

Renata Soares de Almeida

***Trypanosoma* sp. (Protozoa: Kinetoplastida)
em *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae),
no Pantanal de Mato Grosso do Sul – Região
Miranda Abobral**

Orientador: Prof. Fernando Paiva

Fevereiro 2006
Mato Grosso do Sul
Campo Grande

Renata Soares de Almeida

***Trypanosoma* sp. (Protozoa: Kinetoplastida)
em *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae),
no Pantanal de Mato Grosso do Sul – Região
Miranda Abobral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação, na área de concentração ECOLOGIA.

Agradecimentos

Aos meus pais, Wilson Luiz de Almeida e Marina Soares Almeida, pelo incentivo e confiança.

Ao Prof. Fernando Paiva, pela oportunidade, orientação, estímulo e amizade solidificada nestes anos de convivência.

Aos amigos que participaram das coletas ou alguma etapa do trabalho: Emanuele Pomini, Otávio Fröelich, Luis Felipe Carvalho, Marlon Cezar Comanetti, Ednéia dos Santos e Berenice Lima.

A Julio Cesar R. Fontenelle do Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos (ICB/UFMG), pela paciência e grande ajuda nas análises estatísticas.

A Teresa Cristina M. Garcia, pelas sugestões e comentários.

Ao Prof. Milton Moraes de Lima, aos funcionários Áttila Gomes e José Brás e às estagiárias Andressa Piacenti e Tarcilla Borghesan, do Laboratório de Parasitologia Veterinária (CCBS/UFMS), pela convivência e amizade.

Aos Profs. Alan Lane de Melo, Gentilda Takeda, Manzélio Cavazzana, Marcos Coutinho e Vanda Lúcia Ferreira, pela revisão crítica e sugestões.

À EMBRAPA CNPGC, especialmente Pedro Paulo Pires e José Gomes, por disponibilizar o equipamento necessário para a mensuração dos *Trypanosoma*;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Foram capturados 129 jacarés-do-Pantanal (*Caiman yacare*), no Pantanal Sul Mato-Grossense, em uma região conhecida como Miranda-Abobral. As capturas foram realizadas em ambientes lênticos, representados pelas lagoas localizadas ao longo da rodovia MS-184, e ambientes lóticos, representados pelos rios Miranda, Vermelho e Abobral. Os jacarés foram pesados, medidos e tiveram coletados os ectoparasitos presentes, especialmente as sanguessugas, e foram examinados para a presença de *Trypanosoma* sp., utilizando a técnica de centrifugação em microhematócrito. A prevalência total obtida foi de 20,1% (26/129). Comparativamente, não há correlação entre a presença do parasitismo e os dois ambientes estudados ($U=1222,5$; $p=0,82$). Pelo exame dos esfregaços sanguíneos e impressões de tecidos corados por Giemsa, foram detectados dois morfotipos de *Trypanosoma* sp. As sanguessugas encontradas aderidas nos jacarés foram dissecadas, em períodos variáveis de tempo, e de suas partes foram confeccionados esfregaços de aposição, nos quais foi observada a presença de formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma* sp., sugerindo que estes hirudíneos são hospedeiros invertebrados desses flagelados. De um jacaré foi coletado um espécime de *Amblyomma rotundatum* (KOCH, 1844).

Palavras chave: *Caiman yacare*, *Trypanosoma*, Pantanal, parasitismo.

Abstract

In this study, 129 caimans (*Caiman yacare*), were captured, in the Pantanal of Mato Grosso do Sul State, at the region known as Miranda-Abobral. The captures were carried out in lentic and lotic environments, the first represented by the pools located at the edge of the highway MS-184 and, the second, by the rivers Miranda, Vermelho e Abobral. All the crocodylians were weighted, measured, searched for ectoparasites, specially leeches, and their blood examined for *Trypanosoma* sp., using the hematocrit centrifuge technique. The total prevalence was 20,1% (26/129). Comparing the data by Mann-Whitney test, it does not observed correlation on the parasitism and with different environments ($U=1222,5$; $p=0,82$). The examining of blood smears and “*imprints*” staining by Giemsa, were detected two morphotypes of *Trypanosoma* sp. The leeches found attached on the caimans were dissected, within different periods of time, and from their body portions was confectioned “*imprints*”, of which forms of epimastigotes and tripomastigotes were observed, suggesting that these hirudins are invertebrate hosts of these flagellates. One tick, *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), was found attached on one caiman.

Key words: *Caiman yacare*, *Trypanosoma*, Pantanal, parasitism.

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Introdução	7
Revisão de Literatura	9
Material e Métodos	18
Área de Estudo	18
Captura dos Jacarés	19
Diagnóstico Parasitológico do sangue	20
Hospedeiros Invertebrados	22
Estudos Histopatológicos	22
Análises Estatísticas	22
Resultados e Discussão	24
Comparação das prevalências de <i>Trypanosoma</i> sp. em jacarés capturados em ambientes lênticos e lóticos	24
Caracterização de <i>Trypanosoma</i> sp. por morfometria	29
Esfregaços sanguíneos	29
Esfregaços de Soro	29
Impressões de Tecidos	30
Cortes Histológicos	34
Análise dos Hospedeiros Invertebrados	35
Conclusões	39
Referências Bibliográficas	40

I- Introdução

Os tripanossomatídeos são capazes de infectar em uma grande variedade de hospedeiros, de plantas a animais invertebrados e vertebrados; esses organismos estão amplamente distribuídos nos diferentes continentes. A capacidade de infecção por indivíduos morfologicamente muito semelhantes, porém com ciclos biológicos diferentes, faz dessa família um excelente modelo para estudos evolutivos (VICKERMAN, 1976 e 1994).

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais estudados nesta família, em razão de sua patogenicidade para humanos e animais. Entretanto, é também um importante parasito de sangue, linfa, tecidos ou cavidades de todas as classes de vertebrados, geralmente apresentando prevalência alta em populações naturais. Muitas espécies já foram descritas em animais silvestres e, estima-se que outras mais serão identificadas. Isto porque os estudos estão limitados pelo acesso e captura destes animais. Por esta razão, aspectos biológicos do ciclo de vida de muitas espécies permanecem indeterminados.

A maioria dos relatos sobre tripanossomíase em vertebrados aquáticos se refere a peixes. Estudos em répteis e anfíbios ainda são escassos. Em crocodilianos, as duas espécies descritas são: *Trypanosoma grayi*, parasito de crocodilos africanos, *Crocodilus niloticus*, e *T. cecili* parasito de *Caiman crocodilus*. Em jacarés-do-Pantanal, *Caiman yacare*, existe apenas um relato de ocorrência de tripanossomas (NUNES & OSHIRO, 1990). No entanto não foi atribuído nome à

espécie, bem como ainda não foram esclarecidos aspectos da patogenia e transmissão.

O jacaré-do-Pantanal é uma espécie amplamente distribuída na planície pantaneira em razão de seu grande potencial para utilização sustentada e conservação alguns estudos biológicos vêm sendo desenvolvidos (COUTINHO et al., 1996; PINHEIRO et al., 2001; CAMPOS, 2003). No entanto, estudos sobre aspectos de parasitismo ainda são restritos, assim como as interações parasito-hospedeiro-ambiente e seu efeito nas populações silvestres e de cativeiro.

Considerando que a região do Pantanal Sul-Matogrossense compreende um sistema bastante rico, onde as condições ambientais favorecem o estabelecimento de uma grande variedade de fauna e flora, o estudo das interações entre os organismos é fundamental para o entendimento dos fenômenos que contribuem para a manutenção desta diversidade.

Este estudo tem como objetivos: 1- a determinação da prevalência de tripanossomas em jacarés-do-Pantanal em diferentes ambientes; 2- a caracterização morfológica da(s) espécie(s) e, 3- prováveis hospedeiros invertebrados envolvidos.

II- Revisão de Literatura

A ordem Kinetoplastida é constituída por protozoários que apresentam uma organela denominada cinetoplasto, que é uma região especializada da mitocôndria, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas. Junto com o grupo dos euglenóides, os Kinetoplastida representam o mais antigo grupo de organismos eucariotos contendo mitocôndria (BAKER, 1994). Os organismos desta ordem estão subdivididos em duas subordens: Tripanosomatina, cujos membros são parasitos obrigatórios, e Bodonina, que compreendem parasitos e espécies de vida livre (HOARE, 1972). Recentemente, MOREIRA et al. (2004) propuseram uma nova subdivisão da Classe Kinetoplastea, baseada em análises filogenéticas, na qual esta classe é constituída de duas novas sub-classes, Prokinetoplastina e Metakinetoplastina, esta última contendo os Typanosomatida e mais três novas ordens: Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida.

Durante a história evolutiva deste grupo, os Kinetoplastida tem desenvolvido uma grande variedade de estilos e adaptações ao parasitismo. As duas hipóteses mais antigas propostas para a origem e evolução do estilo de vida parasitário em Kinetoplastida, são o parasitismo inicial em invertebrados, e o parasitismo inicial em vertebrados. A hipótese do parasitismo inicial em invertebrados postula que o parasitismo por flagelados “bodo-like” foi primeiramente estabelecido no trato intestinal de invertebrados primitivos e, com a evolução e especiação dos hospedeiros invertebrados atuais, deram origem à ampla distribuição de Kinetoplastida em muitos tipos de invertebrados (LEGER, 1904). Já a hipótese do parasitismo inicial em vertebrados postula que o

parasitismo monogenético teria primeiramente estabelecido no intestino de vertebrados, de onde os parasitos ganharam entrada no sistema circulatório através de penetração profunda nos tecidos (MINCHIN, 1908).

Entretanto, MASLOV & SIMPSON (1995), através de estudos filogenéticos moleculares, sugerem que tripanossomatídeos digenéticos evoluíram independentemente, de parasitos monogenéticos tanto de invertebrados como daqueles de vida livre, em razão das notáveis dissimilaridades nas estratégias que parasitos digenéticos utilizam para escapar dos mecanismos de defesa nos hospedeiros. No entanto, o estudo de organismos que ainda não foram incluídos em análises filogenéticas moleculares, tais como tripanossomas de peixes, anfíbios e répteis, poderiam ajudar a esclarecer a origem do parasitismo nestes organismos (MASLOV & SIMPSON, 1995).

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, são os de maior evidência dentro do grupo dos Kinetoplastida, e também um importante parasito de sangue, linfa, tecidos ou cavidades de todas as classes de vertebrados, com algumas espécies patogênicas para o homem e animais domésticos e silvestres (OLSEN, 1974). No sangue dos hospedeiros vertebrados, os tripanossomas apresentam-se sob a forma característica de tripomastigota, alongados, com cinetoplasto pós-nuclear e flagelo emergindo pela lateral do corpo, que segue como membrana ondulante. A forma amastigota, presente nos tecidos do hospedeiro vertebrado, são arredondados e não possuem flagelo externo. Nos hospedeiros invertebrados são encontradas formas epimastigotas – semelhantes aos tripomastigotas, porém com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo, e um estágio de transição entre as formas flageladas e amastigota, os esferomastigotas – formas circulares com flagelo livre (HOARE, 1972; HAAG et al., 1998;).

Ao contrário das espécies causadoras de doenças humanas, dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, para os quais os parâmetros taxonômicos para sua classificação são ampla e claramente definidos pela comunidade científica, os tripanossomas exclusivos de animais domésticos e silvestres, e os tripanossomatídeos de plantas e insetos são ainda pouco estudados. Estes têm

sido classificados arbitrariamente como novas ou antigas espécies, adotando-se o hospedeiro de origem e/ou origem geográfica como critério taxonômico para atribuição de nomes específicos (WOO & BLACK, 1984; OVERATH et al., 1999). Esta conduta para atribuição de nomes específicos, gerou dezenas de descrições de espécies sem critérios confiáveis e suficientes estudos comparativos. Apenas recentemente isolados de anfíbios, peixes, répteis e aves passaram a ser melhor investigados (LETCH, 1979; WOO & BLACK, 1984; JONES & WOO, 1991b, 1992, 1993; OVERATH et al., 1998, 1999; STEVENS et al., 1999a, 1999b, 2001;). Desta forma, devido à escassez tanto de isolados quanto de estudos moleculares, a origem evolutiva, filogenia e *status* taxonômico dos tripanossomas de anfíbios e répteis são ainda indefinidos. No entanto, segundo MOMEN (2001), todos os gêneros de tripanossomatídeos amplamente aceitos na atualidade, foram descritos há mais de noventa anos, baseando-se em aspectos morfológicos e hospedeiros de origem. Assim, o problema na taxonomia dos Tripanosomatidae, reside no fato de que os isolados que tem sido identificados e estudados refletem apenas uma pequena parte da verdadeira diversidade da família (MOMEN, *loc cit*).

A maioria das espécies de *Trypanosoma* se desenvolve em artrópodes hematófagos, de diversas ordens e famílias, exceto as espécies que parasitam peixes, anfíbios e alguns répteis, pois estas são transmitidas por sanguessugas (OLSEN, 1974). A transmissão de estágios infectantes de um hospedeiro a outro pode se dar de várias formas que incluem: meio inoculativo e contaminativo durante a alimentação dos invertebrados, transferência mecânica por vetores, e transmissão sexual entre dois hospedeiros.

Em humanos, *Trypanosoma cruzi* induz uma fase aguda com parasitemia patente, seguida por uma fase crônica de longo termo, caracterizada por parasitemia subpatente e parasitismo tecidual escasso. A maioria dos pacientes chagásicos permanece com uma forma indeterminada da doença caracterizada pela ausência de manifestações clínicas. Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes desenvolvem uma forma cardíaca expressa por uma grande variedade de manifestações, desde pequenas alterações eletrocardiográficas, até morte

repentina por falha cardíaca. O substrato patológico da forma cardíaca é a presença de uma prolongada miocardite fibrótica progressiva. Finalmente, de 8 a 10% dos pacientes desenvolve uma forma digestiva caracterizada por dilatações de gravidade variável do esôfago e cólon (BRENER, 1992).

O diagnóstico parasitológico direto da tripanossomíase é baseado na detecção de formas tripomastigotas sangüíneas pelo exame microscópico de amostras de sangue fresco ou esfregaço sangüíneo. As preparações coradas permitem a caracterização morfológica do parasito, enquanto que os exames a fresco facilitam a detecção do parasito pela sua motilidade. Esta última é utilizada para diagnóstico na fase aguda, quando grande número de parasitos estão presentes na corrente sangüínea (CHIARI, 1992). Assim, métodos de concentração aumentam a probabilidade de detecção da parasitemia na fase crônica. Dentre eles, o método mais fácil é a centrifugação do sangue com anticoagulante em tubos capilares para microhematócrito, e visualização dos parasitos sobre a camada leucocitária (Woo, 1969).

As formas sangüíneas do gênero *Trypanosoma* são prevalentes em uma grande variedade de vertebrados, e altas prevalências em infecções naturais nas populações sugerem uma resposta imune de eficiência limitada, permitindo que o parasito consiga escapar ou interferir na resposta imune de seus respectivos hospedeiros (OVERATH et al., 1999). Segundo REIS (2000), a persistência de patógenos intracelulares (*Trypanosoma* e *Leishmania*) deve estar associada a eficientes mecanismos de evasão, pois estes mobilizam uma intensa resposta imune inata e adquirida nos hospedeiros infectados.

Trypanosoma grayi, parasito de crocodilos africanos (*Crocodilus niloticus*), é a espécie melhor conhecida em répteis. HOARE (1931), mostrou em infecções experimentais, que os crocodilos adquirem infecção a partir de mscas tsé-tsé (*Glossina palpalis*) infectadas, por via contaminativa. As formas tripomastigotas ocorrem principalmente nos capilares epidérmicos, não havendo multiplicação no sangue, o que resulta em baixa parasitemia. As infecções têm um período pré-patente de aproximadamente quatro dias, podendo persistir por pelo menos dois

anos, e os crocodilos parecem ter imunidade parcial ou tolerância aos flagelados (OLSEN, 1974).

Em jacarés-do-Pantanal, *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae), foi relatada a presença de *Trypanosoma* sp. (NUNES & OSHIRO, 1990), o qual distingue-se morfológicamente de *T. Grayi* e *T. cecili*, parasitos de *Crocodylus niloticus* e *Caiman crocodilus*, respectivamente. A diferenciação entre estas espécies baseou-se apenas em estudos biométricos, porém não foi atribuído nome específico a este organismo quando da descrição.

O jacaré-do-Pantanal, *Caiman yacare*, é encontrado no norte da Argentina, sul do Brasil, Paraguai e Bolívia. Apesar da caça ilegal em passado recente, é uma espécie amplamente distribuída na planície pantaneira; análises sugerem que esta caça predatória não teve impacto negativo nas populações (MOURÃO et al., 1996). Segundo THORBJARNASON (1999), apesar de a caça comercial de crocodilianos ter levado várias populações a alcançarem níveis próximos à extinção, entre as espécies para as quais a perda de *habitat* não foi um fator significativo, a redução ou eliminação da caça comercial permitiu a recuperação dessas populações.

Morfológica e ecologicamente semelhante a *Caiman crocodilus*, o *C. yacare* pode alcançar até 3,0 metros de comprimento e é capaz de se adaptar a diferentes tipos de *habitats*: rios e lagoas, sempre associados à vegetação flutuante.

Considerando-se a implantação de criadouros comerciais pelo alto valor da pele e da carne dos jacarés, justifica-se o desenvolvimento de estudos sobre a sanidade deste animal, permitindo a identificação e o controle de doenças. Isso poderá também contribuir para conservação e manejo desta espécie em ambiente silvestre.

Crocodylos criados em cativeiro podem apresentar uma grande variedade de doenças. Entre elas, as de maior importância são coccidiose, septicemia bacteriana, ascaridíase e pentastomíase (LADDS & SIMS, 1990, CATTO, 1991). Outras infecções encontradas são: filárias, hemogregarinas, trematódeos e

nematódeos (LADDS et al., 1995). A mortalidade de crocodilos, principalmente jovens, causadas por essas doenças, bem como a presença de infecções múltiplas, podem ser atribuídas à coleta de indivíduos recém eclodidos no ambiente e à falta de aclimatação às condições de cativeiro (LADDS et al., 1995). Jacarés encontrados na natureza, também estão freqüentemente associados a helmintos, protozoários e sanguessugas (CHERRY & AGER JR., 1982; CATTO, 1991). Estes últimos, além de causarem eosinofilia nos jacarés (GLASSMAN et al., 1979), são transmissores de *Hemogregarina crocodilorum* em *Alligator mississippiensis* (KHAN et al. 1980), e outras hemogregarinas para tartarugas (SIDALL & DESSER, 2001) e serpentes (PESSÔA & CAVALHEIRO, 1969). Além disso, sanguessugas podem ser hospedeiros definitivos de hemogregarinas (SIDALL & BURRESON, 1994; WISE et al., 2000;) e hospedeiros intermediários de tripanossomas de peixes (NEGM-ELDIN, 1998), anfíbios (MARTIN & DESSER, 1991) e répteis (CHIA & MILLER, 1984).

A maioria das espécies aquáticas de sanguessugas vive em água doce, preferindo águas rasas com vegetação marginal, como charcos, lagos e rios lentos. São bastante resistentes à desidratação, podendo estar em períodos de seca, sobrevivendo à perda de até 90% de seu peso (BARNES, 1984). Aproximadamente 75% das espécies são ectoparasitos hematófagos, e o restante compreende espécies predadoras de pequenos invertebrados. Seu sucesso como hospedeiros intermediários depende da sua especificidade e hábitos alimentares. De acordo com BUSH et al. (2001), espécies de sanguessugas que são específicas a um hospedeiro, e que permanecem aderidas a eles, são vetores ineficientes.

Vários parâmetros podem contribuir para a variação na prevalência de tripanossomas em vertebrados de água doce, naturalmente infectados. Acredita-se que a multiplicação e transmissão do parasito em épocas quentes seja maior. Fatores como temperatura da água, sensibilidade da técnica de diagnóstico usada e idade do hospedeiro, também contribuem para esta variação observada (WOO, 1994).

Segundo KOELLA & RESTIF (2001), o ambiente, em que vive o hospedeiro também terá um papel crítico na associação parasito–hospedeiro, pois a qualidade ambiental geralmente influencia sua história de vida e modificará a pressão de seleção do parasito. Desta forma, prediz-se que ambientes com alta produtividade são dominados por hospedeiros com forte resistência e parasitos virulentos, enquanto que em ambientes de baixa qualidade seriam favorecidas interações mais atenuadas. Sendo assim, espera-se que ambientes lênticos apresentem uma maior freqüência de animais parasitados que ambientes lóticos. Isso pode ocorrer em função do ambiente lêntico consistir em *habitat* preferencial dos prováveis transmissores de *Trypanosoma* spp. (SCHLENZ & TAKEDA, 1993), ou mesmo favorecer o contato entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Além disso, no Pantanal, ocorre um maior agrupamento de indivíduos aquáticos e semi-aquáticos durante o período de seca, quando secam as diversas lagoas temporárias e diminui-se o nível de água de alguns rios. Com isso, há um aumento da competição intra e interespecífica, da predação e do estresse, com conseqüente queda na imunidade destes indivíduos. Estes fatores podem contribuir para facilitar a transmissão de parasitos. Quando ocorrem alterações ambientais, com reflexo nos mecanismos de defesa de animais parasitados, estes podem manifestar sintomas de enfermidades (PAVANELLI et al., 2002).

O sucesso do estilo de vida parasitário é atestado pela ubiqüidade dos parasitos, em hospedeiros de todos os filios, e na estabilidade a longo termo de muitas relações parasito-hospedeiro (WAKELIN, 1984). Segundo BEGON et al. (1996) cada hospedeiro é um ambiente heterogêneo – uma matriz de *habitats* potenciais - e cada parasito é especializado em um nicho particular, pois são adaptados às condições nele presentes. As analogias ecológicas falham, quando se considera que o ambiente provido pelo hospedeiro não é passivo, mas pode reagir adaptativamente à presença do parasito. Mesmo em um ambiente onde estão perfeitamente adaptados, os parasitos enfrentam uma variedade de fatores potencialmente destrutivos nunca experimentados pelas espécies de vida livre, como anticorpos, componentes do complemento, citocinas e células

fagocitárias. A habilidade de o parasito em evadir ou resistir a estas respostas adaptativas determina sua capacidade de sobreviver e reproduzir.

A infecção por parasitos tem considerável potencial em regular ou restringir o crescimento de uma população de hospedeiros vertebrados em condições naturais, sendo responsável, pelo menos em parte, pela redução de sua sobrevivência, fecundidade, crescimento e habilidade competitiva. Além disso, podem alterar o padrão de comportamento dos hospedeiros de forma a escapar, controlar ou eliminar parasitos (HART, 1992).

O Pantanal Sul Mato-grossense compreende uma área de aproximadamente 140 mil km², susceptível a inundações periódicas, situado no sentido leste-oeste entre o meridiano 55° oeste e a fronteira do Brasil com Bolívia e Paraguai e no sentido norte-sul entre os paralelos 16° e 22° sul. É reconhecido como a maior planície inundável contínua do mundo, de clima marcadamente sazonal, com período de chuvas de outubro a abril e um período de seca de maio a setembro. Segundo AMARAL FILHO (1986), o período e intensidade das cheias é variável de ano para ano. A região ocupa cerca de 35% da superfície da Bacia do Alto Paraguai (SÚAREZ et al., 2001) e a altitude varia de 165 a 83 metros acima do nível do mar, apresentando uma topografia plana e de pouca declividade, circundada por planaltos com altitude superior a 400 metros. A vegetação é formada por matas sub-perenifólias, vegetação de cerrado, savanas arbustivas, matas e campos (SILVESTRE FILHO & ROMEU, 1974). O ciclo anual de cheia e seca é o fenômeno ecológico mais importante da planície, desempenhando papel preponderante na ciclagem de nutrientes e na disponibilidade de água. A área de abrangência da inundação e o tempo de permanência das águas nos campos regem a disponibilidade de *habitat* e alimentação para organismos aquáticos e semi-aquáticos, condicionando sua distribuição, abundância, modo de vida e comportamento reprodutivo (CALHEIROS & FERREIRA, 1997).

Além das enchentes anuais, ocorrem períodos plurianuais com enchentes mais expressivas, que podem variar em intervalos de dois a vinte e seis anos.

Estes períodos são menos previsíveis que o ciclo anual de enchente/vazante, com fases de anos de grandes enchentes seguidas por outros menos úmidos, que devem afetar de forma marcante a estrutura e dinâmica populacional de animais e plantas no Pantanal (CALHEIROS & FERREIRA, 1997).

Todo este sistema é drenado pelo rio Paraguai; e seus principais afluentes são os rios Jaurú, Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Negro, Miranda e Apa. A fauna do Pantanal, também é reflexo dos biomas que o circundam, sendo rara a existência de espécies endêmicas (WILLINK et al., 2000).

III- Material e Métodos

3.1- Área de estudo

O estudo foi realizado no Pantanal Sul Mato-grossense, na sub-região do Miranda-Abobral, município de Corumbá/MS, onde a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul possui uma unidade denominada Base de Estudos do Pantanal (BEP), localizada nas coordenadas 19°34'36"S; 57°01'06"W. Os ambientes lênticos foram constituídos pelas lagoas, baías, áreas inundadas e depressões formadas ao longo da rodovia MS-184 pela retirada de terra para a construção de aterros. Os ambientes lóticos foram representados pelos rios Negro e Miranda, afluentes do rio Paraguai, e os rios Abobral e Vermelho, que na verdade são grandes cursos d'água ou vazantes que têm sua origem nas águas do rio Negro, numa região conhecida como "Brejão do Negro".

Durante a realização deste trabalho, foi realizada uma coleta de sangue em uma fazenda localizada no município de Miranda, onde jacarés-do-Pantanal são criados em cativeiro, pelo sistema conhecido como "ranching" (CAMPOS et al., 2005). Este sistema consiste na coleta de ovos diretamente da natureza, criação dos jovens até a fase de abate e devolução ao ambiente natural de uma parcela dos jovens. Também nessa mesma fazenda foram amostrados jacarés, em uma lagoa isolada.

3.2- Captura dos jacarés

As coletas foram realizadas nos ambientes em períodos de seca, pois nestas condições a captura e contenção dos animais são facilitadas pela maior exposição e visualização. MONTAGUE (1983) concluiu que, mudanças sazonais no nível de água tem um marcado efeito no número de crocodilianos encontrados.

Os jacarés foram capturados com laço apropriado (Fig. 1). Para cada animal capturado foi registrado o local, medidos o comprimento rostro-cloacal e total, peso. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, na região sagital do tórax, na junção da décima linha de placas esternais, em tubos com sistema Vacutainer™, com anticoagulante (EDTA 4%) e encaminhados ao laboratório para diagnóstico. Para alguns jacarés, foram coletadas duas amostras de sangue: uma como descrito acima, e outra em tubos sem anticoagulante.

Todos os animais capturados foram sistematicamente vistoriados à procura de ectoparasitos que, quando presentes, foram coletados e fixados em álcool 70°GL.

Alguns exemplares de sanguessugas foram mantidos vivos em condições de laboratório com troca de água periódica, com finalidades de pesquisa das formas intermediárias e metacíclicas de *Trypanosoma* sp.

Após os procedimentos citados os jacarés foram libertados no próprio local de captura.



Figura 1. Forma de captura de *Caiman yacare*.

3.3- Diagnóstico parasitológico do sangue

As amostras foram analisadas pela técnica descrita por Woo (1969), conhecida como técnica do microhematócrito, para diagnóstico das formas sangüíneas de *Trypanosoma* spp. Esta técnica consiste na centrifugação do sangue com anticoagulante durante cinco minutos, em tubos capilares (75mm de comprimento, 1,4-1,6mm de diâmetro, 80 microlitros de volume) a 10.000 rpm, velocidade nominal. As formas sangüíneas podem ser imediatamente visualizadas, quando presentes, na região acima da camada leucocitária, em microscópio óptico com aumento total de 100 X. A parasitemia foi avaliada durante a observação ao microscópio, onde, quando se observava de um a três tripanossomas, era considerada baixa, de quatro a seis tripanossomas, média e acima de seis tripanossomas, alta. Ainda por esta técnica, também foram medidos

os volumes globulares médios (VG), um índice útil na classificação das anemias. As amostras de sangue coletadas sem anticoagulante foram analisadas pelo método de STROUT (1962) com as seguintes modificações: após a coleta do sangue, os tubos foram mantidos em posição inclinada até a retração do coágulo. Em seguida, parte do soro foi transferida para tubos de microcentrífuga, com capacidade para 2,5 ml, e centrifugada a 3.500 rpm (60 G) por 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão e homogeneizado. Deste material foram confeccionados esfregaços, posteriormente fixados com metanol e corados por Giemsa. Este método foi utilizado com o objetivo de concentrar os parasitos, eventualmente presentes no sangue.

Foram ainda confeccionados esfregaços do sangue total, fixados com metanol e corados por Giemsa, os quais foram examinados para estudos morfométricos. Os parâmetros mensurados foram: comprimento total incluindo o flagelo livre (BL), distância da extremidade posterior do corpo à extremidade anterior (PA), distância da extremidade posterior do corpo ao cinetoplasto e ao núcleo (PK e PN, respectivamente), distância do cinetoplasto ao núcleo (KN), distância do cinetoplasto e núcleo à extremidade anterior (KA e NA), largura do núcleo (LN) e comprimento do flagelo livre (FF). O índice nuclear (NI) foi calculado pela razão entre as medidas de distância da extremidade posterior ao núcleo e da distância do núcleo à extremidade anterior (PN/NA). O cálculo do índice do cinetoplasto foi feito pela divisão dos valores da distância da extremidade posterior ao núcleo pela distância do cinetoplasto ao núcleo (PN/KN).

A determinação das medidas foi realizada em microscópio acoplado a um sistema para digitalização de imagens e processadas por um programa de computador, Kantron Eletronik KS 400 TM, version 2.00 – 1995, estimando as medidas em micrômetros (μm).

Parte de cada amostra do sangue coletado foi inoculada em meio de cultura NNN e enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos Flagelados do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

3.4- Hospedeiros Invertebrados

Os espécimes de sanguessugas recolhidos, quando da captura, foram dissecados em períodos variáveis de tempo, entre 5 e 20 dias após a captura, e suas porções fixadas em lâmina pelo método de impressão de tecidos (“*imprints*”), fixados com metanol e corados por Giemsa e examinadas em busca de formas de *Trypanosoma* spp. Ainda foram feitos cortes histológicos, corados por hematoxilina-eosina, para visualização de possíveis formas parasitárias em evolução, bem como sua localização nos tecidos do hospedeiro invertebrado.

3.5- Estudos histopatológicos

Após a coleta de sangue, seis jacarés foram retidos para necrópsia, tendo coletadas amostras de tecidos (fígado, pulmão, coração, rim e baço), que foram fixadas em solução de formalina a 10% e processadas para estudos histopatológicos em busca de lesões ou alterações teciduais compatíveis e relacionáveis ao parasitismo em estudo. Também foram confeccionadas lâminas de impressão de tecidos das mesmas amostras, fixadas com metanol e coradas por Giemsa.

3.6- Análises Estatísticas

Para calcular a prevalência de jacarés-do-Panatanal parasitados por *Trypanosoma* sp. foi considerada uma estimativa populacional de até 500 mil indivíduos na região de estudo (MOURÃO et al.,2000). Realizou-se o cálculo para uma prevalência estimada em $p=0,15$ e $\Delta=0,05$ como erro padrão, definindo-se o n amostral mínimo em 86 animais, para um intervalo de confiança de $P \leq 0.001$ (Epi Info™, Centers for Disease Control and Prevention USA).

A prevalência do parasitismo por *Trypanosoma* sp. foi avaliada pela razão entre o número de indivíduos parasitados e o número total da amostra. Este mesmo cálculo foi realizado para todas as categorias de tamanho.

Empregou-se o cálculo do índice de Correlação de Spearman para avaliar se a carga parasitária está relacionada ao tamanho e peso dos hospedeiros; este mesmo índice foi utilizado para verificar se há relação entre o volume globular médio dos jacarés e a intensidade do parasitismo; também foi empregada a Regressão Logística para verificar se a presença/ausência do parasito possui relação com o tipo do ambiente ou tamanho do hospedeiro. O teste U de Mann-Whitney foi usado para testar se há diferença na parasitemia dos jacarés, entre os ambientes lóticos e lênticos (ZAR, 1996).

IV- Resultados e Discussão

4.1 - Comparação das prevalências de *Trypanosoma* sp. em jacarés capturados em ambientes lênticos e lóticos:

Foram capturados e examinados para a presença de *Trypanosoma*, 129 jacarés no Pantanal Sul Mato-grossense, no período compreendido entre setembro de 2002 e setembro de 2005. Deste total, vinte e seis jacarés (20,1%) estavam parasitados por *Trypanosoma* sp., diagnosticados pela técnica de WOO (1969). Em ambientes lóticos a prevalência encontrada foi de 20,8% (9 / 45) e em ambientes lênticos de 20% (17 / 84). Análise pelo teste U de Mann-Whitney indica que a presença do parasitismo não está relacionada aos diferentes ambientes, lêntico ou lótico ($U=1222,5$; $p=0,82$). A proximidade dos valores das prevalências avaliadas em ambientes lênticos e lóticos, provavelmente se deve à grande capacidade de deslocamento dos jacarés e alternância entre estes *habitats*. Segundo CAMPOS (2002, 2003), os movimentos observados em jacarés-do-Pantanal acontecem não só entre as áreas de rios e lagoas, mas também dentro destas áreas durante todo o ano, e parece ocorrer tanto em resposta a distúrbios, como também pode estar relacionado ao comportamento reprodutivo ou disponibilidade de alimento.

NUNES & OSHIRO (1990), relatam uma prevalência de 46% para tripanossomas, através da técnica de WOO, em 50 jacarés amostrados na região da Nhecolândia. Apesar desses autores não informarem as características do ambiente estudado, esta freqüência sugere que tenham capturado os animais em

ambientes lânticos perenes e isolados, os quais favorecem a permanência dos jacarés, diminuindo a necessidade de deslocamento em razão das mudanças climáticas sazonais, além de proporcionar um ambiente favorável à manutenção dos hospedeiros invertebrados, e transmissão da parasitose. A diferença entre a prevalência encontrada por estes autores e a obtida neste estudo, possivelmente está relacionada às características dos ambientes estudados, ou mesmo ao número e forma de amostragem. É possível que ocorra diferença entre as prevalências entre ambientes lânticos com características distintas. Em uma lagoa perene e isolada, amostrada neste estudo, foi encontrada uma prevalência de 55% para tripanossomas (5/9) nos jacarés capturados, sendo este resultado semelhante ao de NUNES & OSHIRO (1990), o que reforça esta hipótese.

Através do diagnóstico obtido pelo método de Woo, foram encontrados vinte e seis jacarés positivos para *Trypanosoma* sp., enquanto que em esfregaços sanguíneos este número foi bastante inferior, sendo encontradas apenas seis amostras positivas. Isto porque, nestas preparações poucos tripanossomas eram observados, mesmo naquelas colhidas em animais positivos e com alto escore pela técnica de Woo. Dos vinte e seis jacarés diagnosticados positivos pelos métodos de Woo, 82,76% foram classificados como baixa parasitemia; 6,90% com média e apenas 10,34% com alta, indicando que a parasitemia nos animais é reduzida na circulação periférica.

Estes resultados são semelhantes aos relatados por HOARE (1929), para crocodilos africanos, em que a parasitemia encontrada foi baixa, tanto em infecções naturais quanto experimentais, independente do número de tripanossomas introduzidos originalmente.

O comprimento rostro-cloacal (CRC) dos jacarés capturados variou de 33 a 127 cm. Como ainda não existe uma correlação entre a idade e tamanho de *Caiman yacare*, utilizou-se os critérios relatados por UETANABARO (1989), em que estabelece arbitrariamente nove classes de tamanho, de I a IX, considerando intervalos de 9,9 cm do CRC. Na classe I foram incluídos animais com tamanhos

compreendidos entre 30 e 39,9 cm, e na classe IX, indivíduos com tamanho igual ou superior a 110 cm.

Tabela 1- Prevalência da infecção por *Trypanosoma* sp. e hemogregarinas em jacarés do Pantanal, nas diferentes classes de tamanho.

CRC= Comprimento rostro cloacal, n= número de indivíduos; dp= desvio padrão

Classe de tamanho	CRC (cm)	CRC médio ± dp	n	Prevalência (%) de <i>Trypanosoma</i>	Prevalência (%) de hemogregarinas
I	30 – 39,9	36,16 ± 2,85	6	16,6	66,6
II	40 – 49,9	47,5 ± 1,94	5	0	100
III	50 – 59,9	56,23 ± 2,54	17	5,8	100
IV	60 – 69,9	63,92 ± 3,12	13	7,69	100
V	70 – 79,9	73,8 ± 2,9	16	18,75	100
VI	80 – 89,9	83,15 ± 3,05	13	38,43	100
VII	90 – 99,9	95,37 ± 3,29	8	12,5	100
VIII	100 – 109,9	103,4 ± 1,85	5	0	100
IX	> 110	119 ± 6,98	3	33,3	100

Utilizando o cálculo do índice de Correlação de Spearman, conclui-se que não há relação entre a parasitemia por tripanossomas e o comprimento rostro cloacal (CRC) dos jacarés ($r_s=0,19722$; $p=0,06$; $n=87$). Este resultado indica que esta parasitose pode ser adquirida em qualquer fase da vida dos *Caiman yacare*. Também não houve significância no resultado da análise de Regressão logística entre a presença de *Trypanosoma* sp. e o comprimento total (CT) ($\chi^2=2,8770$; $p=0,089$), comprimento rostro cloacal (CRC) ($\chi^2=2,6440$; $p=0,10395$), ou com o peso ($\chi^2= 0,50556$; $p=0,48$) dos jacarés. O volume globular (VG) observado nas

amostras variou entre 12 e 47 com média de 20,57 e, também, não apresentou relação à intensidade do parasitismo ($r_s=0,01903$; $p=0,87$; $n=75$).

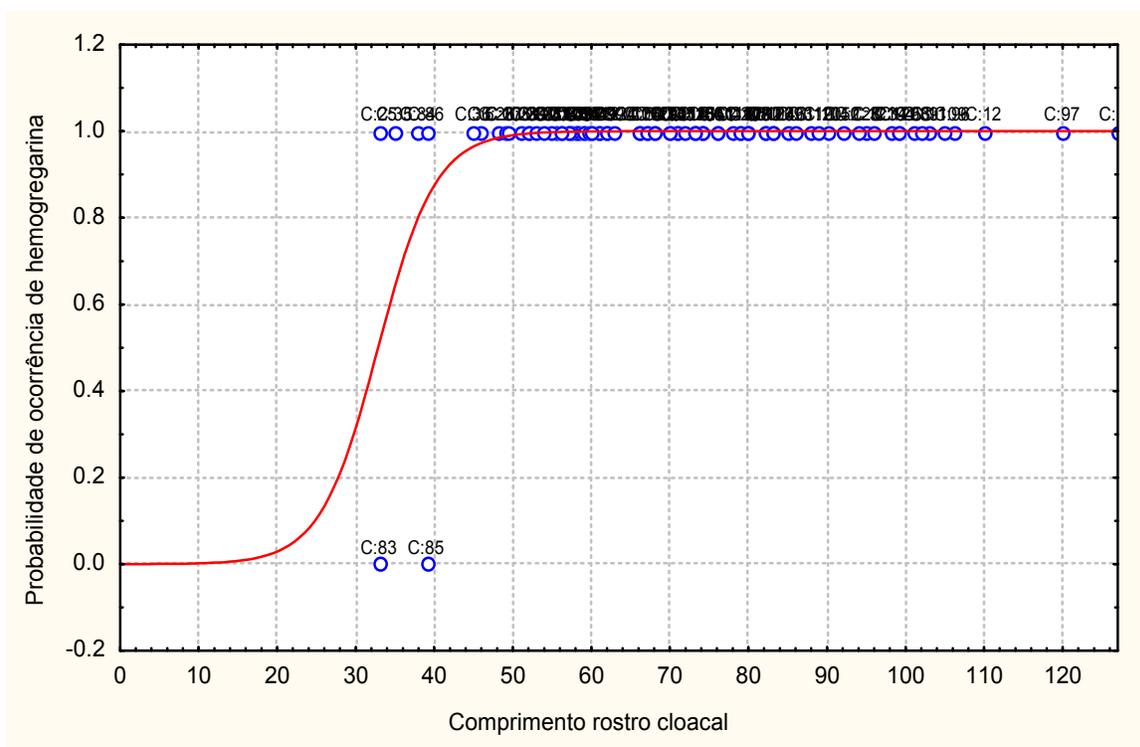
Em animais criados em cativeiro, foram examinadas 16 amostras de sangue de jacarés com idade variando de 6 a 15 meses. Todos os foram negativos para *Trypanosoma* pela técnica de Woo, sugerindo que a transmissão não ocorre na ausência do hospedeiro invertebrado, pelas condições de tratamento e higiene dos tanques. Estes resultados reforçam as evidências de que a transmissão da parasitose é feita por sanguessugas, uma vez que estes organismos não estavam presentes nos tanques protegidos e, por outro lado, a exposição dos animais à insetos hematófagos, tais como tabanídeos e mosquitos, era evidente.

No exame das amostras, foi diagnosticada a presença de hemogregarinas em 98,44% (127/129) dos jacarés examinados pela técnica de Woo e, principalmente, pelos esfregaços sangüíneos. Nos exames dos microhematócritos foram visualizados gametócitos livres em 48,8% das amostras (63/129). No entanto, nas preparações dos esfregaços corados, estas foram encontradas com pouca freqüência. Nas preparações coradas, houve predominância de gametócitos intraeritrocíticos (127/129). Até o presente, ainda não foi possível caracterizar a espécie de hemogregarina. Entretanto, LAINSON et al. (2003) descreve como *Hepatozoon caimani* em *Caiman crocodilus* e relatam que, em infecções experimentais, a transmissão pode ser conseguida através de mosquitos e rãs, porém, em condições naturais, podem estar envolvidos outros hospedeiros intermediários. Considerando que para jacarés-do-Pantanal, os anfíbios anuros não constituem um item importante na dieta (UETANABARO, 1989), é improvável que estes sejam os principais hospedeiros invertebrados dessa parasitose no Pantanal, haja vista a alta prevalência observada neste estudo.

Em *Alligator mississippiensis*, a transmissão de hemogregarinas é atribuída à sanguessugas *Placobdella multilineata* (KHAN et al., 1990). No entanto, LAINSON et al. (*loc cit*) relatam que não foi possível, experimentalmente, a transmissão de *Hepatozoon caimani*, através desses organismos, para *Caiman crocodilus*. Nas

análises dos esfregaços de aposição de sanguessugas obtidos neste estudo, puderam ser visualizados gametócitos intraeritrocíticos no conteúdo intestinal das mesmas, porém não foram encontradas formas de hemogregarinas em evolução.

De maneira semelhante à tripanossomíase, a frequência da infecção por estes parasitos não apresentou diferença estatística entre os tipos de ambientes – lânticos e lóticos. Os resultados apresentados na Figura 2, mostram que a probabilidade dos jacarés adquirirem a infecção é maior em animais com medidas superiores a 30 cm de CRC.



4.2- Caracterização de *Trypanosoma* sp. por morfometria

4.2.1- Esfregaços sanguíneos

Nos esfregaços sanguíneos corados, a presença de *Trypanosoma* é rara mesmo naquelas amostras com alto escore parasitário apresentado pela Técnica de Woo. Elas apresentaram forma de “C”, com membrana ondulante bem conspícua e desenvolvida, extremidades anterior e posterior afiladas, núcleo ocupando toda a largura do corpo, cinetoplasto em posição marginal a submarginal, localizado mais próximo à extremidade posterior (índice médio do cinetoplasto: 1,69) (Tabela 2) e citoplasma com vacúolos dispersos ao longo do corpo. O comprimento médio do corpo encontrado foi de 48,01 μm e a largura do núcleo com 3,40 μm (Tabela 2). Na maioria dos espécimes não foi possível a visualização do cinetoplasto, pois este não se corou adequadamente, entretanto a região do bolso flagelar esteve sempre bem evidente. A conformação em forma de “C”, faz com que as extremidades posterior e anterior se apresentem sobrepostas (Fig. 3A), o que impossibilita a visualização do flagelo livre, bem como a mensuração do mesmo. Assim, não foi possível obter medidas do comprimento do flagelo e comprimento total destes parasitos. Apesar das medidas obtidas neste estudo não serem coincidentes, em sua totalidade, com aquelas reportadas por NUNES & OSHIRO (1990), as características morfológicas são bastante semelhantes, e permitem assumi-los como da mesma espécie.

4.2.2 – Esfregaços de Soro

Os tripanossomas encontrados em preparações coradas por Giemsa, obtidas das amostras de sangue processadas pela técnica de STROUT (1962) modificada (Fig. 3B), apresentaram o corpo mais afilado e dobrado, geralmente em forma de “S”, isso permitiu a obtenção de algumas das medidas do flagelo e comprimento total, que estão apresentadas na Tabela 2. O núcleo também ocupou toda a largura do corpo, às vezes com regiões menos coradas, com largura média de 2,13 μm . O cinetoplasto sempre evidente e bem corado, também localizado

mais próximo à extremidade posterior (índice médio do cinetoplasto: 1,75). As medidas dos tripanossomas obtidos pela técnica de STROUT, em média, apresentaram algumas diferenças em relação às encontradas nos esfregaços de sangue total, entretanto, o desvio padrão encontrado em ambas as amostras foi elevado. Além de prover um maior número de parasitos disponíveis para mensuração, este método aumenta a sensibilidade dos diagnósticos, pois permite concentrar os parasitos usando maior quantidade de sangue.

Mesmo considerados como da mesma espécie, as medidas de tripanossomas obtidas pelos diferentes métodos, WOO e STROUT, não foram agrupadas nas análises, em razão da possível influência das alterações morfológicas resultantes da centrifugação.

As diferenças entre as médias das medidas obtidas neste estudo e aquelas relatadas por NUNES & OSHIRO (1990), podem ser, em parte atribuídas ao método utilizado para as mensurações. Também, pode-se observar uma grande amplitude entre valores mínimos e máximos, e sobreposição entre estes valores, o que indica que não há diferenças estatísticas entre as medidas.

Na Tabela 2 encontram-se sumarizados os valores das medidas obtidas nesse estudo, comparadas com outras medidas de tripanossomas de outros crocodilianos.

4.2.3 – Impressão de tecidos

Dois jacarés com diagnóstico positivo para tripanossomas pela técnica de Woo (1969) foram necropsiados e neles foram encontradas formas tripomastigotas em impressão de tecidos de rim, pulmão, coração, fígado e baço (Fig. 4). Estes tripanossomas apresentaram características morfológicas e biométricas muito distintas daqueles encontrados nos esfregaços sangüíneos, tais como: estriações na membrana, principalmente na região anterior ao núcleo, muitos vacúolos localizados na região posterior, membrana ondulante muito desenvolvida, núcleo pouco corado e localizado na parte posterior do corpo (índice nuclear NI = 0,63), citoplasma granuloso e fortemente corado em azul, porém o flagelo não foi corado

adequadamente em todos os espécimes. Apenas um exemplar apresentou flagelo conspícuo, permitindo a mensuração: 12,93 μm . Neste espécime, o comprimento total incluindo o flagelo livre foi de 66,33 μm ; o cinetoplasto localizado próximo ao núcleo (índice do cinetoplasto $KI= 5,26 \mu\text{m}$) e a área do bolso flagelar bastante evidente (Tabela 2).

Embora existam muitas semelhanças morfológicas entre os tripanossomas encontrados nos capilares internos de *Caiman yacare* e *Trypanosoma grayi*, parasito de crocodilianos africanos (Tabela 2), as diferenças entre as medidas, bem como a distância geográfica, não permitem assumir com segurança, que sejam da mesma espécie; o que exige o emprego de técnicas moleculares para a confirmação da espécie.

Tripanossomas com as mesmas características morfológicas daqueles observados em esfregaços obtidos pelo método de STROUT, também estavam presentes nas impressões de tecido, em pequeno número.

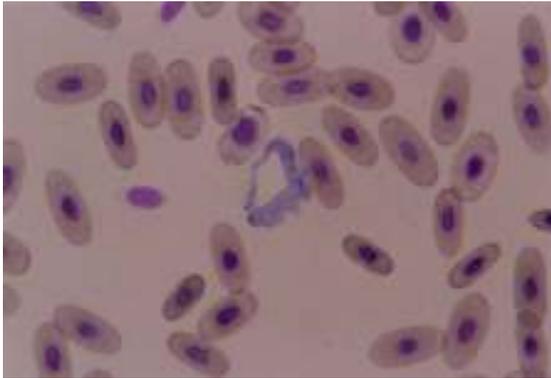
Segundo Woo (1963), a sensibilidade de técnicas de diagnóstico em tripanossomas de anfíbios anuros, varia com a espécie de tripanossoma. JONES & Woo (1989) relatam que impressões de rim são mais sensíveis para detecção de *T. chattoni* e *T. rotatorium* em anfíbios, e o sucesso desta técnica está diretamente relacionado ao tamanho do parasito, enquanto que a sensibilidade da técnica de centrifugação em microhematócrito pode ser relacionada à gravidade específica, tamanho e motilidade dos tripanossomas: parasitos grandes podem sedimentar com as células sanguíneas e dificultar a detecção por esta técnica. Neste estudo, o morfotipo 2 foi observado mais prontamente em impressões de tecido, enquanto que o morfotipo 1 encontrado principalmente nos esfregaços sanguíneos. A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que, a utilização concomitante de mais de uma técnica de diagnóstico poderia oferecer dados de prevalência mais acurados para tripanossomas em jacarés-do-Pantanal. Entretanto, a utilização da técnica de centrifugação em microhematócrito é mais fácil, rápida e menos invasiva que a técnica de impressão de tecidos.

Vale a pena relatar, que os resultados das colorações são bastante variáveis, mesmo em lâminas coradas ao mesmo tempo e sob as mesmas condições.

Tabela 2- Dados comparativos de mensuração dos tripanossomas obtidos em *Caiman yacare* (morfotipo 1: formas encontradas nos esfregaços de sangue e soro; morfotipo 2: forma encontrada nas impressões de tecidos), *Trypanosoma* sp. (NUNES & OSHIRO, 1990) e *Trypanosoma grayi* (HOARE, 1931)

PK= Distância da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN= distância do cinetoplasto ao núcleo; PN= distância da extremidade posterior ao núcleo; NA= distância do núcleo à extremidade anterior; PA= distância entre as extremidades anterior e posterior; FF= comprimento do flagelo livre; BL= comprimento total; NI= índice nuclear; KI= índice do cinetoplasto; NW= largura do núcleo.

	Morfotipo 1	Morfotipo 1	Morfotipo 2	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>T. grayi</i>
	Esfregaço	Esfregaço de	Impressão de		
	sanguíneo	soro	tecidos		
PK	10,05 (±3,59)	12,67 (±2,05)	18,01 (±5,02)	8,3 (±2,08)	19,5
KN	14,65 (±2,56)	17,04 (±2,15)	4,71 (±1,35)	16,7 (±2,5)	3,5
PN	24,90 (±5,06)	29,71 (±3,57)	22,72 (±4,94)	25,7 (±4,1)	23,3
NA	23,11 (±3,41)	23,07 (±3,78)	36,60 (±5,56)	24,4 (±3,6)	38,32
PA	48,01 (±3,60)	52,77 (±6,23)	59,32 (±8,27)	48,8 (±6,4)	61,62
FF	-	8,56 (±3,50)	12,93	8,3 (±1,7)	14,28
BL	-	61,77 (±5,58)	66,33	57,1 (±8,8)	75,9
NI	1,13 (±0,45)	1,31 (±0,22)	0,63 (±0,15)	1,1 (±0,1)	0,61
KI	1,69 (±0,24)	1,75 (±0,12)	5,26 (±1,63)	1,6 (±0,2)	6,66
NW	3,40 (±0,83)	2,13 (±0,52)	4,91 (±1,37)	2,9 (±0,7)	



A



B

Figura 3. Formas sanguíneas de *Trypanosoma* sp. encontradas em esfregaços de sangue total (A) e soro (B).

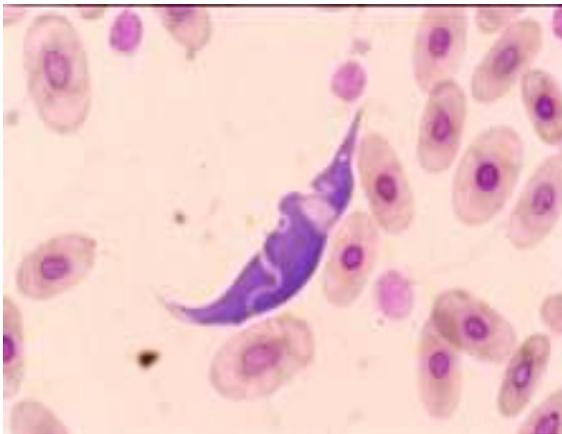


Figura 4. Formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. obtidas a partir de impressão de tecidos de *Caiman yacare*.

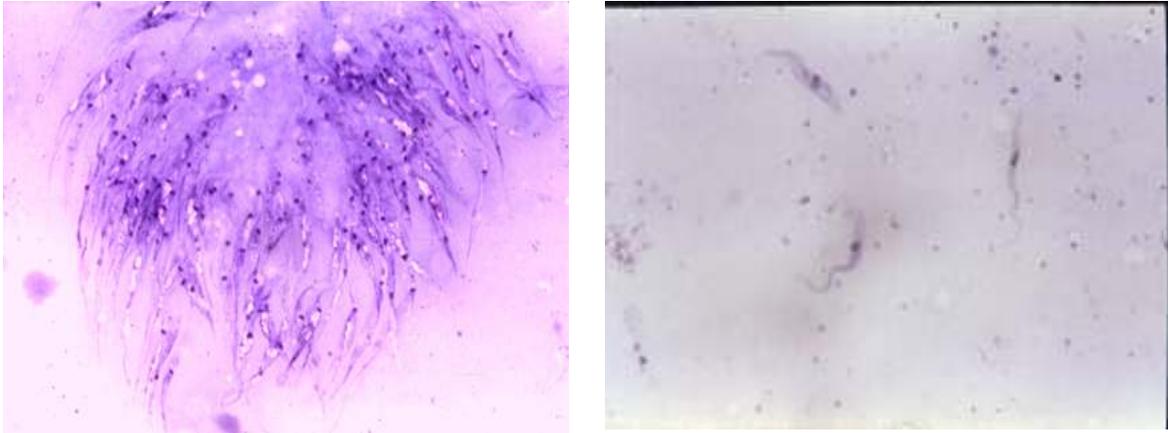


Figura 4. Formas epimastigotas encontradas em esfregaços de aposição de *Placobdella* spp.

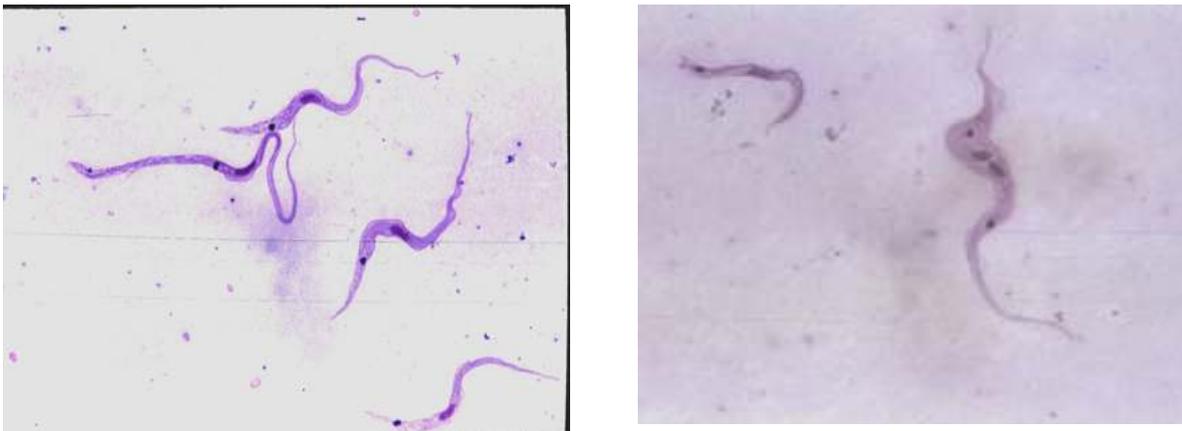


Figura 5. Formas tripomastigotas encontradas em impressão de tecidos de *Placobdella* spp.

4.2.4- Cortes histológicos

Não foi encontrada nenhuma evidência de formas de desenvolvimento intracelular de *Trypanosoma* nos cortes de tecidos examinados. Este resultado se assemelha ao de WALLIKER (1965), que apesar de ter encontrado formas adultas de *T. superciliosae* abundantemente distribuídas nos sinusóides do fígado de

Uranoscodon superciliosa, não detectou outras formas em cortes de tecido, e atribui este fato ao tamanho do parasito.

Também não foram encontradas alterações teciduais que possam ser atribuídas à tripanossomíase, sendo sugestivo que as espécies encontradas em jacarés-do-Pantanal não são patogênicas. Estes resultados coincidem com aqueles de HOARE (1931), que relata, em estudos experimentais, que nenhum dos crocodilos infectados experimentalmente com *T. grayi* apresentaram sintomas ou qualquer sinal de desconforto, independente do número de tripanossomas presentes no inóculo.

4.3- Análise do(s) hospedeiro (s) invertebrados (s)

A maioria dos jacarés capturados estava parasitada por sanguessugas do gênero *Placobdella* spp. (Hirudinea : Glossiphoniidae); sendo observado, em alguns indivíduos, intenso parasitismo. A região do corpo dos jacarés onde houve maior captura de hirudíneos foi a mucosa oral (Fig.6), aderidas firmemente e em grupos formando aglomerados com inúmeros indivíduos. Raramente foram encontradas aderidas entre as placas e regiões axilares. (Dados não quantificados).

Nas sanguessugas mantidas nas condições do laboratório, foram encontradas formas epimastigotas (Fig. 4) e tripomastigotas (Fig. 5). Estas formas foram observadas em impressões de tecidos corados por Giemsa, em períodos variáveis de tempo de até 20 dias após a captura. Embora os flagelados observados apresentem um acentuado polimorfismo, não foi possível determinar uma série de estágios consecutivos pois, além de ocorrerem simultaneamente, não há como definir com precisão o tempo de infecção, visto que todas as *Placobdella* spp. foram retiradas diretamente da natureza.

As formas tripomastigotas encontradas nas impressões de tecidos corados por Giemsa, foram encontradas em sanguessugas que já haviam digerido o

sangue presente no intestino. Estes tripomastigotas apresentaram o corpo delgado e longo, e algumas formas em divisão, detectadas a partir de 5 dias após a coleta, em sanguessugas com pouco ou nenhum conteúdo intestinal. As formas epimastigotas foram visualizadas em grande número e com uma ampla variação, tanto nos aspectos morfológicos quanto no tamanho.

MARTIN & DESSER (1991) relatam que o tempo de desenvolvimento para estágios metacíclicos de *T. fallisi* em *Desserobdella picta*, varia grandemente e está relacionado ao tempo de digestão do sangue presente no intestino; pois, indivíduos adultos podem demorar até 6 meses para digerir o sangue ingerido e as formas epimastigotas e transitórias podem permanecer nestas condições até que a digestão seja completada.

Para facilitar a visualização das formas de tripanossomas nas sanguessugas, foi acrescentado soro de cavalo ao conteúdo do intestino, quando do corte para impressão de tecidos. As formas visualizadas nessas preparações mostraram pouca variabilidade em tamanho e forma. Foram encontradas formas epimastigotas semelhantes àquelas descritas por HOARE (1931) como largas nas infecções com *T. grayi*. O cinetoplasto apresentou corado em roxo, posterior e justaposto ao núcleo, o citoplasma fracamente corado e com grânulos refringentes próximos à extremidade posterior. Woo (1969), relata o encontro de grânulos amarelos em estágios de desenvolvimento de *T. canadensis* em *Placobdella* sp, na região posterior do corpo e sugere que sejam característicos dessa espécie. Entretanto, nesse estudo estes grânulos foram detectados apenas nas preparações às quais foi adicionado soro de cavalo e foram consideradas como artefatos da técnica.

UETANABARO (1990) relatou o encontro de sanguessugas no conteúdo estomacal de jacarés e considerou que a ingestão ocorreu acidentalmente. Isso sugere que a transmissão dos tripanossomas pode se dar também por via contaminativa. HOARE (1929) demonstrou que a infecção de crocodilos por *T. grayi* ocorre por contaminação da membrana mucosa da boca. Em jacarés-do-Pantanal, provavelmente a infecção também se dá através da via contaminativa pela

ingestão das sanguessugas ou destas aderidas a peixes, como é sugerido por CHIA & MILLER (1984) para *T. hidrae*, parasito de cobras e também transmitido por sanguessugas.

Embora BARROS (1996), tenha observado que *Phaeotabanus fervens*, (Diptera: Tabanidae), exibe especificidade por jacarés, sugerindo que estes sejam transmissores de tripanossomas. No entanto, este mesmo autor relata que, não foi possível capturar estes dípteros, mesmo usando jacarés como isca.

Considerando que sanguessugas podem parasitar outros indivíduos de diferentes espécies, existe a possibilidade da ocorrência de infecções mistas, tanto da(s) espécie(s) de tripanossoma encontrada(s) nos jacarés, como também de tripanossomas que parasitam outros vertebrados, ou mesmo tripanossomatídeos exclusivos de sanguessugas e sem nenhuma conexão com vertebrados. Para o esclarecimento destas questões, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos experimentais e moleculares sobre a transmissão desses parasitos.

Entre os jacarés capturados, apenas um indivíduo apresentou parasitado por carrapato *Amblyomma rotundatum* (KOCH, 1844), identificado segundo proposto por GUIMARÃES et al. (2001), no início da estação seca. Essa espécie encontra-se amplamente distribuída, na América Central e do Sul, tendo como hospedeiros répteis e anfíbios (EVANS et al., 2000), e raramente observada em animais de sangue quente (GUIMARÃES et al., *loc cit*). RAINWATER et al. (2001), considera que os crocodilianos podem ser parasitados por carrapatos durante os deslocamentos em terra. O encontro de apenas um espécime em um período de três anos de observação, indica que carrapatos não podem ser considerados parasitos habituais de jacarés, e sim acidentais, como também não devem causar um impacto negativo nas populações dos mesmos.



Figura 5. Sanguessugas *Placobdella* spp. aderidas à mucosa oral de jacaré-do-Pantanal, *Caiman yacare*.

V- Conclusões

Em Jacarés do Pantanal, *Caiman yacare*, a prevalência para *Trypanosoma* sp. é de 20,1%. Não há diferença entre os índices de prevalência de *Trypanosoma* nos diferentes ambientes, lântico e lótico.

A presença do parasitismo por *Trypanosoma* sp. não está relacionado ao peso ou tamanho dos jacarés.

Ocorre dois morfotipos de *Trypanosoma* parasitando jacarés-do-Pantanal, entretanto, através dos estudos histopatológicos, não constatou-se qualquer manifestação patogênica relacionável ao parasitismo. O morfotipo-1, é encontrado em maior número na circulação periférica, e o morfotipo-2 encontrado principalmente nos capilares internos.

A parasitemia encontrada é muito baixa, e não apresenta relação ao tipo do ambiente, peso ou tamanho dos jacarés.

Ocorre parasitismo intenso por sanguessugas, *Placobdella* spp., em jacarés-do-Pantanal. Formas em desenvolvimento de *Trypanosoma* sp. são encontradas em *Placobdella* spp.

VI- Referências Bibliográficas

- AMARAL FILHO Z. P. 1986. Solos do Pantanal matogrossense. I Simpósio sobre recursos naturais e sócio - econômico do Pantanal. Departamento de Difusão de Tecnologia – EMBRAPA, anais: 91-103.
- BAKER, J.R. 1994. The origins of parasitism in the protists. **International Journal for Parasitology**, Oxford, **24**(8): 1131-1137.
- BARNES, R.D. 1990. Zoologia dos Invertebrados. 4ª edição. São Paulo. Editora Roca. 1179pp.
- BARROS, A.T.M. 1996. Seasonality of *Phaeotabanus fervens* (Diptera: Tabanidae) in the Pantanal region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **91**(2):159.
- BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J.C.; ESCH, G.W & SEED, J.R. 2001. Parasitism – The diversity and ecology of animal parasites. 1st edition. Cambridge University Press. 566pp.
- BEGON M.; HARPER, J.L. & TOWNSEND, C.R. 1996. Ecology – individuals, populations and communities. 3rd edition. Blackwell Science Ltd. 1068 pp.
- BRENER, Z. 1992. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. *In.*: Chagas Disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil. 271pp.
- CALHEIROS, D.F. & FERREIRA, C.J. 1997. Alterações limnológicas no rio Paraguai “Dequada” e o fenômeno natural da mortandade de peixes no Pantanal

Mato-grossense – MS. Corumbá: Embrapa – CPAP. Boletim de pesquisa 7. 48 pp.

CAMPOS, Z. 2002. Comportamento de termorregulação, movimento, área de uso e suas implicações para o manejo do jacaré do pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). Tese de Doutorado (UFMG). Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil. 115pp.

Campos, Z. 2003. Efeito do habitat na fecundidade das fêmeas, sobrevivência e razão sexual dos jovens de jacarés-do-Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (42). ISSN 1517-1981. EMBRAPA – Pantanal, Corumbá, MS.

CAMPOS, Z.; COUTINHO, M. & MAGNUSSON, W. E. 2003. Terrestrial activity of *Caiman* in the Pantanal, Brazil. **Copeia**, Washington, **3**: 628-634.

CAMPOS, Z.; MOURÃO, G. & COUTINHO, M. 2005. Avaliação de três modelos de manejo para jacaré-do-Pantanal. Comunicado Técnico (46), ISSN 1517-4875, EMBRAPA-Pantanal, Corumbá, MS.

CATTO, J.B 1991. Taxionomia e ecologia dos helmintos parasitos de *Caiman crocodilus yacare* (Crocodilia: Alligatoridae) no Pantanal Mato-Grossense. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Brasil. 148pp.

CHERRY, R.H. & AGER JR, A.L. 1982. Parasites of american alligators (*Alligator mississippiensis*) in south Florida. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **68**(3): 509-510.

CHIA, N.M. & MILLER, J.H. 1984. Morphological and developmental studies of the snake trypanosome *Trypanosoma hydrae* Ayala, Atkinson, Vakalis, 1983 in experimentally infected hosts and in culture. **Journal of Protozoology**, New York, **31**(2): 352-356.

- CHIARI, E. 1992. Diagnostic tests for Chagas' disease – Parasitological diagnosis
In.: Chagas Disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion
and clinical medicine. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil. 271pp.
- DOS REIS, G. A. 2000. Susceptible hosts: a resort for parasites right in the eye of
the immune response. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio
de Janeiro, **72**(1): 79-82.
- GLASSMAN, A. B.; HOLBROOK, T. W. & BENNETT, C. E. 1979. Correlation of leech
infestation and eosinophilia in Alligators. **The Journal of Parasitology**,
Lawrence, Kansas, **65**(2):323-324.
- GUIMARÃES, J.H., TUCCI, E.C. & BARROS-BATESI. 2001 Ectoparasitos de
Importância Veterinária. 1ª ed. São Paulo. Editora Plêiade. 218 pp.
- HAAG, J.; O'HUIGIN, C. & OVERATH, P. 1998. The molecular phylogeny of
tripanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria.
Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, **91**: 37-49.
- HART, B. L. 1992. Behavioural adaptations to parasites: an ethological
approach. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **78**(2): 256-
265.
- HOARE, C.A. 1929. Studies on *Trypanosoma grayi*. 2. Experimental transmission
on the crocodile. **Transactions of the Royal Society of Tropical
Medicine and Hygiene**, London, **23**(1): 39-55.
- HOARE, C. A. 1931. Studies on *Trypanosoma grayi* III. Life cycle in the tse-tse
fly and in the crocodile. **Parasitology**, London, **23**(4):449-484.
- HOARE, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph.
Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 60-79.

- JONES, S. R. M. & WOO P. T. K. 1989. Use of kidney impressions for detection of tripanossomes of anura. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, Kansas, **25**(3): 413-415.
- JONES, S. R. M. & WOO P. T. K. 1991. Culture characteristics of *Trypanosoma catostomi* and *Trypanosoma phaleri* from North American freshwater fishes. **Parasitology**, London, **103**: 237-243.
- JONES, S. R. M. & WOO P. T. K. 1992. Vector specificity of *Trypanosoma catostomi* and its infectivity to freshwater fishes. The **Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **78**: 87-92.
- JONES, S. R. M. & WOO P. T. K. 1993. Biology of *Trypanosoma burresoni* n. sp. from the american eel, *Anguilla rostrata*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **79**: 542-547.
- KHAN, R. A.; FORRESTER, D. J. GOODWIN, T. M. & ROSS, C. A. 1980. A haemogregarine from the american alligator (*Alligator mississippiensis*). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **66**(2):324-328.
- KOELLA, J.C. & RESTIF, O. 2001. Coevolution of parasite virulence and host life history. **Ecology Letters**, Oxford, **4**:207-214.
- LADDS, P.W.; MANGUNWIRJO, H.; SEBAYANG, D & DANIELS, P.W. 1995. Diseases in young farmed crocodiles in Irian Jaya. **The Veterinary Record**, London, **136** (5): 121-124.
- LADDS, P.W. & SIMS, L.D. 1990. Diseases of young captive crocodiles in Papua New Guinea. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, **67**(9): 323-330.
- LAINSON, R.; PAPERNA, I. & NAIFF. R.D. 2003. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **98**(1): 103-113.

- LEGER, L. 1904. *Comptes. Rendus de Seances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*. **56**: 615-617.
- LETCH, C. A. 1979. Host restriction, morphology and isoenzymes of some British freshwater fishes. *Parasitology*, London, **79**: 107-117.
- MARTIN, D.S. & DESSER, S.S. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*. A light and electron microscopic study. *Parasitology Research*, Berlin, **77**(1): 18-26.
- MASLOV, D. A. & SIMPSON, L. 1995. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitology Today*, Amsterdam, **11** (1): 30-32.
- MINCHIN, E.A. 1908. *Q. J. Microsc. Sci.* **52**: 159-260.
- MOMEN, H. 2001. Some current problems in the systematics of Trypanosomatids. *International Journal for Parasitology*, Oxford, **31**:640-642.
- MONTAGUE, J.J. 1983. Influence of water level, hunting pressure and habitat type on crocodile abundance in the Fly River drainage, Papua New Guinea. *Biological Conservation*, Barking, England, **26**: 309-339.
- MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P. & VICKERMAN, K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequenses and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, UK, **54**: 1861-1875.
- MOURÃO, G.; CAMPOS, Z.; COUTINHO, M. & ABERCROMBIE, C. 1996. Size structure of illegally harvested and surviving caiman, *Caiman crocodilus yacare*, in Pantanal, Brazil. *Biological Conservation*, Barking, England, **75**: 261-265.

- MOURÃO, G.; COUTINHO, M.; MAURO, R. ; CAMPOS, Z.; TOMAS, W. & MAGNUSSON, W. 2000. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. **Biological Conservation**, Barking, England, **92**: 175 – 183.
- NEGM-ELDIN, M.M. 1998. Further studies on *Trypanosoma mukasai* Hoare, 1932 and biological vector *Batracobdelloides tricarinata* (Blanchard, 1897). **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, **105** (5): 175-181.
- NUNES, V. L. B. & OSHIRO, E. T. 1990. *Trypanosoma* sp. em jacaré, *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Crocodylia: Alligatoridae). **Semina**, Londrina, **11**(1): 62-65.
- OLSEN, O. W. 1974. Animal Parasites – their life cycles and ecology. 3rd ed. University Park Press, Baltimore, Maryland. 562pp.
- OVERATH, P.; RUOFF, J.; STIERHOF, Y. D.; HAAG, J.; TICHY, H.; DYKOVÁ, I. & LOM, J. 1998. Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma carassii*, a common parasite of freshwater fish. **Parasitology Research**, Berlin, **84**: 343-347.
- OVERATH, P.; HAAG, J.; MAMEZA, M. G. & LISCHKE, A. 1999. Freshwater fish trypanosomes: definition of two types, host control by antibodies and lack of antigenic variation. **Parasitology**, London, **119**: 591-601.
- PAVANELLI, C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2 ed. Maringa, PR: Eduem, 305p.
- PESSÔA, S. B. & CAVALHEIRO, J. 1969. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VIII: sobre a evolução da “*Haemogregarina miliaris*” na sanguessuga “*Haementeria lutzii*”. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **29** (4): 451-458.
- PINHEIRO, M.S., ANDREOTTI E SILVA, R. & SANTOS, S.A. 2001. Observations on the Pantanal caiman (*Caiman crocodilus yacare*) hatchlings (Crocodylia: Alligatoridae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **61**(2): 323-327.

- RAINWATER, T.R.; PLATT, S.G.; ROBBINS, R.G. & MCMURRY, S. 2000. Ticks from a Morelet's crocodile in Belize. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, Kansas, **37**(4):836-839.
- SCHLENZ, E. & TAKEDA, A. M. 1993. Ocorrência de Hirudinea (Rhynchobdelliformes, Glossiphoniidae) na planície de inundação do Alto Rio Paraná. **Revista Unimar**, **15**: 53-63.
- SIDDALL, M. E. & DESSER, S. S. 2001. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech *Placobdella ornata*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **87**(5): 1217-1218.
- SIDDALL, M.E. & BURRESON, E.M. 1994. The development of a hemogregarine of *Lycodes raridens* from Alaska in its definitive leech host. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **80**(4): 567-575.
- SILVESTRE FILHO D. F. & ROMEU N. 1974. Características e potencialidades do Pantanal Matogrosense. *IPEA – Instituto de Planejamento Econômico e Social, Brasília, DF.*
- STEVENS, J. & GIBSON, W. 1999a. The evolution of Salivarian trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **94**: 225-228.
- STEVENS, J. R., TEIXEIRA, M. M. G., BINGLE, L. E. H. & GIBSON, W. C. 1999b The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, **29**: 749-757.
- STEVENS, J. R., NOYES, H. A, SCHOFIELD, C. J. & GIBSON, W. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, London, **48**: 1-56.
- STROUT, R.G. 1962. A method for concentrating hemoflagellates. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **48**(1): 100.

- SÚAREZ, I. R.; NASCIMENTO, F. L. & CATELLA, A. C. 2001. Alimentação do tucunaré *Cichla sp.* (Pisces, Cichlidae) – um peixe introduzido no Pantanal, Brasil. Corumbá: Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa 23. 21 pp.
- THORBJARNASON, J. 1999. Crocodile tears and skins: international trade, economic constraints, and limits to the sustainable use of crocodilians. **Conservation Biology**, Boston, **13**(3): 465-470.
- UETANABARO, M. 1989. Hábito alimentar de *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia, Alligatoridae) no Pantanal Sul Mato-grossense. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, Brasil. 79pp.
- VICKERMAN, K. 1976. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In Biology of the Kinetoplastida. W. H. R., Lumsden, and D. A. Evans (eds.). Academic Press, New York, NY, USA, p. 1-34
- VICKERMAN, K. 1994. The evolutionary expansion of trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, Oxford, **24**: 1371-1331.
- WAKELIN, D. 1984. Immunity to Parasites: how animals control parasitic infections. Routledge, Chapman & Hall, Inc. 165 pp.
- WALLIKER, D. 1965. *Trypanosoma superciliosae* sp.nov. from the lizard *Uranoscodon superciliosa* L. **Parasitology**, London, **55**: 601-606.
- WILLINK, P.W., FROEHLICH, O., MACHADO-ALLISON, A., MENEZES, N.A., OYAKAWA, O.T., CATELLA, A.C., CHERNOFF, B., LIMA, F.C.T., TOLEDO PIZA, M., ORTEGA, H., ZANATA, A.M. & BARRIGA, R. (2000). Diversidade, Distribuição, e Habitats Críticos dos Peixes dos Rios: Negro, Negrinho, Taboco, Taquari e Miranda, e sua Importância para Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. In Willink, P.W., Chernoff, B., Alonso, L., Montambault, J.R. & Lourival, R. In: Uma Avaliação Biológica dos Ecossistemas Aquáticos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International, Washington.

- WISE, M.R.; JANOVY, J.J. & WISE, J.C. 2000. Host specificity in *Metamera sillasenorum*, n. sp., a gregarine parasite of the leech *Helobdella triserialis* with notes on transmission dynamics. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **6**(3): 602-6.
- Woo P.T.K. 1969a. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, **47**:921-3.
- Woo P.T.K. 1969b. The development of *Trypanosoma canadensis* of *Rana pipiens* in *Placobdella* sp. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, **47**: 1257-125.
- Woo P.T.K. 1983. Sensitivity of diagnostic techniques in determining the prevalence of anuran trypanosomes. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, Kansas, **19**(1): 24-26.
- Woo, P.T.K. & BLACK, G.A, 1984. *Trypanosoma danilewsky*: host specificity and host's effect on morphometrics. **Journal of Parasitology**, Lawrence, Kansas, **70**: 788-793.