) were positive for hemogregarines and eight (20%) were positive for *Trypanosoma* spp. The hemogregarines gamonts presented with variable morphology and, beyond the intraerythrocytic forms, had been also observed gamonts ouside of the erythrocytes, what is uncommon in vertebrate hosts blood. There were found very different forms of *Trypanosoma*, as described in literature, being the wide and oval form the more common ones. The parasites presented morphologic differences between them as presence or not of kinetoplast, presence or not of free flagellum and undulating membrane, and in some parasites striae in the cytoplasm had been also observed. It was not possible to characterize the species of *Trypanosoma*, because it was not possible to know if the different found forms really represented different species or different stage periods of the same species.

Key-words: Anurans, hemogregarines, *Trypanosoma*, hemoparasites

INTRODUÇÃO

Entre os hemoparasitas descritos em anuros já foram relatados protozoários do gênero *Trypanosoma* e do grupo das hemogregarinas. Existe na literatura uma grande dificuldade em designar o nome das espécies dos parasitas encontrados nestes animais, pois faltam dados biológicos e de caracterização molecular.

O termo hemogregarina é usado para descrever coletivamente parasitas sangüíneos pertencentes à subordem Adeleorina, Filo Apicomplexa (Jakes et al., 2003). Os principais gêneros deste grupo são *Hepatozoon* (família Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (família Haemogregarinidae). A distinção entre os gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon* geralmente é feita através da observação do estágio esporogônico do parasita no vetor. Grande parte das descrições é feita baseada somente nos estágios sanguíneos no hospedeiro e pouco do ciclo biológico das espécies foi elucidado. A única espécie bem caracterizada é *Hepatazoon catesbianae*, parasita de *Rana catesbeiana*, onde se observou, além das formas no vertebrado, o desenvolvimento esporogônico nos túbulos de Malpighi do inseto vetor (Desser et al., 1995). Mesmo com toda a dificuldade de caracterização das espécies, ainda sim, foi relado na literatura que *Hepatozoon* spp. é comum em rãs (Ranidae) e sapos (Bufonidae), não havendo, entretanto, nenhum registro em pererecas (Hylidae) (Smith 1996). Na literatura foram encontradas descrições de três espécies de *Hepatozoon* e quatro de *Haemogregarina* em sapos, e três espécies de *Hepatozoon* em rãs (Tabela I.). No Brasil existe apenas um relato de hemogregarina que foi observada em sapo (*Bufo crucifer*) (Souza & Borriello Filho 1974).

O gênero *Trypanosoma* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae. Em relação a este gênero a dificuldade de classificação é ainda maior, pois nada foi registrado a respeito do ciclo de vida do parasita. O grande polimorfismo deste gênero faz com que o mesmo parasita receba diferentes nomes. Um bom representante desta dificuldade de classificação é o *T. rotatorium*, que é o parasita mais estudado e, ainda sim, é confundido com outras espécies encontradas. A sua característica principal seria a grande variação morfológica e a sua habilidade em infectar numerosas espécies de rãs (Noller 1913 e 1917, Kudo 1922, Lehmann 1959, Scorza & Dagert 1958, Ramos & Urdaneta-Morales 1977). Segundo o que foi descrito na literatura, *Trypanosoma* spp. são afetados por fatores extrínsecos como temperatura,

maturidade e densidade da população de hospedeiros e também pela poluição ambiental (Bardsley & Harmsen 1973, Mackenzie 1999, Silva et al. 2005).

Quanto aos transmissores de *Trypanosoma* spp. ainda não se tem uma identificação correta, mas os possíveis vetores para anfíbios, segundo descrições, são dípteros hematófagos e sanguessugas (Barrow 1953, Woo, 1969, Desser et al. 1975). Espécies de *Phlebotomus* mostraram ser vetores deste gênero em rãs na China (Feng & Chao 1943) e na Califórnia (Ayala 1971). Foram descritas 11 espécies de *Trypanosoma* em rãs; seis espécies descritas em pererecas e oito espécies descritas em sapos (Tabela I.). No Brasil, não foi encontrado nenhum relato da presença desse gênero parasitando anuros.

Ainda há uma grande necessidade em se conhecer os hemoparasitas que acometem anuros, já que se sabe que estes animais estão em processo de extinção e são extremamente sensíveis a alterações ambientais (Silvano & Segalla 2005). Para tanto, serão necessários estudos moleculares e biológicos para a correta classificação destes parasitas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 40 exemplares de anfíbios procedentes do Estado de São Paulo (Botucatu, Fartura e Chavantes) e Estado do Mato Grosso do Sul (Pantanal/Corumbá). O período de captura dos animais foi de outubro a novembro de 2005 e outubro a novembro de 2006. As espécies estudadas compreendem a Família Hylidae (nome popular: perereca), Família Leptodactilidae (nome popular: rã) e Família Bufonidae (nome popular: sapo).

Após a coleta manual foi realizada a contenção do animal e, então, coletou-se sangue por punção cardíaca. Confeccionaram-se esfregaços sangüíneos que foram posteriormente fixados em metanol por 3 minutos e corados com Giemsa (10%) por 30 minutos. Os esfregaços sangüíneos corados foram examinados em microscópio óptico, aumento de 1000x, para o diagnóstico de hemoparasitas.

Os parasitas encontrados foram analisados em um sistema computadorizado de análise de imagem (Lite Qwin 3.01 – Leica). As variáveis analisadas para hemogregarinas foram: Área (AP), Comprimento (CP) e largura do parasita (LP); Área (ANP), comprimento (CNP) e largura do núcleo do parasita (LNP). Para o gênero *Trypanosoma* foram analisadas: Área (AP), Comprimento (CP) e largura do parasita (LP); Distância da porção mais larga do parasita mais a membrana ondulante (L-MO); Área do núcleo (ANP); Distância da região anterior final do parasita ao meio do núcleo (A-N); Distância da região posterior final do parasita ao meio do núcleo (P-N); Distância do cinetoplasto a região anterior do parasita (K-A); Distância do cinetoplasto a região posterior do parasito (K-P); Distância do cinetoplasto ao meio do núcleo (K-N); Distância do cinetoplasto a porção final do núcleo($K\text{-}N_p$); Distância do parasita com o flagelo livre (D-F); Comprimento da membrana ondulante (CMO) e Comprimento do flagelo livre (CF).

RESULTADOS

Dentre os 40 animais examinados, apenas quatro animais (10%) foram positivos para hemogregarinas, enquanto que para *Trypanosoma spp.* oito (20%) dos animais foram positivos (Tabela II). As espécies de anuros coletadas, a procedência, o sexo e a positividade, para ambos os grupos de parasitas, estão na Tabela II.

As hemogregarinas diagnosticadas neste trabalho, na sua grande maioria, apresentaram-se dentro das hemácias. Foram observados gamontes com morfologia variável como, por exemplo, algumas formas eram largas, outras estreitas e alongadas ou, às vezes, apresentavam o aspecto de "gota". A posição do núcleo na célula podia ser central ou deslocada. O citoplasma do parasita variou de eusinofílico a basofílico. A cromatina do núcleo algumas vezes estava condensada e em outras vezes se mostrou mais frouxa ou esparsa. Algumas vezes, foi observado o deslocamento do núcleo da hemácia pelo parasita (Figs. 1, 2, 3 e 4). Observou –se, também, uma forma bem pequena do parasita, na qual o núcleo ocupava a posição central e a cromatina estava condensada. Neste caso, não ocorreu o deslocamento do núcleo da hemácia pelo parasita (Fig. 5). Apenas uma forma extra-eritrocítica foi observada, a qual continha o núcleo localizado centralmente, a cromatina era frouxa e o citoplasma eusinofílico (Fig.3c). As medidas detalhadas de cada hemogregarina diagnosticada e seus respectivos hospedeiros encontram-se na Tabela III.

No gênero *Trypanosoma* foram observadas formas extremamente variáveis entre si, as quais tinham o aspecto oval, alongado ou afilado. Alguns parasitas apresentavam as extremidades arredondadas na região anterior ao cinetoplasto e afiladas na região posterior ao cinetoplasto (Fig.6 e Fig.12) Algumas vezes observou-se a presença de estrias na superfície do corpo do parasita (Fig. 7B, 8A e 9B). O núcleo, quando presente, possuía o formato que variava de redondo a alongado. O cinetoplasto, quando estava visível, podia se situar anteriormente, posteriormente ou na região do núcleo. A membrana ondulante, quando presente, podia se estender por todo o corpo do parasita, somente até a metade do corpo ou podia estar apenas na extremidade do *Trypanosoma* sp. O flagelo, quando presente, possuía dimensões que variaram de curto a longo (Fig.6, 9, 11 e 13). As medidas detalhadas de cada forma encontrada e seus respectivos hospedeiros encontram-se na Tabela IV.

Devido à falta de dados mais completos na literatura, apesar de algumas formas serem semelhantes às já descritas, pequenas diferenças morfológicas não permitiram que as espécies de *Trypanosoma* fossem nomeadas.

Tabela I. Relatos da ocorrência de hemogregarinas e *Trypanosoma* spp. em anuros.

Hospedeiro	Autor	Denominação	Procedência
	Kudo (1922)	*Trypanosoma rotatorium, T. parvum*	América do Norte
Rana clamitans	Bardsley & Harmsen (1969)	*T. rotatorium*	-
	Southworth et al. (1968)	*T. rotatorium*	Louisiana
Sapo (*)	Fantham et al. (1942)	*T. guamontis, T. lavalia, T. montrealis*	Canadá
Bufo americanus	Fantham et al. (1942)	*Hepatozoon* sp.	-
Rana pipiens	Diamond (1950)	*T.pipientis*	Sant Louis
Bufo regularis	Mohamed & Mansur (1963, 1966a,b,c)	*Haemogregarina aegyptia*, *H. boueti*, *H. pestanae* e *H. faiyumensis*	Egito
	Diamond (1965)	*T. schmidti*	-
Rana boyli boyli	Lehmann (1959)	*T. rotatorium*	California
-	Galliard et al. (1953)	*T. inopinatum*	-
Bufo boreas halophilus	Ayala (1970)	*T. bufophlebotomi*	California
Colostethus trinitatis, Hyla Crepitans,	Ramos & Urdaneta	*T. rotatorium*	Venezuela
Leptodactylus insularum, Leptodactylus	Morales (1977)	*T. rotatorium*	Venezuela
Macrosternum, Leptodactylus sibilatrix,	Ramos & Urdaneta	*T. rotatorium*	Venezuela
Pseudis Paradoxus	Morales (1977)	*T. rotatorium*	Venezuela
	Ramos & Urdaneta	*T. rotatorium*	Venezuela
	Morales (1977)	*T. rotatorium*	Venezuela
Hyla arborea japónica	Miyata (1978)	*T. nagasakiense*	Nagasaki (Japão)
		T. rotatorium	
Rana rugosa	Miyata (1978)	*T. rugosae*	Nagasaki (Japão)
Rana nigromaculata	Miyata (1978)	*T. rugosae*	Okinawa (Japão)
Rhacophorus japonicus	Miyata (1978)	*T. rugosae*	Okinawa (Japão
Rana narina	Miyata (1978)	*T. miyagii*	Okinawa (Japão
Rana holsti	Miyata (1978)	*T. miyagii*	Nagasaki (Japão)
Rana. *nigromaculata*	Miyata (1978)	*T. miyagii*	Ishigaki (Japão)
Rana. *limnocharis limnocharis*	Miyata (1978)	*T. miyagii*	Okinawa (Japão)
Rana *namiyei*	Miyata (1978)	*T. ishigakiense e T. rugosae*	Okinawa (Japão
Rana. *ishikawe*	Miyata (1978)	*T. ishigakiense. e T. rugosae*	Amami (Japão)
Rana. subaspera	Miyata (1978)	*T. miyagii*	Amami (Japão
		T. tsukamotoi	
Rana *clamitans*	Barta & Desser (1984)	*Hepatozoon clamatae*	Canadá
Rana (espécie aquática),	Barta & Desser (1984)	*T. rotatorium*	Canadá
Rana *setentrionales*	Barta & Desser (1984)	*T. rotatorium*	Canadá
		T. pipientis	Canadá
Bufo americanus	Barta & Desser (1984)	*T. ranarum*	
Rana sp.			Canadá
Hyla versicolor, Hyla avivoca, Hyla	Woo & Bogart (1984)	*T. andersoni e T. grylli*	Ohio
chrysocelis, Pseudacris triserita, Hyla	Woo & Bogart (1984)		
crucifer	Woo & Bogart (1984)		
	Woo & Bogart (1984)		
	Woo & Bogart (1984)	*T. pipientis e T. ranarum*	Carolina do Sul
Hyla versicolor			
Bufo americanus	Werner et al. (1988)	*T. bufophlebotomi, T. schmidti-like sp., T. pseudopodia*	Michigan
Bufo regularis	Hassan (1992)	*Hepatozoon magni*	-
Rana. limnocharis e *Rana Nigromaculata.*	Werner (1993)	*T. rotatorium*	China
Bufo gargazians	Werner (1993)	*T. chattoni, T. rotatorium like.*	China
Rana limnocharis	Werner (1993)	*T. tsunezomiyatai*	China
Rana catesbianae	Kim et al. (1998)	*Hepatozoon. catesbeiana*	Canadá
Rana pipiens	Smith et al. (2000)	*H. clamatae e H. catesbeiana*	Canadá
Rana forreri e Rana vaillanti	Desser (2001)	*Hepatozoon sp.*	Costa Rica
Rana esculenta-lessonae, *Rana temporária*, *Bufo bufo* e *Bufo viridis*.	Žičhus (2002)	*T. rotatorium*	Lithuania

a) (*) não se sabe a espécie.

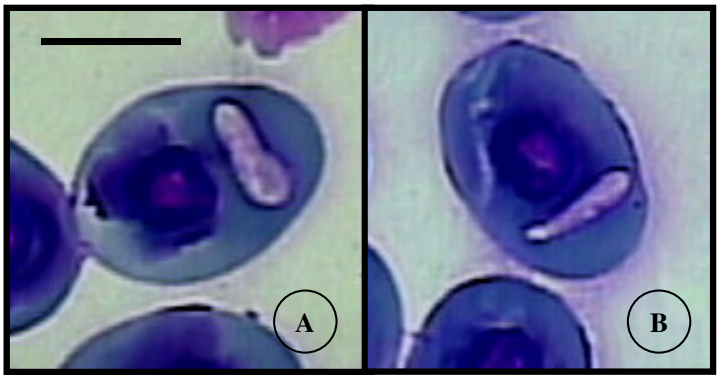

Fig. 1 (A,B): Gamontes de hemogregarinas observados em *Bufo schneideri,* capturado no Estado de São Paulo. Coloração Giemsa. Bar =10µm.

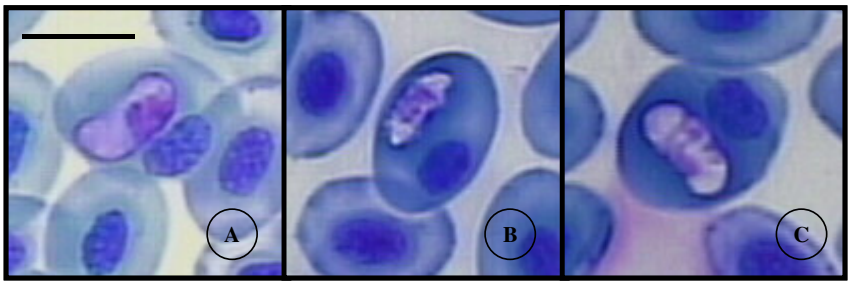

Fig. 2 (A,B,C): Gamontes de hemogregarinas observados em *Leptodactylus* chaquensis, capturado no Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa.
Bar =10µm.

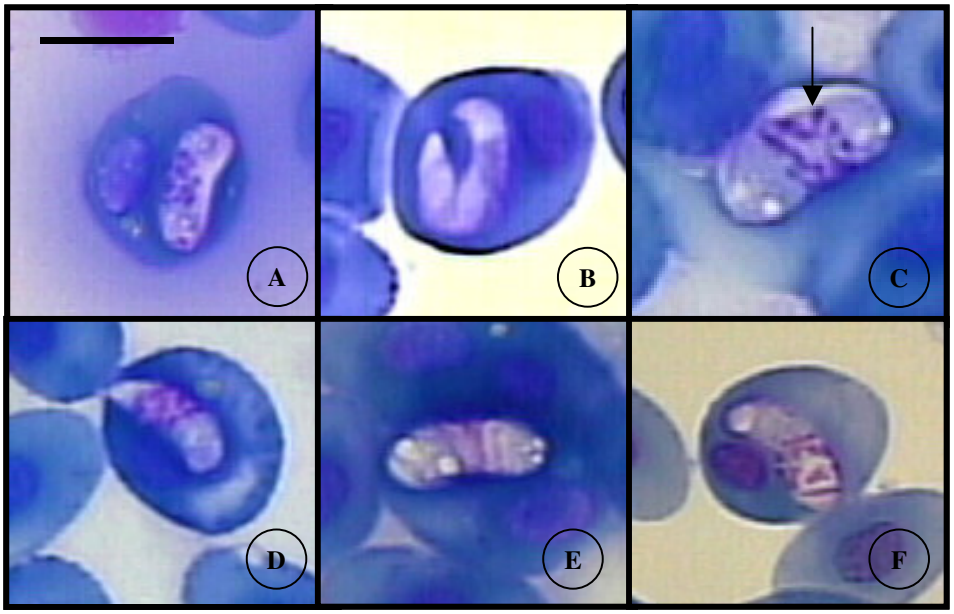

Fig. 3 (A,B,C,D,E,F): Gamontes de hemogregarinas observados em *Leptodactylus podicipinus*, capturado no Estado do Mato Grosso do Sul. Em destaque hemogregrina extra-erítrocitica (seta). Coloração Giemsa. Bar =10µm.

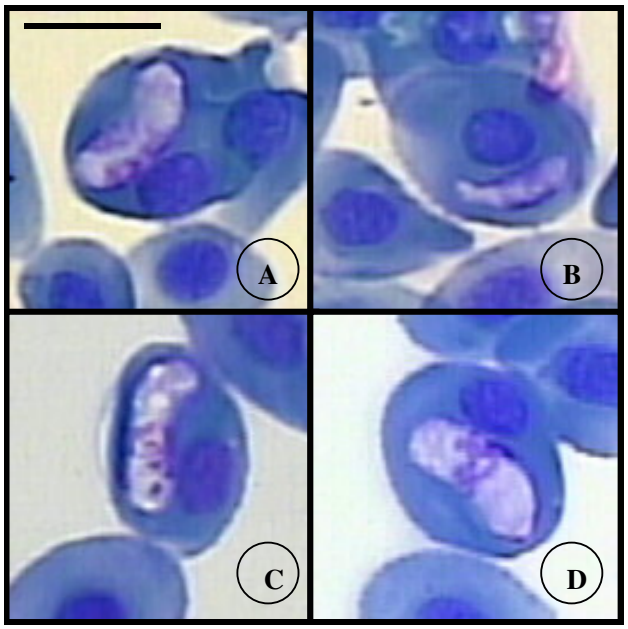

Fig. 4 (A,B,C,D): Gamontes de hemogregarinas observados em *Leptodactylus podicipinus*, capturado no Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa. Bar =10µm.

Fig. 5: Gamontes de hemogregarina observado em *Phyllomedusa hypocondrialis* , capturado no Estado do Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa. Bar =10µm.

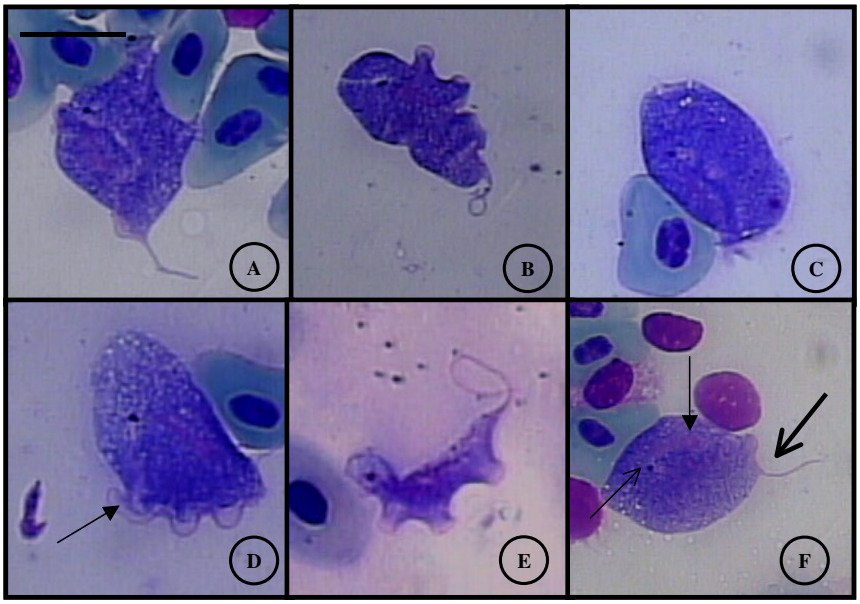

Fig. 6 (A,B,C,D,E,F): Formas de *Trypanosoma* observadas em *Dendropsophus minutus*, capturado no Estado de São Paulo. Fig.6D: Membrana ondulante (seta); Fig.6F: cinetoplasto (seta vazada), núcleo (seta cheia), flagelo (seta grossa vazada). Coloração Giemsa. Bar = 10µm

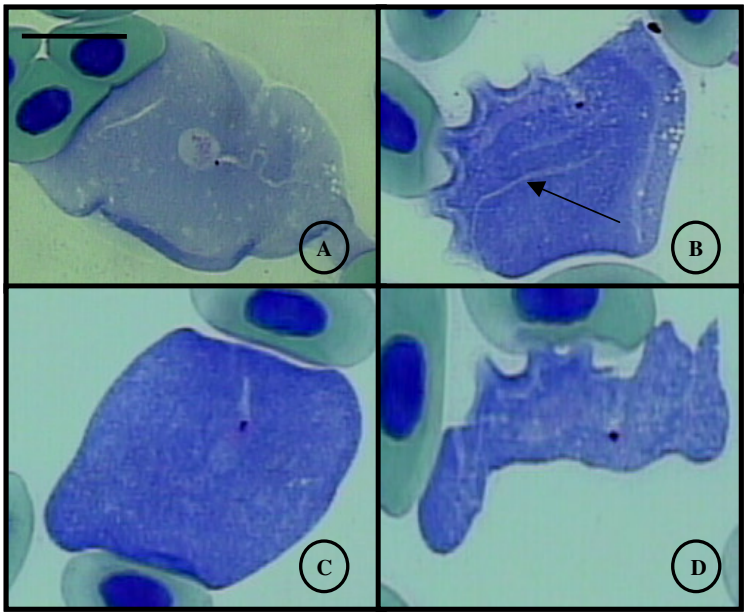

Fig. 7 (A,B,C,D): Formas de *Trypanosoma* observadas em *Hypsiboas albopunctatus,* capturado no Estado de São Paulo. Fig. 7B: estrias (Seta) Coloração Giemsa. Bar = 10µm.

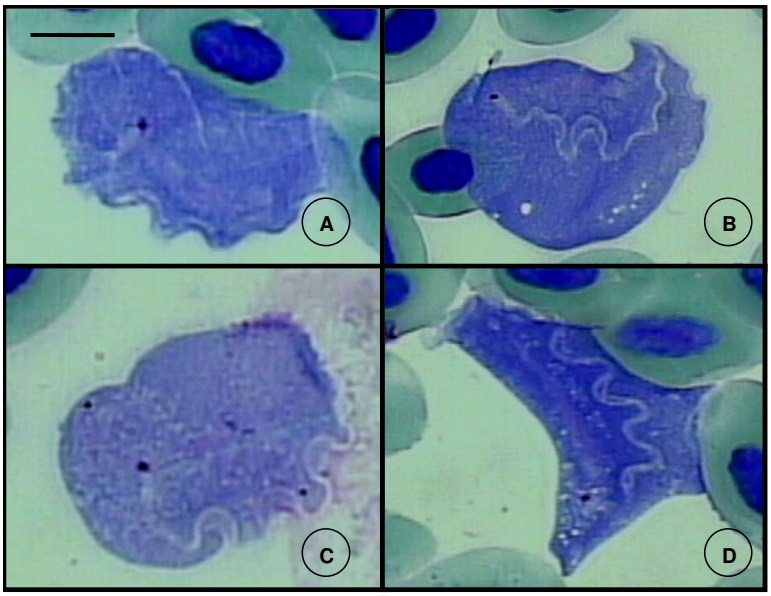

Fig. 8 (A,B,C,D): Formas de *Trypanosoma* observadas em *Hypsiboas albopunctatus*, capturado no Estado de São Paulo. Coloração Giemsa.
Bar = 10µm.

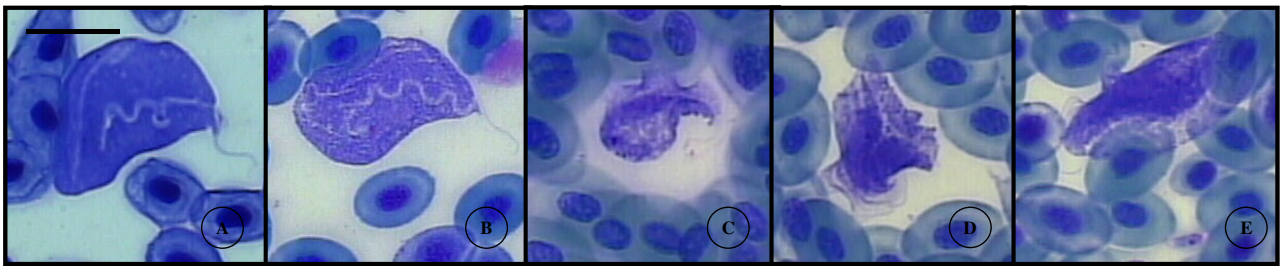

Fig. 9 (A,B,C,D,E): Formas de *Trypanosoma* observadas em *Leptodactylus chaquensis,* capturado no Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa. Bar = 10µm.

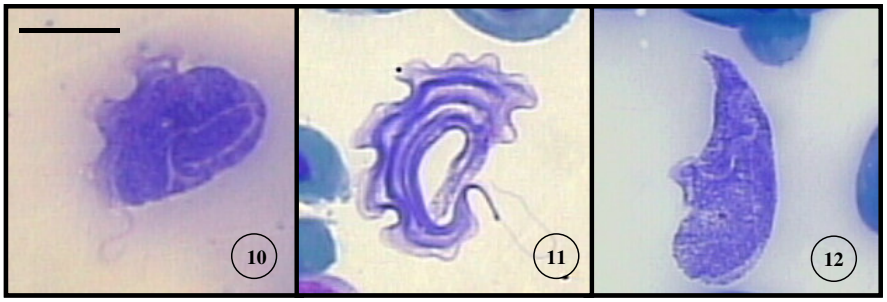

Fig.10: *Trypanossoma* observado em *Leptodactylus podicipinus;*

Fig. 11: *Trypanossoma* observado em *Leptodactylus labyrinthicus*;

Fig.12: *Trypanossoma* observado em *Phyllomedusa hypocondrialis*.

As espécies de anuros foram capturadas no Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa. Bar = 10µm.

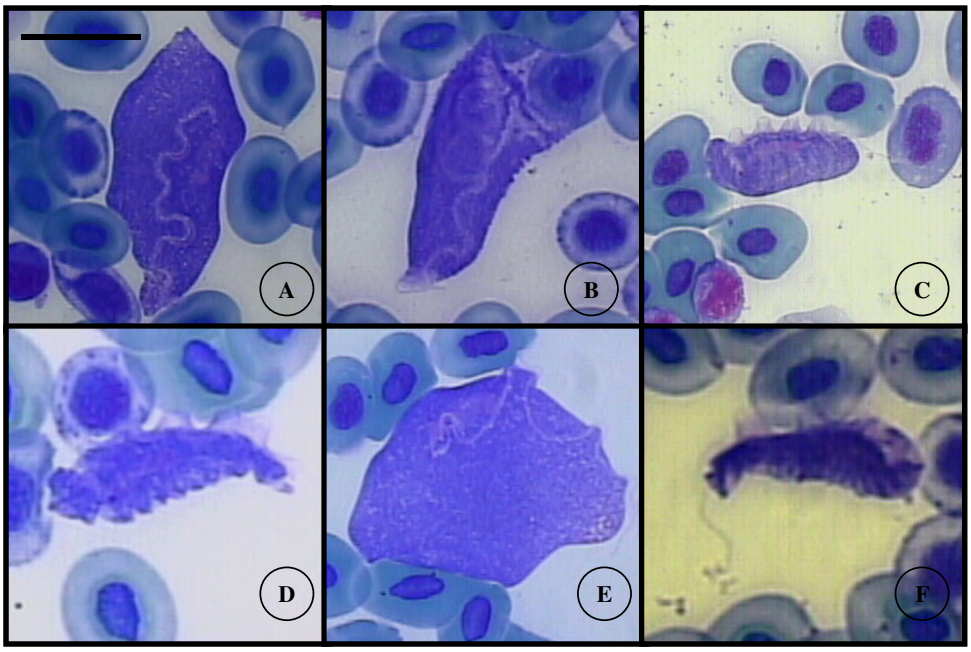

Fig.13 (A,B,C,D,E,F): Formas de *Trypanossoma* observadas em *Trachicephalus venulosus*, capturado no Estado do Mato Grosso do Sul. Coloração Giemsa. Bar = 10µm

Tabela II. Hemogregarinas e *Trypanosoma* spp. presentes em anuros capturados nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Espécies estudadas	**n**	**Sexo**	**Local de coleta**	**Coletor**	**Data de coleta**	**hemogregarinas**	***Trypanosoma* spp.**
Família Leptodactilidae							
Leptodactylus chaquensis	2	Macho Fêmea	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	14/11/05	+ (1)	+ (1)
Leptodactylus podicipinus	1	Fêmea	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	14/11/05	+	+
Leptodactylus labyrinthicus	1	-	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	14/11/05	-	+
Leptodactylus fuscus	1	Macho	Rubião Jr-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	28/11/06	-	-
Família Bufonidae						-	
Bufo granulosus	1	Fêmea	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	14-15/11/05		-
Bufo granulosus	1	-	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	14/11/05	-	-
Bufo schneideri	1	-	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	16/11/05	-	-
Bufo schneideri	2	Macho	Fazenda Lageado-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	25/10/2006	-	-
Bufo schneideri	1	Fêmea	Barragem-Chvantes/SP	Leal,D.D.M.	08/11/2006	-	-
Bufo schneideri	5	Macho Fêmea	Represa-Fartura/SP	Leal,D.D.M.	07/11/2006	+ (1)	-
Família Hylidae							
Phyllomedusa hypocondrialis	3	Macho Fêmea	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	15-17/11/05	+ (1)	+ (1)
Trachicephalus venulosus (*)	3	Macho Fêmea	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	16/11/05	-	+ (1)
Trachicephalus venulosus	1	-	Base de estudos do Pantanal-Corumbá/MS	Silva, R.J. et al.	16/11/05	-	-
Scinax fuscovarius	6	Macho	Fazenda Lageado-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	25/10/2006	-	-
Dendropsophus nanus (*)	5	Macho	Fazenda Lageado-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	25/10/2006	-	-
Dendropsophus minutus (*)	3	Macho	Fazenda Lageado-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	25/10/2006	-	+ (1)
Hypsiboas albopunctatus (*)	3	Macho	Rubião Jr-Botucatu/SP	Silva, C.A.de	28/11/2006	-	+ (2)

a) *Trachicephalus venulosus* (sinonímia: *Phrynohyas venulosa*), *Dendropsophus nanus* (sinonímia: *Hyla nana*), *Dendropsophus minutus* (sinonímia: *Hyla minuta*), *Hypsiboas albopunctatus* (sinonímia: *Hyla albopunctata*).

Tabela III. Parâmetros morfométricos de hemogregarinas observadas em quatro espécies de anuros capturados nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

	hemogregarina			**Núcleo da hemogregarina**		
Animais Parasitados	AP (μm^2)	CP (μm)	LP (μm)	ANP (μm^2)	CNP (μm)	LNP (μm)
Bufo schneideri (*)	17,61	10,81	2,11	-	-	-
	21,34	7,84	3,07	-	-	-
Leptodactylus chaquensis	21,32	7,66	3,62	10,18	3,62	2,33
	34,28	11,04	3,76	17,56	4,89	3,85
	35,15	10,87	4,10	12,28	2,71	3,15
Leptodactylus podicipinus	17,32	9,68	2,51	6,56	3,34	2,30
	33,60	12,15	5,02	11,73	3,43	3,62
	40,32	13,14	2,97	11,24	3,68	2,97
	40,67	12,29	3,87	18,73	3,97	3,51
	41,27	19,27	4,19	7,08	4,19	3,37
	43,86	11,37	3,88	9,77	2,48	3,50
	44,38	12,63	4,08	18,65	5,48	4,13
	44,98	12,40	4,20	10,70	3,97	2,56
	46,72	13,77	4,33	13,67	4,33	2,81
	65,59	12,45	6,23	21,51	4,82	3,62
Phyllomedusa hypocondrialis	20,61	7,40	2,82	6,64	2,32	2,17

a) (*) O núcleo não estava visível

Tabela IV. Parâmetros morfométricos de *Trypanosoma* spp. observados em sete espécies de anuros capturados nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

	Dimensões do parasita													
Espécies Animais	AP (μm^2)	CP (μm)	LP (μm)	CMO (μm)	L-MO (μm)	CF (μm)	D-F (μm)	ANP (μm^2)	A-N μm)	P-N (μm)	K-A (μm)	K-P (μm)	K-N (μm)	K-Np (μm)
Dendropsophus minutus	93,11	25,26	6,57	42,42	8,06	23,02	48,69	-	-	-	22,32	2,81	-	-
	246,09	23,16	14	56,12	15,57	-	-	22,47	12,45	10,62	10,81	9,33	4,99	10,20
	246,39	22,49	13,93	24,39	13,93	-	-	15,68	10,30	11,20	15,80	7,76	4,33	7,39
	257,58	21,82	12,45	59,43	12,97	12,95	41,34	8	12,35	18,05	18,15	4,82	6,17	8,36
	267,43	24,92	14,20	68,50	19,77	11,16	37,64	19,86	11,81	14,80	17,36	2,52	5,80	8,05
	329,94	25,13	17,58	63,31	17,58	11,26	40,10	17,02	16,49	16,46	18	8,70	7,67	11,20
Hypsiboas albopunctatus	313,39	42,61	8,09	32,64	9,90	-	-	-	-	-	12,71	27,63	-	-
	371,92	37,31	17,58	90,31	15,81	-	-	-	-	-	28,14	9,45	-	-
	393,46	41,70	17,44	79,44	17,79	-	-	-	-	-	30,24	9,58	-	-
	413,14	25,75	17,17	77	20,37	-	-	-	-	-	18,63	7	-	-
	672,51	57,83	24,42	103,13	25,91	-	-	-	-	-	47,45	4,13	-	-
	683,35	36,25	28,38	77,97	30,36	-	-	22,84	20,79	19,24	18,32	13,18	8,62	16,25
	690,18	26,64	27,95	-	-	-	-	7,57	9,60	16,93	8,58	17,58	1,42	2,15
	1078,49	52,33	29,96	24,57	29,96	-	-	33,98	29,27	16,83	25,22	18,35	3,11	6,73
Trachicephalus venulosus	157,44	27,44	8,43	51,80	9,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	172,52	29,20	9,24	56,56	9,08	20,83	44,24	-	-	-	-	-	-	-
	213,88	25,45	10,08	70,53	13,04	24,36	43,57	23,25	12,71	12,72	20,16	2,71	8,61	5,58
	511,20	38,15	14,82	80,55	16,47	7,5	54,66	-	-	-	-	-	-	-
	642,37	46,72	21,05	77,31	20,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	916,28	38,80	29,95	98,91	35,61	-	-	39,69	11,51	25,49	13,01	22,58	8,61	5,58
Phyllomedusa hypocondrialis	272,03	37,49	11,29	61,03	10,39	-	-	-	-	-	25,27	9,46	-	-
Leptodactylus chaquensis	80,75	14,37	8,10	34,38	11,07	21,85	38,41	-	-	-	-	-	-	-
	165,85	12,13	8,17	33,90	15,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	333,37	31,33	14,20	78,19	16,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	406,17	29,37	21,46	88,43	18,15	15,45	47,39	-	-	-	19,64	6,44	-	-
	463,56	26,60	18,54	47,48	18,54	11,43	55,76	-	-	-	-	-	-	-
Leptodactylus labyrinticus	267,87	66,04	6,93	99,62	9,30	27,17	94,43	-	-	-	-	-	-	-
Leptodactylus Podicipinus	238,57	21,06	13,73	51,96	18,06	19,59	44,02	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSSÃO

No presente estudo, a freqüência de hemoparasitas obtidas em anuros foi relativamente alta, principalmente para *Trypanosoma* spp. (20%). Para hemogregarinas a freqüência foi menor (10%), mas mesmo assim, relevante.

Mohamed & Mansur (1963, 1966 a,b,c) observaram uma freqüência de hemogregarinas em sapos maior do que a do presente estudo (30,5%). Em relação à freqüência de *Trypanosoma* em anuros, os resultados diferiram de acordo com o grupo estudado. Lehamn (1959) diagnosticou 44,4% de *R. boyli* infectadas. Ayala (1970) encontrou 15,6% de *B. boreas* parasitados, enquanto, Werner et al. (1988) observaram prevalências que variaram de 1,5% a 26,9% de sapos infectados, de acordo com a espécie de *Trypanosoma*. Segundo Woo & Bogart (1984), 16,7% das pererecas encontravam-se positivas.

Entretanto, o resultado obtido na nossa pesquisa é semelhante a um outro estudo feito com anuros em espécies terrestres e aquáticas, provenientes do Canadá, no qual foi observada uma prevalência maior de animais infectados por *Trypanosoma* spp. do que por hemogregarinas (Barta & Desser 1984). Outra pesquisa que corroborou com este resultado, foi realizada com anuros da Costa Rica, onde se obteve a mesma prevalência para estes hemoparasitas (Desser 2001).

Apesar de não ter sido possível compararmos os resultados dos animais coletados em São Paulo daqueles coletados no Mato Grosso do Sul, devido às diferenças entre as espécies nos dois estados, o número de animais positivos foi maior no Estado do Mato Grosso do Sul do que nos animais do Estado de São Paulo. Segundo relatos, uma das causas para o número menor de parasitas, seria a forte correlação destes parasitas com o meio ambiente. Ambientes mais alterados ecologicamente tendem a ter uma diminuição de hemoparasitas (Mackenzie 1999, Silva et al. 2005), portanto, é o que pode estar ocorrendo no Estado de São Paulo, embora, haja outros fatores que devam ser levados em consideração como clima, densidade de vetores, entre outros.

Observou-se que, tanto em hemogregarinas como no gênero *Trypanosoma*, houve uma grande variabilidade de formas. Encontramos 16 formas diferentes entre si de hemogregarinas em quatro espécies de anuros e 28 formas diferentes entre si de *Trypanosoma* spp. em sete espécies de anuros. Estes parasitas, na maioria das vezes, não puderam ser comparados aos já descritos na literatura, ou porque as descrições destes protozoários eram muito antigas ou porque faltavam trabalhos recentes com estes

parasitas em anuros. De acordo com a literatura é comum encontrar hemogregarinas em rãs (Ranidae) e em sapos (Bufonidae) em todo o mundo, enquanto que em pererecas (Hylidae) não se tem registro desses hemoparasitas (Smith 1996). No presente estudo foram observados animais positivos da família Leptodactylidae, ainda não descrita como hospedeiro de hemogregarinas, e da família Hylidae, que segundo Smith (1996), por possuir habitat arbóreo estaria menos sujeita aos vetores de hemoparasitas. Já para a família Bufonidae, cujos relatos de encontro de hemogregarinas são comuns (Smith 1996), vimos apenas uma espécie positiva (*Bufo schneideri*) (Tabela II).

Não foi possível realizar a classificação das espécies baseando-se somente nas formas e dimensões das hemogregarinas encontradas, pois, estas formas podem representar uma mesma espécie de parasita ou, várias espécies diferentes. Pode ser, também, que uma determinada espécie de hemogregarina provoque efeitos diferentes no núcleo da hemácia em hospedeiro distintos, causando o seu deslocamento, ou não. Este fato já foi observado em *Hepatozoon* de serpentes (Smith, 1996). Preferimos denominar os gamontes observados simplesmente como sendo de hemogregarina, pois, como não foi realizado o ciclo biológico no vetor, não foi possível classificar genericamente os parasitas como sendo *Hepatozoon* ou *Haemogregarina*.

Em relação às formas de *Trypanosoma* spp. encontradas, prevaleceu um grande polimorfismo, fato este que se comparou às descrições feitas na literatura. Pudemos experimentar a dificuldade na classificação, mesmo utilizando a morfologia e morfometria. Existem muitos detalhes específicos de cada espécie a serem considerados, como descrito por Miyata (1978). As espécies encontradas algumas vezes tinham a morfologia muito semelhante à literatura, mas diferia em algumas dimensões corporais. A pergunta que fica é: "A grande maioria dos tripanossomas observados podem ser formas novas ou um estágio de desenvolvimento do parasita?", já que poucos estudos têm sido realizados com hemoparasitas em anuros. Observamos que nas descrições feitas de tripanossomas por Miyata (1978), haviam determinadas peculiaridades que podem separar estes parasitas, como a posição do cinetoplasto, a posição do núcleo e a extensão do flagelo livre, dentre outros. Mas mesmo com todos estas observações, ainda assim ocorrem dificuldades, pois algumas vezes estas estruturas podem não estar visível.

Dos animais positivos para hemogregarinas e *Trypanosoma* spp., alguns hospedavam os dois hemoparasitas: *L. chaquensis*, *L. podicipinus* e *P. hypocondrialis.*

A maioria das hemogregarinas observadas nesta pesquisa não foram semelhantes às descritas na literatura, com exceção para um gamonte diagnosticado em *Leptodactylus podicipinus* que apresentava morfologia e dimensões corporais semelhantes ao parasita descrito por Mohamed & Mansur (1966b), *Haemogregarina pestanae,* encontrada em *Bufo regularis*. Mesmo neste caso não podemos afirmar que o parasita encontrado seja do gênero *Haemogregarina,* pois faltam dados mais consistentes e além disso, o parasita encontrado por nós estava em um hospedeiro completamente diferente daquele relatado na literarura.

Nós também encontramos hemogregarinas semelhantes entre as espécies estudadas, como por exemplo, *Bufo schneideri* (fig.1b) e *Leptodactylus podicipinus* (fig.4b). As medidas corporais dos parasitas eram muito parecidas, apenas as dimensões do núcleo não puderam ser comparadas, pois em *B. schneideri* o núcleo não estava com uma área muito visível.

Em tripanossomas foi visto em *Dendropsophus minutus,* duas formas que eram semelhantes ao que foi descrito por Miyata (1978): uma forma semelhante ao *Trypanosoma* sp. B (fig.6e) e a outra forma semelhante ao *T. nagasakiense*, descritos em *Hyla arborea japonica* (fig. 6f). Em *Hypsiboas albopunctatus* encontramos duas formas de tripanossomas que foram semelhantes ao que foi descrito por Miyata (1978) como sendo *T. loricatum* descrito em *Rana narina e R. holsti* (fig. 7b) e (fig. 8A). Em *Leptodactylus chaquensis* encontramos apenas uma forma que foi semelhante ao descrito por Miyata (1978) com sendo *T. nagasakiense* descrito em *Hyla arborea japonica* (fig. 9b). Em *Leptodactylus labirinthicus* encontramos uma forma que foi semelhante ao descrito por Miyata (1978) como *T. tsukamotoi* descrito em *R. namiyei* (fig. 11).

Apesar das comparações morfológicas realizadas, devido à falta de dados mais completos na literatura, e embora algumas formas de *Trypanosoma* ssp. tenham sido semelhantes às já descritas, pequenas diferenças morfológicas não permitiram que as espécies de *Trypanosoma* fossem nomeadas. Como não há dados a respeito do ciclo biológico deste gênero em anuros, não se sabe os possíveis estágios que podem ser encontrados em cada espécie. Assim, o grande pleomorfismo observado pode tanto indicar espécies distintas, como indicar estágios diferentes de uma mesma espécie. Além disso, diferentes espécies de anuros podem ser parasitadas pela mesma espécie de *Trypanosoma* e esta pode modificar ou não sua morfologia de acordo com o hospedeiro.

Apesar de *T. rotatorium* ser a espécie mais descrita na literatura, nenhuma das formas de *Trypanosoma* observadas no presente estudo corresponderam fielmente a esta espécie.

Diante dos resultados obtidos, pudemos concluir que a fauna de hemoparasitas, tanto do grupo das hemogregarinas, quanto do gênero *Trypanosoma*, são freqüentes em anuros capturados no estado de São Paulo e no estado do Mato Grosso do Sul. Entretanto, só com pesquisas aprofundadas envolvendo estudos moleculares dos estágios sangüíneos, associados a aspectos biológicos e ecológicos, poderemos caracterizar estas espécies e avaliar a importância do parasitismo, seja em relação a possíveis impactos destes nos animais, seja em relação à importância da presença de hemoparasitas para o monitoramento das condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

AYALA SC 1970. Two new trypanosomes from California Toads and Lizards. J Protozool 17:370-373.

AYALA SC 1971. Trypanosomes in wild California sandflies and extrinsic stages in *Trypanosoma bufophlebotomi*. J Protozool 18:433-436.

BARDSLEY JE, HARMSEN R 1973. The trypanosomes of anura. In: Dawes, B. Advances in parasitology, London. p.1-73.

BARROW JH JR 1953. The biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batracobdellla picta* (Verril). Trans Amer Microsc Soc 72:197-216.

BARTA JR, DESSER SS 1984. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. J Wildl Dis 20:180-189.

DESSER SS, MCLVER SB, JEZ D 1975. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. Int J Parasitol 5:50-59.

DESSER SS, HONG H., MARTIN DS 1995. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbianae* n. comb., an apicomplexan parasite on the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algoquin Park, Ontário. J Parasitol 81:212-222.

DESSER SS 2001. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. J Parasitol 87:152-160.

DIAMOND LS 1950. A new species of trypanosome, *Trypanosoma pipientis* n. sp., from leopard frog, *Rana pipiens*. J Parasitol 36:24-25.

DIAMOND LS 1965. Study of the morfology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. Wildl Dis 44:1-77.

FANTHAM HB, PORTER A, RICHARDSON LR 1942. Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. Parasitol 34:199-226.

FENG LS, CHAO CS 1943. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris.* Chin Med J 62:210-217.

GALLIARD H, BUTTNER A, BOURCART N 1953. Effet de l'hormone somatotrope sur une trypanosome mortelle pour *Rana esculenta* L., due au *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904 (souche algérienne). Cr Séanl Soc Biol 147:1695-1698.

HASSAN IM 1992. On haemogregarine parasites of the toad *Bufo regularis* in Qena Governorate, upper Egypt with description of a new species, *Haemogregarina magni*. Invertebr Parasitol 9: 379-385.

JAKES K, O'DONOGHUE PJ, CAMERON SL 2003. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (Haemogregarina) *boigae*, *Hepatozoon* sp., *Haemogregarina clelandi* and *Haemoproteus chelodina* form Australian reptilies to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. Parasitol 126:555-559.

KIM B, SMITH TG, DESSER SS 1998. The life history and host specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) and ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frogs and mosquitoes from Ontario. J Parasitol 84:789-797.

KUDO R 1922. On the protozoa parasitic in frogs. Trans Am Microsc Soc 40:59-76.

LEHMAN DL 1959. *Trypanosoma boyli,* n. sp. from the Califórnia red-legged frog, *Rana b. boyli*. Trans Am Micros Soc 78:370-373.

MACKENZIE K 1999. Parasites as pollution indicators in marine ecosystems a proposed early warning system. Mar Poll Bull 38:955-959.

MIYATA A 1978. Anuran trypanosomes in Kyushu and Rhyukyu island, with descriptions of six new species. Trop Med 20:51-80.

MOHAMMED AH, MANSOUR NS 1963.*Haemogregarina aegyptia* sp. nov. from Africa toads (*Bufo regularis*) and its relationship to *Haemogregarina tunisiensis* Nicolle, 1904. Proc Zool Soc 1:33-46.

MOHAMMED AH, MANSOUR NS 1966a. Development of *Haemogregarina boueti* in the toad *Bufo regularis*. J Protozool 13:259-264.

MOHAMMED AH, MANSOUR NS 1966b. *Haemogregarina faiyumensis* n. sp. in the toad *Bufo regularis* in Egypt. J Protozool 13:269-271.

MOHAMMED AH, MANSOUR NS 1966c. Development of *Haemogregarina pestanae* in the toad *Bufo regularis.* J Protozool 13:265-269.

NÖLLER W 1913. Die blutprotozoen des wasser-frosches und ihre Uebertragung. I. Teil. Arch Protistenk 31:169-240.

NÖLLER W 1917. Blut- und insektenflagellatenzüchtung auf platen. Arch Schiffs Trop Hyg 21:53-94.

RAMOS B, URDANETA-MORALES S 1977. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. Rev Biol Trop 25:209-217.

SILVA V, VALENZUELA A, RUIZ P, OYARZÚN C 2005. *Trypanosoma humboldti* en *Schroederichthys chilensis* (Cohodrichthyes, Elasmoranchii, Scyliorhinidae) como indicador no destructivo de contaminacion. Gayana 69:160-165.

SILVANO DL, SEGALLA MV 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. Megadiversidade, 1:79-86.

SOUZA MA, BORRIELLO FILHO A 1974. Uma nova hemogregrina no sangue de *Bufo crucifer* WIED, 1821 do Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 72:275-282.

SOUTHWORTH GC, MASON G, SEED IR 1968. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24 hour cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Lousiana. J Parasitol 54:255-258.

SCORZA JV, DAGERT C 1958. Sobre la sinonimia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. Bol Venez Lab Clin 3:29-36.

SMITH T G 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol 82:565-585.

SMITH T G, KIM B, HONG H, DESSER SS 2000. Intraerythrocytic development of species of *Hepatozoon* infecting ranid frogs: evidence for convergence of life cycle characteristics among apicomplexans. J Parasitol 86:451-458.

WERNER JK, DAVIS JS, SLAGHT KS 1988. Trypanosomes of *Bufo americanus* from northern Michigan. J Wildl Dis 24:647-649.

WERNER J K 1993. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. J Parasitol 79:356-363.

WOO PTK 1969. The life cycle of *trypanosoma chrysemydis.* Can J Zool 47:1139-1151.

WOO PTK, BOGART JP 1984. *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distributions and prevalences. Can J Zool 62:820-824.

ŽIČHUS T 2002. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lituania. Acta Zool Lituanica 12:197-202.

[1] Referências apresentadas segundo as normas da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo