

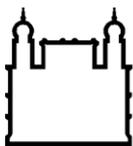
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DIVERSIDADE DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM PEQUENOS
MAMÍFEROS PROVENIENTES DA ESTAÇÃO BIOLÓGICA
FIOCRUZ DA MATA ATLÂNTICA, RIO DE JANEIRO/RJ.

ALICE PEREIRA BERBIGIER

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALICE PEREIRA BERBIGIER

Diversidade de tripanosomatídeos em pequenos mamíferos provenientes da Estação Biológica FIOCRUZ da Mata Atlântica, Rio de Janeiro/RJ.

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

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2020

Pereira Berbigier , Alice .

Diversidade de tripanosomatídeos em pequenos mamíferos provenientes da Estação Biológica FIOCRUZ da Mata Atlântica, Rio de Janeiro/RJ. / Alice Pereira Berbigier . - Rio de Janeiro, 2020.

83 f.

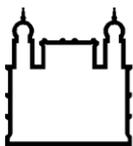
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 59-66

1. Tripanosomatídeos . 2. Diagnóstico Molecular. 3. Pequenos Mamíferos . 4. Mata Atlântica . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ALICE PEREIRA BERBIGIER

Diversidade de tripanosomatídeos em pequenos mamíferos provenientes da Estação Biológica FIOCRUZ da Mata Atlântica, Rio de Janeiro/RJ.

ORIENTADOR: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Aprovada em: 27/02/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila	Presidente e Revisora (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Helena Keiko Toma	Membro Externo (UFRJ)
Prof. Dra. Rosana Gentile	Membro Interno (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dra. Aline dos Santos Garcia Gomes	Suplente Externo (IFRJ)
Prof. Dra. Helena Lúcia Santos Carneiro	Suplente Interno (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2020.

À Judith...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que eu tenha chegado até aqui...

À minha mãe, Vanda, por sempre me apoiar...

Ao Fernando por estar ao meu lado em todos os momentos...

A todos do antigo SEBRE (Gerson, Gentil, Adriana, Jade e Pamela) por me darem a primeira oportunidade nesta área científica...

A todos do LABTRIP, em especial, a Dr. Ana por me receber no laboratório, a Samantha, Carlos e Marcos por ser sempre solícitos tanto na época do meu TCC, quanto agora no mestrado...

À Élida, Kátia, Suelen, Maria, Marina, Cris, Wanessa, Diana, Lucas, Cíntia, Fábio, Fernanda, Larissa, Luiza, Thiago, Bruno, Thainá, Tatiane, Esthefany e Joyce pelos momentos de descontração, conselhos, dicas, risadas...

À Edilene, Camila e Bruna por realizar os diagnósticos prévios das amostras...

À Juliana que foi essencial na realização deste trabalho, pela paciência em me ensinar sobre biologia molecular, e sempre achar soluções para as diversas questões que surgiram ao longo do caminho...

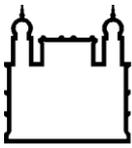
Ao André por me aceitar como aluna sem me conhecer, por ser um ótimo orientador, e por estar sempre presente, principalmente nos momentos de dúvidas e dificuldades, sempre buscando a melhor forma de trabalharmos...

A todos os membros da banca por aceitarem o convite e participarem da defesa...

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPERJ, pela ajuda de custo e por financiarem o meu projeto...

À FIOCRUZ e o IOC por disponibilizarem toda a estrutura para a realização deste mestrado...

E por fim agradeço a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente ao longo da realização deste trabalho...



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSIDADE DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM PEQUENOS MAMÍFEROS PROVENIENTES DA ESTAÇÃO BIOLÓGICA FIOCRUZ DA MATA ATLÂNTICA, RIO DE JANEIRO/RJ.

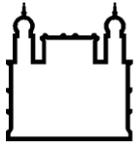
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Alice Pereira Berbigier

Tripanosomatídeos compreendem uma diversidade de protozoários parasitas que podem ser encontrados em diversas espécies de hospedeiros, incluindo os pequenos mamíferos (roedores, marsupiais e morcegos) que possuem papéis importantes nos ciclos de manutenção e transmissão desses parasitas. O diagnóstico molecular da infecção diretamente em tecidos dos seus hospedeiros podem resultar na detecção de espécies de tripanosomatídeos não detectadas em outras técnicas, como culturas, exame a fresco, ou sorologia. O objetivo deste estudo foi diagnosticar molecularmente a infecção e identificar a diversidade de tripanosomatídeos presentes em tecidos de pele, baço e fígado de pequenos mamíferos silvestres provenientes da Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica (EFMA), Rio de Janeiro/RJ, considerada uma área de proteção ambiental com diferentes níveis de degradação. Amostras biológicas de pequenos mamíferos capturados na EFMA foram submetidas anteriormente a outros exames diagnósticos: exames a fresco de sangue, culturas de sangue e tecidos, PCR em tecidos direcionado a infecção por *Leishmania* sp. e sorologia (RIFI), esta última apenas em amostras de roedores e marsupiais. As amostras de tecidos desses pequenos mamíferos foram submetidas à extração de DNA, seguida de uma reação em cadeia da polimerase (PCR-nested) utilizando o marcador 18S rDNA. Os produtos amplificados foram sequenciados e analisados por meio de inferência filogenética por máxima verossimilhança. O teste estatístico Qui-quadrado foi aplicado para avaliar a relação entre áreas de coletas com a taxa de infecção dos tripanosomatídeos detectados. Das 422 amostras de tecidos analisadas, 33 (7,8% = 26 indivíduos) foram positivas no diagnóstico molecular. Destas, 22 foram posicionadas filogeneticamente dentro do clado *Trypanosoma cruzi*: *T. cruzi* Tc1 (n=9), *Trypanosoma dionisii* (n=7), *Trypanosoma rangeli* A (n=1), *Trypanosoma* sp. Neobat 1 (n=3) e *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (n=2). As 11 amostras não caracterizadas no nível de espécie foram classificadas como *Trypanosomatidae*. Dos 26 indivíduos positivos, 15 também haviam sido positivos nos outros testes diagnósticos, no qual o diagnóstico molecular diretamente em tecidos complementou e confirmou os resultados destas outras técnicas. Estes 26 hospedeiros positivos estavam distribuídos por todas as três áreas de captura da EFMA (peridomicílio (n=10), transição (n=10) e mata (n=6)). A análise estatística mostrou que não houve relação entre os diferentes níveis de degradação das áreas de captura com a distribuição dos tripanosomatídeos. A diversidade de tripanosomatídeos encontrada (5 diferentes espécies/genótipos) pode ser considerada elevada, visto que as áreas de coletas são relativamente pequenas, a diversidade faunística não é grande e o nível de influência antrópica é elevado. O diagnóstico molecular diretamente em tecidos se mostrou eficiente, pois além de diagnosticar a infecção por tripanosomatídeos em hospedeiros considerados previamente negativos, também diagnosticou parasitas que até o momento só podem ser detectados por meio do diagnóstico molecular, como os genótipos de *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e 4.

Palavras Chave: diagnóstico molecular, infecção, tecidos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TRYPANOSOMATIDS' DIVERSITY IN SMALL MAMMALS FROM ESTAÇÃO BIOLÓGICA
FIOCRUZ DA MATA ATLÂNTICA, RIO DE JANEIRO/RJ.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Alice Pereira Berbigier

Trypanosomatids comprises a parasite diverse group that can infect several host species, including small mammals. Rodents, marsupials and bats may present important roles in the maintenance and transmission cycle of trypanosomatids. The infection's molecular diagnosis directly from host tissues can result in detection of species not diagnosed in others techniques, such as cultures, fresh blood exam, or serology. The aim of this study was to diagnose the infection and identify by molecular diagnosis the trypanosomatid diversity in wild small mammals' skin, spleen and liver tissues. These small mammals are from the Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica (EFMA), Rio de Janeiro/RJ, an environmental protected area with different levels of disturbance. These small mammals were previously subjected to other diagnostic tests: fresh blood exam, blood and tissue cultures, tissue PCR for *Leishmania* sp. infection and serological test (RIFI), the latter being only used in rodent and marsupial. Tissue samples from these small mammals were subjected to DNA extraction, followed by a polymerase chain reaction (nested-PCR) using the 18S rDNA target. The amplified products were sequenced and analyzed using phylogenetic inference by maximum likelihood. The Chi-square statistical test was applied to evaluate the relation between small mammals capture areas with the trypanosomatid infection rates. Of 422 tissue samples analyzed, 33 (7.8% = 26 individuals) were positive in the molecular diagnosis. Of these, 22 were phylogenetically within the *Trypanosoma cruzi* clade: *T. cruzi* TcI (n = 9), *Trypanosoma dionisii* (n = 7), *Trypanosoma rangeli* A (n = 1), *Trypanosoma* sp. Neobat 1 (n = 3) and *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (n = 2). Eleven samples not characterized at the species level were classified as Trypanosomatidae. Of the 26 positive individuals, 15 were also positive in other diagnostic tests and the molecular diagnosis complemented and confirmed these previous results. The 26 infected hosts were distributed across the three EFMA capture areas (peridomicile (n = 10), transition (n = 10) and forest (n = 6)). Statistical analysis showed that there was no difference in the infection distribution among the three areas with different degradation levels. The detected Trypanosomatid diversity (five different species/genotypes) can be considered high, since the capture areas are relatively small, the fauna diversity is poor, and the anthropic influence level is high. Molecular diagnosis directly in tissues proved to be an efficient method, because in addition to diagnose trypanosomatid infection in previously hosts considered negative, it also diagnosed parasites that until now were only detected through this technique, such as the genotypes of *Trypanosoma* sp. Neobat 1 and 4.

Keywords: Molecular diagnosis, infection, tissue.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Classificação dos Tripanosomatídeos.....	1
1.2. Pequenos mamíferos e infecções causadas por tripanosomatídeos	9
1.2.1 Roedores	9
1.2.2 Marsupiais	10
1.2.3 Morcegos.....	11
1.3. Métodos de diagnóstico para a detecção da infecção por triplanosomatídeos	12
1.4. Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Área de estudo	19
4.2. Captura dos pequenos mamíferos e coleta de tecidos	21
4.3. Licenças e Aspectos Éticos	22
4.4. Diagnósticos anteriormente realizados nos pequenos mamíferos .	22
4.5. Protocolo Experimental.....	23
4.5.1. Extração de DNA dos tecidos	24
4.5.2. Diagnóstico molecular	25
4.5.3. Identificação taxonômica dos parasitos	27
4.6. Análise Filogenética	30
4.7. Análise Espacial.....	31
4.8. Análise Estatística	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Caracterização dos tripanosomatídeos	34
5.2. Análise Filogenética dos tripanosomatídeos caracterizados	36
5.3. Amostras positivas em outros diagnósticos.....	39
5.4. Distribuição espacial dos tripanosomatídeos e seus hospedeiros.	41

6. DISCUSSÃO	45
6.1. Diversidade de tripanosomatídeos.....	46
6.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	46
6.1.2. <i>Trypanosoma dionisii</i>.....	48
6.1.3. <i>Trypanosoma rangeli</i>.....	50
6.1.4. <i>Trypanosoma sp.</i> Neobat 1 e 4	51
6.2. Tripanosomatídeos não caracterizados.....	53
6.3. Distribuição espacial dos tripanosomatídeos a partir da localização dos pequenos mamíferos.....	54
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Imagem representativa da classificação das ordens (Prokinetoplastida, Bodonida e Trypanosomatida) pertencentes à classe Kinetoplastea. As respectivas classe e ordens estão sinalizadas em amarelo.....02
- FIGURA 2:** Imagem representativa de 22 gêneros pertencentes a família Trypanosomatidae. Os nomes que possuem uma linha tracejada são referentes aos gêneros que não possuem uma posição filogenética precisa. Os nomes que possuem um sombreado cinza são referentes aos gêneros que apresentam endossimbiontes. Os nomes que estão enquadrados são referentes aos gêneros classificados como heteroxenos.....03
- FIGURA 3:** Imagem representativa do gênero *Trypanosoma* sp., e sua divisão em subgêneros e espécies, com destaque ao seu modo de transmissão (Seção Stercoraria e Seção Salivaria).....04
- FIGURA 4:** Imagem representativa do clado *Trypanosoma cruzi* com as referentes posições filogenéticas de algumas das espécies pertencentes as este clado.....05
- FIGURA 5:** Organograma das etapas (extração e quantificação de DNA), PCR (alvo 18S SSU rDNA), purificação do DNA amplificado, sequenciamento do DNA que apresentou uma boa qualidade na purificação e repetição com modificações nas amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas (conforme o organograma da FIGURA 6) envolvendo as 422 amostras de tecidos de baço, fígado e pele dos pequenos mamíferos examinados.....23
- FIGURA 6:** Organograma das modificações (nova extração de DNA com o Kit Quiagen, modificações na quantidade de reagentes na PCR (18S rDNA) e PCR através do alvo 24SrRNA) realizadas nas amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas. As amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas, mesmo com essas modificações foram classificadas como Trypanosomatidae.....28
- FIGURA 7:** Imagem representativa de um gel de agarose a 2% (PCR - alvo 18S). As amostras LBCE 17678B e RM 481B, exemplificam as amostras com bandas fracas e com muitas bandas inespecíficas (sinalizado em vermelho), respectivamente. Controle positivo: *Trypanosoma cruzi* proveniente da Cepa Y; Controle negativo: H₂O ultra pura; Marcador: peso molecular de 100 pares bases.....35
- FIGURA 8:** Imagem representativa de uma amostra não caracterizada, onde apresentou um eletroferograma com picos muito altos e baixos, proveniente da plataforma de sequenciamento da Fiocruz.....36
- FIGURA 9:** Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA por meio do método de Máxima Verossimilhança. A árvore indica a posição filogenética os tripanosomatídeos caracterizados como: *Trypanosoma cruzi* Tc1 (circundado em rosa), *Trypanosoma dionisii* (circundado em verde) e *Trypanosoma rangeli* A (circundado em roxo). Todas as sequências de referência utilizadas estão com os seus respectivos números de acesso e são provenientes do banco de dados do GenBank. Os tecidos de baço (B), fígado (F) e pele (P), estão ao lado dos respectivos números de registros das amostras caracterizadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. A barra de escala mostra o número de substituições nucleotídicas por local. *Trypanosoma wauwau* foi utilizado como grupo externo.....37

FIGURA 10: Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA por meio do método de Máxima Verossimilhança. A árvore indica a posição filogenética os tripanosomatídeos caracterizados como: *Trypanosoma* sp. Neobat 1 (circundado em azul) e *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (circundado em laranja). Todas as sequências de referência utilizadas estão com os seus respectivos números de acesso e são provenientes do banco de dados do GenBank. Os tecidos de baço (B), fígado (F), estão ao lado dos respectivos números de registros das amostras caracterizadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. A barra de escala mostra o número de substituições nucleotídicas por local. *Trypanosoma livingstonei* foi utilizado como grupo externo.....38

ÍNDICE DE MAPAS

MAPA 1: Localização da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica (EFMA) (símbolo azul e branco), próximo ao Parque Estadual da Pedra Branca (área circundada em verde).....16

MAPA 2: Divisão das áreas de coletas dos pequenos mamíferos: área de peridomicílio está circundada em vermelho, área de transição está circundada em branco e a área de mata está circundada em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca. O símbolo azul e branco representa a localização da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica (EFMA).....20

MAPA 3: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos não voadores positivos (Marsupiais: *Dideplhis aurita*, *Marmosa paraguayana* e *Metachirus nudicaudatus*; Roedores: *Rattus rattus* e *Akodon cursor*) frente à infecção por tripanosomatídeos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circundada em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.....42

MAPA 4: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos voadores (*Artibeus lituratus*, *Mimon bennettii*, *Micronycteris minuta*, *Dermanura cinerea*, *Plathirrynus reciphinus*, *Myotis nigricans*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*) positivos frente à infecção por tripanosomatídeos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circundada em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.....43

MAPA 5: Distribuição espacial dos tripanosomatídeos detectados pelo diagnóstico molecular (Trypanosomatidae, *Trypanosoma rangeli* A, *Trypanosoma* sp. Neobat 1, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma cruzi* Tc1 e *Trypanosoma* sp. Neobat 4) diretamente em tecidos de pequenos mamíferos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circundada em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.....44

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1: Informações e classificação dos tecidos positivos frente à infecção por tripanosomatídeos, através do diagnóstico molecular.....33

QUADRO 2: Tripanosomatídeos identificados em nível de espécie e suas respectivas informações relacionadas aos valores de identidade, cobertura, e-value, alvo molecular utilizado (18S e 24S) e a sequência de referência junto com o número de acesso da mesma no GenBank.....34

QUADRO 3: Informações dos pequenos mamíferos terrestres positivos em outros métodos de diagnósticos: sorologia (RIFI) e hemocultivo (PONTES, 2015; SENDER, 2018).....40

QUADRO 4: Informações dos pequenos mamíferos voadores positivos em outros métodos de diagnósticos: hemocultivo, exame à fresco e PCR direcionada à infecção por *Leishmania* sp. em tecidos de pele, baço e fígado, através do alvo molecular kDNA (RODRIGUES, 2016).....41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC	<i>Akaike information criterion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CJM	Colônia Juliano Moreira
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTU	<i>Discrete Type Unit</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFMA	Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gGAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicosomal
GPS	Sistema de Posicionamento Global
QGIS	<i>Quantum GIS</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS1	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
Kdna	Kinetoplastea Ácido Desoxirribonucleico
LABPMR	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
LABTRIP	Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LBCE	Sigla de referência dos mamíferos coletados pelo LBPMSR

μL	microlitro
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>Neighbour-Joining</i>
PB	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
RM	Sigla de referência dos morcegos coletados pelo Dr. Ricardo Moratelli
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribossômico
SSU	<i>Small Subunit</i>
shp	<i>shapefile</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
UV	Ultravioleta
WGS	<i>World Geodetic System</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação dos Tripanosomatídeos

A classe Kinetoplastea é composta por protozoários flagelados que possuem em comum uma estrutura chamada cinetoplasto que se localiza na base de seu flagelo e está associada às funções de respiração celular (MELOS & ECHEVARRIA, 2012; SZÖKE *et al.*, 2017). O cinetoplasto é composto por uma rede concatenada de moléculas de DNA chamadas de maxicírculos, que possui como uma de suas funções codificar as proteínas responsáveis pela atividade mitocondrial; e minicírculos que estão envolvidos na codificação dos pequenos RNAs-guia que auxiliam na edição dos RNAm dos maxicírculos (MELOS & ECHEVARRIA, 2012; CAMACHO *et al.*, 2019).

A classe Kinetoplastea possui três ordens (FIGURA 1): Prokinetoplastida que é composta por uma espécie de ectoparasitas de peixes e um endossimbionte de amebas (MOREIRA *et al.*, 2004; CAVALIER-SMITH, 2016); Bodonida que é um grupo parafilético, que compreende parasitas de peixes e organismos de vida livre que podem ser encontrados em diversos tipos de ambientes aquáticos e terrestres (CAVALIER-SMITH, 2016; SZÖKE *et al.*, 2017) e Trypanosomatida que é formada por uma única família, Trypanosomatidae, que é composta por uma grande diversidade de espécies de parasitas obrigatórios que podem infectar uma variedade de hospedeiros, e apresenta ciclos de transmissão que podem ser monoxênico ou heteroxênico (CAVALIER-SMITH, 2016; KAUFER *et al.*, 2017; MASLOV *et al.*, 2018).

FIGURA 1: Imagem representativa da classificação das ordens (Prokinetoplastida, Bodonida e Trypanosomatida) pertencentes à classe Kinetoplastea. As respectivas classe e ordens estão sinalizadas em amarelo.

Fonte: Adaptado de CAVALIER-SMITH, 2016.

Class 2. Kinetoplastea Honigberg em. Vickerman, 1976 stat. n. Margulis, 1974

Subclass 1. Prokinetoplastina Vickerman in Moreira et al., 2004

Order 1. Prokinetoplastida Vickerman in Moreira et al., 2004

Family Ichthyobodonidae Isaksen et al., 2007 (*Ichthyobodo*, *Perkinsela*)

Subclass 2. Metakinetoplastina Vickerman in Moreira et al., 2004

Order 1. Bodonida* Hollande, 1952 em. Vickerman, 1976, Krylov *et al.* 1980

Suborder 1. Neobodonina Vickerman in Moreira et al., 2004 stat. n.

Family 1. Neobodonidae* fam. n. (*Neobodo**, *Rhynchobodo*, *Actuariola*, *Azumiobodo*, *Cruzella*, *Cryptaulaxoides*, *Klosteria*)

Family 2. Rhynchomonadidae fam. n. (*Rhynchomonas*, *Dimastigella*)

Suborder 2. Parabodonina Vickerman in Moreira et al., 2004 stat. n.

Family 1. Parabodonidae fam. n. (*Parabodo*)

Family 2. Cryptobiidae* Vickerman, 1976 (*Cryptobia**, *Procryptobia*, *Trypanoplasma*, *Cephalothamnion*)

Suborder 3. Eubodonina Vickerman in Moreira et al., 2004 stat. n.

Family Bodonidae Bütschli, 1883 em. (*Bodo*)

Order 2. Trypanosomatida Saville Kent, 1880 stat. n. Hollande, 1952

Family Trypanosomatidae Doflein, 1901 (e.g. *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leishmania*,

Leptomonas, *Paratrypanosoma*, *Phytomonas*, *Sergeia*, *Trypanosoma*, *Wallaceina*)

Os parasitos monoxênicos são aqueles que dependem de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, sendo, no caso dos tripanosomatídeos, sempre insetos. Os gêneros de tripanosomatídeos descritos como monoxênicos são: *Angomononas* sp., *Borovskya* sp., *Blastocrithidia* sp., *Blechomonas* sp., *Crithidia* sp., *Herpetomonas* sp., *Jaenimonas* sp., *Kentomonas* sp., *Lafontella* sp., *Leptomonas* sp., *Lotmaria* sp., *Novymonas* sp., *Paratrypanosoma* sp., *Rhynchoidomonas* sp., *Sergeia* sp., *Strigomonas* sp., *Wallacemonas* sp. (anteriormente chamado de *Wallaceina* sp.) (ÁLVAREZ, 2017; KAUFER *et al.*, 2017; KOSTYGOV & YURCHENKO, 2018; MASLOV *et al.*, 2018) (FIGURA 2).

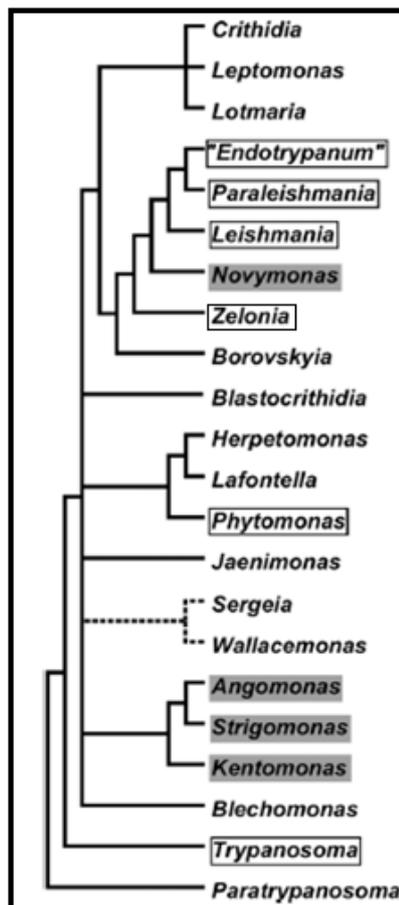
Dentre estes, espécies de ao menos 3 gêneros já foram encontrados parasitando hospedeiros vertebrados: (i) *Crithidia mellificae* em uma espécie de morcego *Anoura caudifer*; (ii) *Leptomonas seymouri* parasitando humanos imunocomprometidos com infecção mista por *Leishmania donovani* e (iii) diferentes espécies do gênero *Herpetomonas* sp. encontradas parasitando espécies de plantas, ratos e humanos imunocomprometidos.

Além de uma espécie de tripanosomatídeo, até o momento desconhecida, que pode acometer humanos, apresentando sintomatologia semelhante aos causados por espécies de *Leishmania* sp., mas que por meio de técnicas moleculares foi observado que este novo parasita, possui uma certa semelhança com a espécie *Crithidia fasciculata*. (BORGHESAN *et al.*, 2013; KRAEVA *et al.*, 2015; KAUFER *et al.*, 2017; RANGEL *et al.*, 2019; MARUYAMA *et al.*, 2019).

Os parasitos heteroxênicos dependem de ao menos 2 hospedeiros para completar seu ciclo, sendo ao menos um hospedeiro vertebrado ou planta e um invertebrado, como é o caso dos tripanosomatídeos dos gêneros *Endotrypanum* sp., *Leishmania* sp., *Paraleishmania* sp., *Phytomonas* sp., *Porcisia* sp. e *Trypanosoma* sp. e *Zelonia* sp. (ÁLVAREZ, 2017; KAUFER *et al.*, 2017; KOSTYGOV & YURCHENKO, 2018; MASLOV *et al.*, 2018) (FIGURA 2).

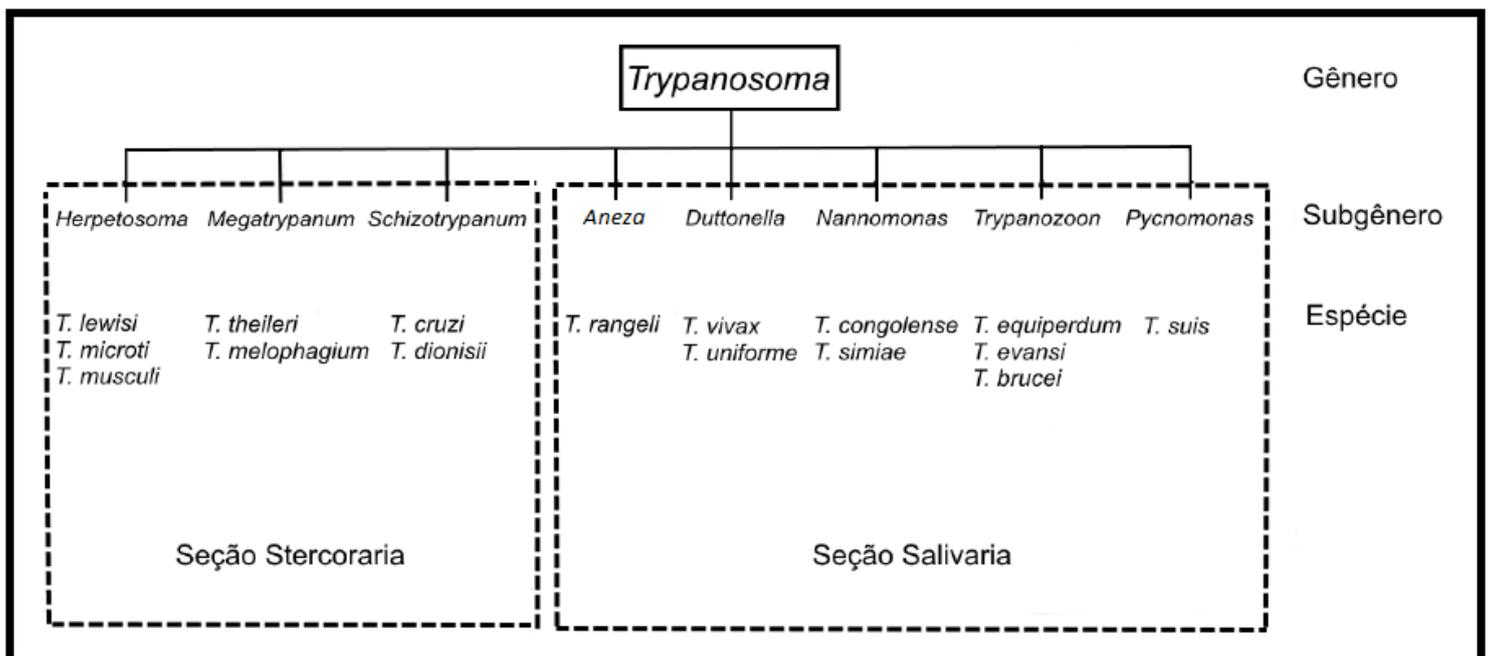
FIGURA 2: Imagem representativa de 22 gêneros pertencentes a família Typanosomatidae. Os nomes que possuem uma linha tracejada são referentes aos gêneros que não possuem uma posição filogenética precisa. Os nomes que possuem um sombreado cinza são referentes aos gêneros que apresentam endossimbiontes. Os nomes que estão enquadrados são referentes aos gêneros classificados como heteroxenos.

Fonte: Adaptado de MASLOV *et al.*, 2018.



O gênero *Trypanosoma* sp. é dividido em oito subgêneros: *Aneza*, *Megatrypanum*, *Schizotrypanum*, *Herpetosoma*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas* e *Trypanozoon*. Esses subgêneros são divididos em duas seções que não possuem valor taxonômico, mas auxiliam no entendimento no modo de transmissão dos parasitas: Stercoraria – que indica o modo de transmissão por meio das fezes de seu vetor (*Megatrypanum*, *Schizotrypanum* e *Herpetosoma*) e Salivaria – que indica parasitas transmitidos por meio da saliva de seu vetor (*Aneza*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas* e *Trypanozoon*) (HOARE 1972; LOPES *et al.*, 2018; MAFIE *et al.*, 2018; MOLINARI & MORENO, 2018; WANG *et al.*, 2019) (FIGURA 3).

FIGURA 3: Imagem representativa do gênero *Trypanosoma* sp., e sua divisão em subgêneros e espécies, com destaque ao seu modo de transmissão (Seção Stercoraria e Seção Salivaria).
Fonte: Adaptado de RODRIGUES, 2019.

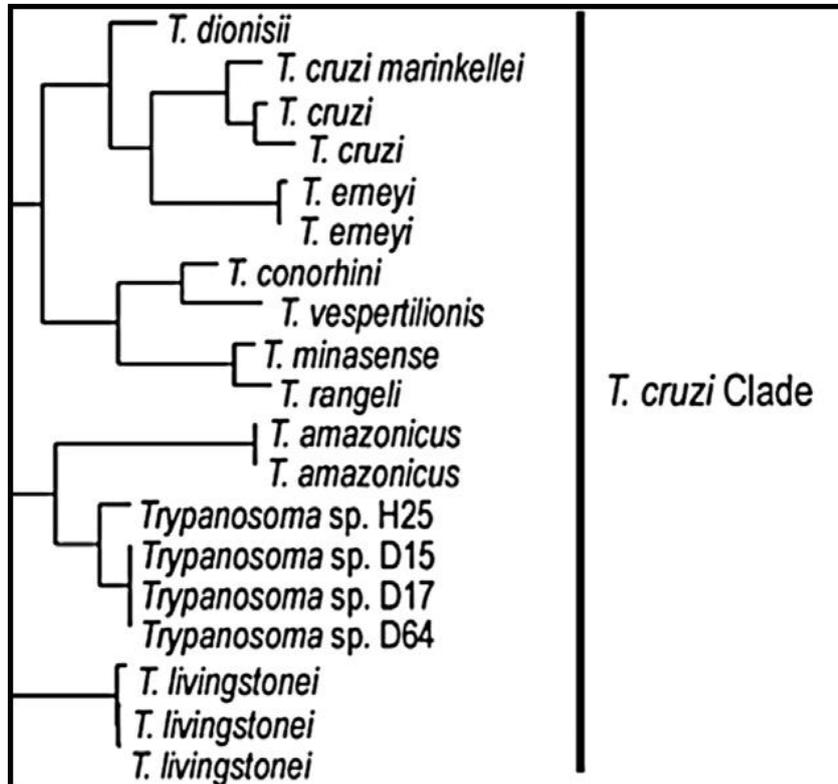


Todas as espécies pertencentes ao subgênero *Schizotrypanum* fazem parte do clado *Trypanosoma cruzi*, que inclui ainda outras espécies filogeneticamente próximas a *Trypanosoma cruzi*. Este clado é composto por diversas espécies como: *Trypanosoma dionsii*, *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Trypanosoma erneyi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma conorhini*,

Trypanosoma vespertilionis, entre outros (LOPES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019) (FIGURA 4).

FIGURA 4: Imagem representativa do clado *Trypanosoma cruzi* com as referentes posições filogenéticas de algumas das espécies pertencentes a este clado.

Fonte: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2017.



Durante vários anos, pesquisadores vêm tentando explicar a origem das espécies do clado *T. cruzi* e seus processos de especiação.

Uma das primeiras teorias propostas foi denominada de “Supercontinente Sul”, que teve o seu fundamento atrelado ao fato de que as espécies presentes a este clado, eram compostas por tripanosomatídeos provenientes de espécies de pequenos mamíferos terrestres, encontrados somente na América do Sul e na Austrália. Esta teoria baseou-se, principalmente, na descrição de uma espécie de tripanosomatídeo de canguru na Austrália filogeneticamente próximo a *T. cruzi* (STEVENS *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2015; BOTERO *et al.*, 2016; DARIO *et al.*, 2017a).

Além disso, também foi levado em consideração que o período de divergência filogenética entre *T. cruzi* e *T. brucei* (triplanosomatídeo africano) é de aproximadamente 100 milhões de anos, o mesmo período em que ocorreu a separação da América do Sul e Oceania do continente africano, sugerindo que

o clado *T. cruzi* teria sofrido processos de especiação em marsupiais, após o período em que ocorreu essa separação entre os continentes (LIMA *et al.*, 2015; BOTERO *et al.*, 2016; DARIO *et al.*, 2017a).

A descoberta de espécies de parasitos em mamíferos terrestres africanos e a sua posição filogenética dentro do clado *T. cruzi* reacendeu a discussão e embasou uma nova teoria que sugere que este clado tenha sido originado em espécies de morcegos (HAMILTON *et al.*, 2009; ÁLVAREZ, 2017).

A teoria chamada como “Bat Seeding Hypothesis”, proposta em 2012, sugere que os morcegos foram os dispersores de um tripanosomatídeo ancestral que passou por um processo de especiação, originando uma grande diversidade de espécies de tripanosomatídeos filogeneticamente próximos e atualmente incluídos no clado *T. cruzi*. Vale ressaltar a grande diversidade de espécies de tripanosomatídeos de morcegos, os quais estão filogeneticamente posicionados na porção basal do clado *T. cruzi* (ÁLVAREZ, 2017).

Recentemente, com a descrição de *T. janseni*, um novo tripanosomatídeo pertencente a este clado e proveniente de um marsupial na América do Sul, foi proposto que ambas as teorias não sejam excludentes entre si, mas sim complementares, onde todos os eventos presentes nas duas teorias teriam ocorrido, só que em momentos temporais distintos (LOPES *et al.*, 2018).

Trypanosoma cruzi é a espécie-tipo deste clado e apresenta extensa heterogeneidade genética que pode ser agrupada em subpopulações chamadas de DTU's (*Discrete Typing Units*). Essas distintas DTUs representam agrupamentos de isolados geneticamente semelhantes que podem ser diferenciados através da utilização de alguns marcadores moleculares (ZINGALES, 2011).

Até o presente momento foram descritas seis DTUs (TcI-TcVI), além de Tcbat, uma DTU que era considerada restrita a espécies de morcegos, mas foi encontrada recentemente em humanos e em múmias humanas pré-colombianas (ZINGALES, 2011; RAMÍREZ *et al.*, 2013; GUHL *et al.*, 2014).

As DTU's TcI e TcII são consideradas as mais antigas, e provavelmente se divergiram de um ancestral em comum entre 1 a 3 milhões de anos atrás, aproximadamente. Supõe-se que as DTU's TcV e TcVI são originárias de uma hibridização recente entre as DTU's TcII e TcIII. Já as DTU's TcIII e TcIV se

originaram de uma hibridização mais antiga entre as DTU's TcI e TcII, contudo está última teoria não é tão amplamente aceita (ROMAN *et al.*, 2018).

Este parasita é capaz de infectar qualquer espécie de mamífero, até mesmo o ser humano, onde pode causar a “doença de Chagas”. Os vetores deste parasita podem ser inúmeras espécies de insetos pertencentes à família Reduviidae (ROMAN *et al.*, 2018).

A ocorrência deste parasita se dá por toda a América latina, contudo existem alguns casos de humanos infectados em outras localidades como na América do Norte, Europa, entre outros. Essa disseminação do parasita pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via congênita, entre outros (WESTPHALEN *et al.*, 2012).

Outro parasito do mesmo clado que tem reconhecida diversidade genética é *Trypanosoma rangeli*, que possui cinco linhagens descritas até o momento (TrA-TrE). As linhagens A, B, C e D foram descritas primeiramente por DA SILVA *et al.*, 2007, por meio de marcadores moleculares. Já a linhagem E foi a última a ser descrita até o momento, por DA SILVA *et al.*, 2009, sendo primeiramente descrita em morcego da espécie *Platyrrhinus lineatus*.

Todas essas linhagens já foram encontradas em diversas espécies de hospedeiros, com exceção da linhagem E, que até o momento só foi encontrado em espécies de morcegos. Além disso, também vale ressaltar que a linhagem B é frequentemente encontrada apenas na região amazônica, contudo a mesma foi recentemente detectada em um morcego da espécie *Carollia perspicillata* (DARIO *et al.*, 2017a).

A distribuição geográfica deste parasita é sobreposta ao *T. cruzi*, ocorrendo pela América Central e América do Sul e, assim como este parasita, *T. rangeli* também é capaz de infectar qualquer espécie de mamífero, até mesmo humanos, contudo sem, aparentemente, apresentar sintomatologia importante. Os principais vetores deste parasita são espécies de triatomíneos pertencentes ao gênero *Rhodinus* sp. (ESPINOSA, 2014; ÁLVAREZ *et al.*, 2018).

A classificação deste parasita é controversa, visto que o mesmo possui características tanto de espécies do grupo Salivaria, pois este parasita é transmitido através da saliva de seu vetor, quanto do grupo Stercoraria, visto que este parasita possui proximidade filogenética com o subgênero

Schizotrypanum, fazendo parte do clado *T. cruzi* e é facilmente cultivável em meio axênico, o que não ocorre com as demais espécies de *Trypanosoma* do grupo Salivaria (MOLINARI & MORENO, 2018).

Recentemente foi proposta uma nova revisão taxonômica para este parasita por MOLINARI & MORENO, 2018, que consiste em utilizar dois nomes distintos para este parasita: *T. (Schizotrypanum) rangeli* Tejera, 1920, quando houver necessidade de enfatizar a estreita relação filogenética entre as espécies do clado *T. cruzi*; e *T. (Aneza) rangeli*, 2018, quando houver necessidade de mostrar que este parasita é suficientemente divergente de outros tripanosomatídeos neotropicais.

O conhecimento da diversidade de espécies de tripanosomatídeos certamente é subestimado, visto que praticamente a cada ano uma nova espécie é descrita como, por exemplo, *Trypanosoma gennarii* (FERREIRA *et al.*, 2017), *T. janseni* (LOPES *et al.*, 2018), *T. madeirae* (BARROS *et al.*, 2019), além das unidades filogenéticas não formalmente descritas como espécies: *Trypanosoma* sp. DID, *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (RODRIGUES *et al.*, 2019), entre outros.

Além disso, deve se levar em consideração as definições de especificidade e restrição quando se trata destes parasitas, visto que novos casos de infecção por espécies de tripanosomatídeos tidos como específicos de algum de hospedeiro vêm sendo reportados em outros grupos de hospedeiros. Alguns exemplos de situações como essa são: *Trypanosoma cascavelli*, que foi descrito originalmente em uma espécie de cascavel chamada *Crotalus durissus terrificus*, e encontrado parasitando um indivíduo de marsupial da espécie *Monodelphis americana*; *T. dionisii* que era considerado restrito a morcegos e já foi encontrado em tecido cardíaco humano e em coágulo sanguíneo de uma espécie de marsupial *Metachirus nudicaudatus*; *Crithidia mellificae* que foi encontrado parasitando morcegos, sendo que o seus hospedeiros habituais são espécies de insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, entre outros casos (DARIO *et al.*, 2016; JANSEN *et al.*, 2018; RANGEL *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Esses casos mostram como os conceitos de especificidade e restrição em relação a algumas espécies de tripanosomatídeos, vêm sendo mudados, principalmente quando se leva em consideração que a maioria desses casos

ocorreu em hospedeiros tido como animais silvestres de vida livre, dificultando mais ainda na definição desses conceitos relacionados aos tripanosomatídeos e seus hospedeiros (RODRIGUES, 2019).

1.2. Pequenos mamíferos e infecções causadas por tripanosomatídeos

Dentre as inúmeras espécies de vertebrados que são parasitados por tripanosomatídeos, destacam-se os pequenos mamíferos que na região neotropical compreendem as espécies de morcegos, marsupiais e roedores. Estes grupos de mamíferos estão envolvidos no ciclo de transmissão de diversas espécies de tripanosomatídeos, onde cada grupo possui um papel e particularidades que os diferenciam como hospedeiro e/ou reservatório com relação à manutenção desses parasitos na natureza (COSTA *et al.*, 2018; JANSEN *et al.*, 2018; VARZINCZAK *et al.*, 2018).

1.2.1 Roedores

A ordem Rodentia (roedores) é representada por diversas espécies ao redor do mundo. No Brasil esta ordem compreende 74 gêneros e 234 espécies, que podem ser encontrados em todo o território brasileiro e em diversos tipos de ambientes: aquáticos, terrestres, silvestres, sinantrópicos, entre outros (PAGLIA *et al.*, 2012; PATTON *et al.*, 2015). Essa ampla capacidade de adaptação a diversos tipos de ambientes distintos, fazem com que os roedores sejam mais expostos a infecções por diversas espécies de parasitas. Por esta razão este grupo de pequenos mamíferos é conhecido por ser hospedeiro e fazer parte do ciclo de vida de vários parasitas, incluindo espécies de tripanosomatídeos, onde é possível encontrar um longo histórico de registros de infecções por esses parasitas (PIRES *et al.*, 2014; JANSEN *et al.*, 2018).

Dentre os inúmeros registros de infecções por tripanosomatídeos em roedores, infecções por diferentes espécies do gênero *Leishmania* sp. já foram reportadas em diversas espécies, como por exemplo, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Proechimys semispinosus*, *Thrichomys laurentius*, entre outros (PIRES *et al.*, 2014; CALDART *et al.*, 2017). Infecções por *Leishmania* sp. são amplamente relatadas, de modo que algumas espécies de roedores são apontados como possíveis reservatórios de espécies de *Leishmania* sp., como: *Dasyprocta azarae*, *Thrichomys laurentius*, *Clyomys laticeps*, *Apodemus*

sylvaticus, *Rattus rattus*, entre outros (PIRES *et al.*, 2014; NAVEA-PÉREZ *et al.*, 2015).

Os roedores também demonstraram estarem envolvidos nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, onde as suas taxas de infecção podem variar em maior ou menor grau e em escalas distintas de tempo e espaço, mostrando que os roedores possuem um importante papel na manutenção deste parasita na natureza (JANSEN *et al.*, 2018).

Outra infecção bastante conhecida por tripanosomatídeos em roedores é a infecção pela espécie *Trypanosoma lewisi*, onde pode ser comumente encontrada em roedores da espécie *Rattus rattus*. Este tripanosomatídeo também já foi encontrado parasitando humanos, onde pode causar enfermidades, principalmente em humanos imunocomprometidos, como já foi reportada em casos na Índia, Malásia, entre outros (ORTIZ *et al.*, 2018).

1.2.2 Marsupiais

A maioria das espécies de marsupiais se concentra nos países da Oceania, ilhas próximas e nas Américas, dividindo-se em 7 ordens e 335 espécies (CÁCERES, 2012).

No Brasil ocorre apenas à ordem Didelphimorphia que é formada por uma única família chamada Didelphidae, que atualmente é composta por 19 gêneros e 100 espécies. No Brasil a ocorrência desta família consiste em 16 gêneros e 55 espécies (REIS *et al.*, 2011).

Esta ordem de marsupiais é conhecida por incluir hospedeiros naturais de diversas espécies de tripanosomatídeos, além de ser um dos grupos de hospedeiros mais antigos, exercendo diferentes papéis nos ciclos de transmissão destes parasitas, seja como mantenedores, dispersores e até mesmo como bioacumuladores de espécies e/ou subpopulações de tripanosomatídeos (JANSEN *et al.*, 2018).

Inúmeras espécies de marsupiais já foram encontradas parasitadas por tripanosomatídeos, como: *Marmosa paraguayana* (ex: *Leishmania braziliensis*), *Metachirus nudicaudatus* (ex: *Trypanosoma dionisii*), *Monodelphis americana* (ex: *Trypanosoma genarii*), *Philander opossum* (ex: *Trypanosoma rangeli*), *Didelphis aurita* (ex: *Trypanosoma jansenii*), entre outros (QUINTAL *et al.*, 2011;

ROQUE & JANSEN, 2014; FERREIRA *et al.*, 2017; JANSEN *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Essas infecções estão provavelmente associadas aos hábitos de vida destes marsupiais, visto que a maioria dessas espécies é onívora, podendo se alimentar de insetos vetores e de outros vertebrados que podem estar infectados, além de se abrigarem em locais onde os vetores desses tripanosomatídeos podem estar presentes (ROQUE & JANSEN, 2014; JANSEN *et al.*, 2018).

Dentre as espécies desta ordem, vale destacar a espécie *Didelphis aurita*, que possui uma grande importância ecológica nos ciclos de transmissão silvestre de tripanosomatídeos, sendo considerado um bioacumulador de *T. cruzi* TcI, uma vez que pode manter altas parasitemias e por um longo período quando infectado por parasitas desta DTU, potencializando seu papel como reservatório de *T. cruzi* (ROMAN *et al.*, 2018).

As principais razões que fazem com que este marsupial possua um papel fundamental na manutenção destes parasitos estão relacionadas aos seus hábitos sinantrópicos, visto que conseguem se adaptar facilmente a ambientes modificados por ações humanas, e até mesmo podem vir a buscar este tipo de ambiente por conta da oferta de alimentos presentes neste local. Além disso, este marsupial também pode percorrer consideráveis distâncias ao longo de sua vida, favorecendo a dispersão de parasitas (ROQUE & JANSEN, 2014; JANSEN *et al.*, 2018).

1.2.3 Morcegos

A ordem Chiroptera compreende as inúmeras espécies de morcegos, que se caracterizam por possuírem uma grande capacidade adaptativa a vários tipos de ambiente, longevidade e é o único grupo de mamíferos com capacidade de voo (REIS *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Esta ordem é dividida em duas subordens: Megachiroptera que são espécies de morcegos encontradas exclusivamente no Velho Mundo e são em sua maioria frugívoros e os Microchiropteras que são espécies encontradas em diversos continentes, sendo geralmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais. Dentre seus hábitos alimentares, os morcegos são ainda

classificados como insetívoros, nectarívoros, carnívoros e hematófagos (REIS *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

No Brasil, a ordem Chiroptera está representada por 178 espécies de morcegos divididas em 9 famílias, 6 subfamílias e 68 gêneros. A sua distribuição pelo território brasileiro é ampla, sendo encontrado em todos os estados do país (NOGUEIRA *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2011).

Inúmeras espécies de tripanosomatídeos como *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *T. rangeli*, *T. dionisii* e entre outros, já foram encontrados parasitando diferentes espécies de morcegos. Recentemente novas espécies desta família foram descritas infectando morcegos, como: *Trypanosoma wauwau*, *T. madeirae*, *T. teixeirae*, entre outros.

Além disso, há genótipos e linhagens de tripanosomatídeos que até o momento foram encontrados parasitando somente espécies de morcegos, como os quatro genótipos pertencentes ao clado de *Trypanosoma* sp. Neobat (LIMA *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

A habilidade de voar e a longevidade deste grupo de pequenos mamíferos fazem com que os mesmos possam ser importantes dispersores de parasitas. Além disso, dada a própria história co-evolutiva dos morcegos com espécies de *Trypanosoma* do clado *T. cruzi*, esses mamíferos também são considerados alguns dos hospedeiros mais antigos dos tripanosomatídeos (WANG *et al.*, 2019).

1.3. Métodos de diagnóstico para a detecção da infecção por tripanosomatídeos

Existem várias técnicas de diagnósticos utilizadas para detectar a infecção por tripanosomatídeos, e cada uma delas varia de acordo com o objetivo proposto, como: exame a fresco, cultura de sangue e tecidos, diagnósticos moleculares, diagnósticos sorológicos, entre outros (DARIO *et al.*, 2017a; TAHIR *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019).

O diagnóstico sorológico detecta se o hospedeiro teve contato ou não ao longo de sua vida com o parasita, visto que esta técnica tem a capacidade de detectar anticorpos que foram produzidos a partir da exposição daquele hospedeiro a antígenos do parasito. Por esta razão, este método é tido como

bastante sensível. No entanto, este diagnóstico depende da disponibilidade de controles positivos e negativos para a reação e de conjugados específicos para o hospedeiro em questão. Por outro lado, a sorologia é um método passível de ocorrência de reações cruzadas na detecção de tripanosomatídeos, pelo fato desses parasitas possuírem muitas características em comum, e isto interferir no resultado deste tipo de diagnóstico (JANSEN *et al.*, 2015; TAHIR *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019).

O exame a fresco é um método capaz de diagnosticar a presença de parasitos que estejam circulando na corrente sanguínea do hospedeiro no momento em que o sangue do mesmo foi coletado. Este tipo de diagnóstico é capaz de mostrar a parasitemia do hospedeiro em questão, e a potencial competência do hospedeiro em ser fonte de infecção a vetores hematófagos (RODRIGUES *et al.*, 2019), apesar de não ser capaz de diagnosticar o parasita no nível específico. A desvantagem deste tipo de diagnóstico está relacionada com a baixa sensibilidade visto que pouca quantidade de sangue é utilizada na realização deste diagnóstico, o que dificulta na detecção de parasitas que possam estar circulando em pouca quantidade (parasitemia baixa) na corrente sanguínea do hospedeiro.

O diagnóstico através de culturas axênicas possui uma grande importância porque possibilita o isolamento de parasitos. Esse isolamento é ainda mais importante quando se trata de novas espécies, onde é possível fazer um estudo biológico e bioquímico nesses isolados. A desvantagem deste método é a pressão seletiva que pode ocorrer nos meios de cultura, favorecendo algumas populações parasitárias e eliminando outras, principalmente àquelas populações em baixa parasitemia e/ou àquelas que não são cultiváveis (LOPES *et al.*, 2018; JANSEN *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019).

O diagnóstico molecular é altamente sensível e específico, e começou a ser amplamente utilizado na rotina laboratorial na década de 1980, tendo como alvos moleculares mais comuns o kDNA, 24S, mini-exon, entre outros (MOREL *et al.*, 1980; ARRUDA *et al.*, 1990; BARROS *et al.*, 2017). Contudo, estes alvos não são comumente sequenciáveis e/ou capazes de identificar alguns parasitos no nível específico, resultando na subestimação de algumas espécies destes parasitas. Este cenário começou a se modificar a partir do momento em que

pesquisadores passaram a ter mais fácil acesso às metodologias de sequenciamento gênico, utilizando alvos moleculares conservados entre todos os membros da família Trypanosomatidae capazes de identificar as espécies, através das análises de suas sequências. Dentre esses, destacam-se o diagnóstico utilizando os alvos 18S e o gGAPDH, que vêm auxiliando na detecção da diversidade de tripanosomatídeos que até então estavam sendo subestimadas (THOMPSON *et al.*, 2014).

A prova da eficácia destes alvos moleculares amplos, são as novas espécies e genótipos de tripanosomatídeos descritos recentemente, como *T. janseni*, *T. madeirae*, *T. wauwau*, *Trypanosoma* sp. Neobat 4, entre outros (LIMA *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2018; BARROS *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Geralmente o diagnóstico molecular é utilizado para detectar a presença de tripanosomatídeos apenas em parte do sangue coletado de seus hospedeiros, porém isto pode resultar na subestimação de uma parte da diversidade desses tripanosomatídeos que podem estar presentes apenas em outros tecidos dos hospedeiros. A detecção da diversidade de tripanosomatídeos perpassa pelo diagnóstico em diferentes tecidos do hospedeiro, alguns dos quais tidos como descartáveis, como coágulo sanguíneo, além de sedimentos de culturas que não conseguiram se estabelecer e em tecidos usualmente utilizados apenas para as culturas.

Um exemplo disto é a utilização de amostras de coágulo sanguíneo, onde Rodrigues e colaboradores (RODRIGUES *et al.*, 2019), detectaram a presença de uma grande diversidade de espécies neste material, além de descrever dois genótipos novos: *Trypanosoma* sp. neobat 4 e *Trypanosoma* sp. DID.

1.4. Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica

O Bioma Mata Atlântica é uma das florestas que possui uma ampla diversidade de animais e plantas, porém é uma das mais ameaçadas pelas ações antrópicas. Esta floresta cobre 15% do território brasileiro, abrangendo 17 estados do país. Atualmente restam apenas 12,4% do território original da floresta, onde 80% estão situadas em remanescentes privados (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019).

Dados recentes mostram que mesmo que alguns estados ainda possuam um alto índice de desmatamento, a degradação desta floresta vem diminuindo ao longo dos anos, graças às ações de conservação feitas para preservar este bioma (SOS MATA ATLÂNTICA, 2019).

Um desses locais onde ocorrem essas ações de conservação é o Maciço da Pedra Branca que possui uma área de 12.491,72 hectares e está localizado na Zona Oeste do município do Rio de Janeiro, abrangendo 17 bairros (INEA, 2019). Nesta região se encontra o Parque Estadual da Pedra Branca, que é a maior área de cobertura urbana da Mata Atlântica do país, e por esta razão possui diversas iniciativas com o intuito de preservar este local como a Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica (EFMA) (PONTES, 2015; COSTA, 2016).

A EFMA se localiza no bairro da Taquara, Rio de Janeiro/RJ (MAPA 1) e está inserida no Campus FIOCRUZ Mata Atlântica. Esta região é referente ao setor 1 da antiga Instituição Psiquiátrica Colônia Juliano Moreira (CJM), onde se encontra uma grande área de preservação ambiental, com vegetação secundária da Mata Atlântica (DE SOUZA *et al.*, 2015; COSTA, 2016).

Inúmeros estudos são realizados nesta área da EFMA, pois este local possui uma área que mescla tanto áreas preservadas quanto áreas degradadas e, além disso, é circundada por comunidades de baixa renda. Com relação à fauna deste ambiente é possível encontrar diversos tipos de animais selvagens, como: lagartos, jacarés, tucanos, micos, preguiças, entre outros (DE SOUZA *et al.*, 2015; RANGEL *et al.*, 2019).

Diversas espécies de pequenos mamíferos também podem ser encontradas na EFMA, e este dado é de grande importância, visto que estes animais silvestres podem estar envolvidos em ciclos de transmissão de inúmeras zoonoses, como as causadas por tripanosomatídeos (PONTES, 2015). Vários estudos já mostraram a presença de tripanosomatídeos nesses hospedeiros, como em morcegos pertencentes à espécie *Carollia perspicillata* infectados por *T. cruzi* e *T. dionisii*, marsupiais da espécie *D. aurita* infectados por *T. cruzi*, *Leishmania* sp., *T. dionisii*, *T. rangeli*, entre outros (PONTES, 2015; RODRIGUES, 2016; RANGEL *et al.*, 2019).

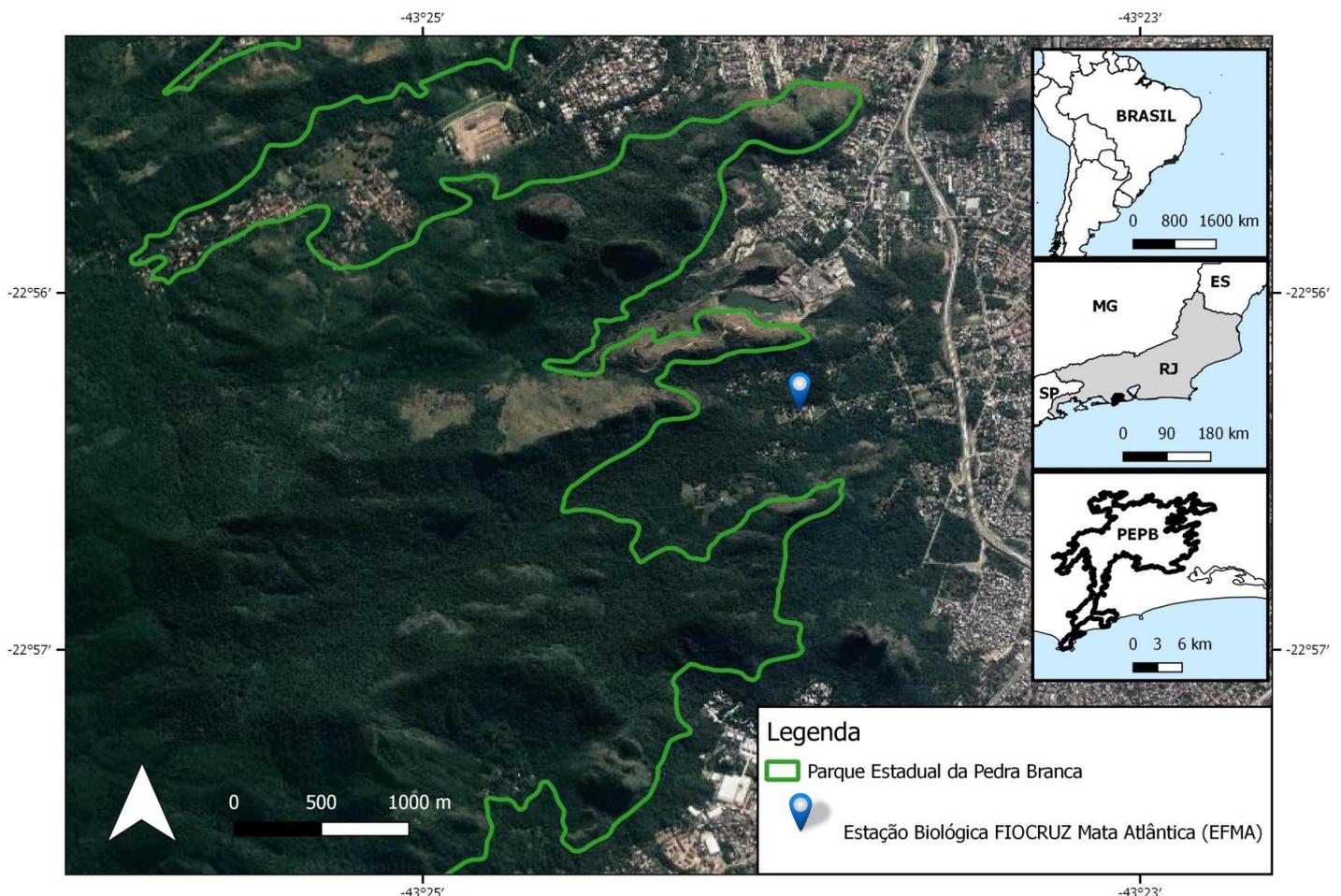
Também existem estudos voltados para os vetores desses tripanosomatídeos, como os realizados em espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomia* sp., que podem transmitir parasitos do

gênero *Leishmania* sp., onde alguns casos de LVA (Leishmaniose Visceral Americana) em caninos e LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana) em caninos e humanos já foram reportados (DE SOUZA *et al.*, 2015; PONTES, 2015).

Apesar desta área da EFMA ser pequena, ela pode revelar relações parasitárias que ajudem a compreender a relação de tripanosomatídeos com pequenos mamíferos, e até mesmo em relação à diversidade de espécies destes parasitas, visto que duas novas espécies de tripanosomatídeos foram descritas em hospedeiros provenientes desta região: *T. janseni* encontrado em tecidos de um indivíduo de *D. aurita* e *T. caninum* encontrado em pele íntegra de cão (MADEIRA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2018).

Esses casos mostram que além das espécies de tripanosomatídeos já conhecidas estarem circulando nesta região, também existe possivelmente uma diversidade ainda desconhecida (e/ou apenas recentemente reconhecida) desses parasitas circulando nesta área (MADEIRA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2018).

MAPA 1: Localização da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica (EFMA) (símbolo azul e branco), próximo ao Parque Estadual da Pedra Branca (área circundada em verde).



2. JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (IOC/FIOCRUZ) realizou expedições na EFMA, onde foram capturadas espécies de morcegos, roedores e marsupiais entre os anos de 2012 a 2014, e nos quais o diagnóstico da infecção por tripanosomatídeos foi realizado através de exame a fresco, cultura de sangue e tecidos, sorologia (RIFI) e PCR em tecidos direcionada a infecção por *Leishmania* sp.

Os resultados positivos encontrados na técnica de exame a fresco indicam alta parasitemia na infecção por tripanosomatídeos, mas não identificam a espécie envolvida na infecção. Os parasitos isolados em culturas de sangue e tecidos foram caracterizados, mas é sabido que o crescimento em culturas axênicas pode ser um importante filtro seletivo em amostras com diferentes populações parasitárias, consequentemente interferindo na detecção da diversidade de espécies de tripanosomatídeos nestes hospedeiros.

O diagnóstico sorológico realizado previamente também não reflete a diversidade destes tripanosomatídeos, uma vez que foi realizado apenas frente à infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* sp. e a possível ocorrência de reações cruzadas é inerente à essa técnica. O único diagnóstico molecular anteriormente realizado em tecidos foi direcionado para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp., que também não aponta a diversidade potencial envolvendo outros gêneros e espécies de tripanosomatídeos que podem estar presentes nos mesmos tecidos.

A abordagem proposta no presente estudo inclui o diagnóstico diretamente em tecidos (pele, baço e fígado) de pequenos mamíferos, utilizando um alvo molecular capaz de detectar potencialmente qualquer espécie dentro da família Trypanosomatidae, aliado a técnicas de sequenciamento gênico e ferramentas de análise filogenéticas para a determinação do status taxonômico dos parasitos diagnosticados.

Além disso, é importante entender a distribuição destes parasitos na natureza através do mapeamento da localização dos tripanosomatídeos presentes nos pequenos mamíferos encontrados nesta área da EFMA, como forma de estabelecer a distribuição espacial das espécies e genótipos dos tripanosomatídeos diagnosticados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar a diversidade de tripanosomatídeos presentes em tecidos de mamíferos silvestres provenientes da Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica (EFMA), Rio de Janeiro/RJ.

3.2. Objetivos Específicos

- Diagnosticar a infecção por parasitos da família Trypanosomatidae a partir do diagnóstico molecular diretamente em tecidos;
- Identificar e construir as relações filogenéticas entre as espécies de tripanosomatídeos identificadas;
- Mapear a distribuição das espécies de mamíferos infectadas por cada espécie de tripanosomatídeos, definindo sua potencial área de expansão.

4. METODOLOGIA

4.1. Área de estudo

A área estudada está situada no Parque Estadual da Pedra Branca, no bairro Taquara (22° 56' 24.04" S e 43° 24' 15.87" O), mais precisamente na EFMA, que é uma estação biológica com cerca de 430 hectares que começou a ser concedido para a FIOCRUZ no ano de 2003, tendo finalizado este processo de concessão no ano de 2015 (COSTA, 2016; Agência FIOCRUZ de Notícias, 2016).

Uma Estação Biológica possui diversas funções como monitoramento, conservação, educação ambiental, entre outras, funcionando como um “laboratório natural” para cientistas, estudantes e públicos interessados em meio ambiente (Agência FIOCRUZ de Notícias, 2016; 2017).

A criação da EFMA ocorreu em 2016, sendo a primeira estação biológica do Município do Rio de Janeiro, do Ministério da Saúde e a primeira a acolher a pesquisa em biodiversidade e saúde no país, além de ser a terceira do mundo localizada em uma região de elevada influência humana, e por esta razão revela um potencial de pesquisas e intervenções interdisciplinares no que diz respeito à saúde ambiental, planejamento urbano, determinantes sociais da saúde, políticas públicas, entre outros (Agência FIOCRUZ de Notícias, 2016; 2017).

A vegetação desta área pode ser classificada como secundária e estratificada, caracterizada como ombrófila densa, possuindo um clima úmido, com temperaturas que podem variar ao longo do ano entre 28°C na estação chuvosa e 19°C na estação seca (RANGEL, 2017; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019).

As coletas nesta região ocorreram em três diferentes áreas de acordo com o nível de degradação do ambiente (MAPA 2):

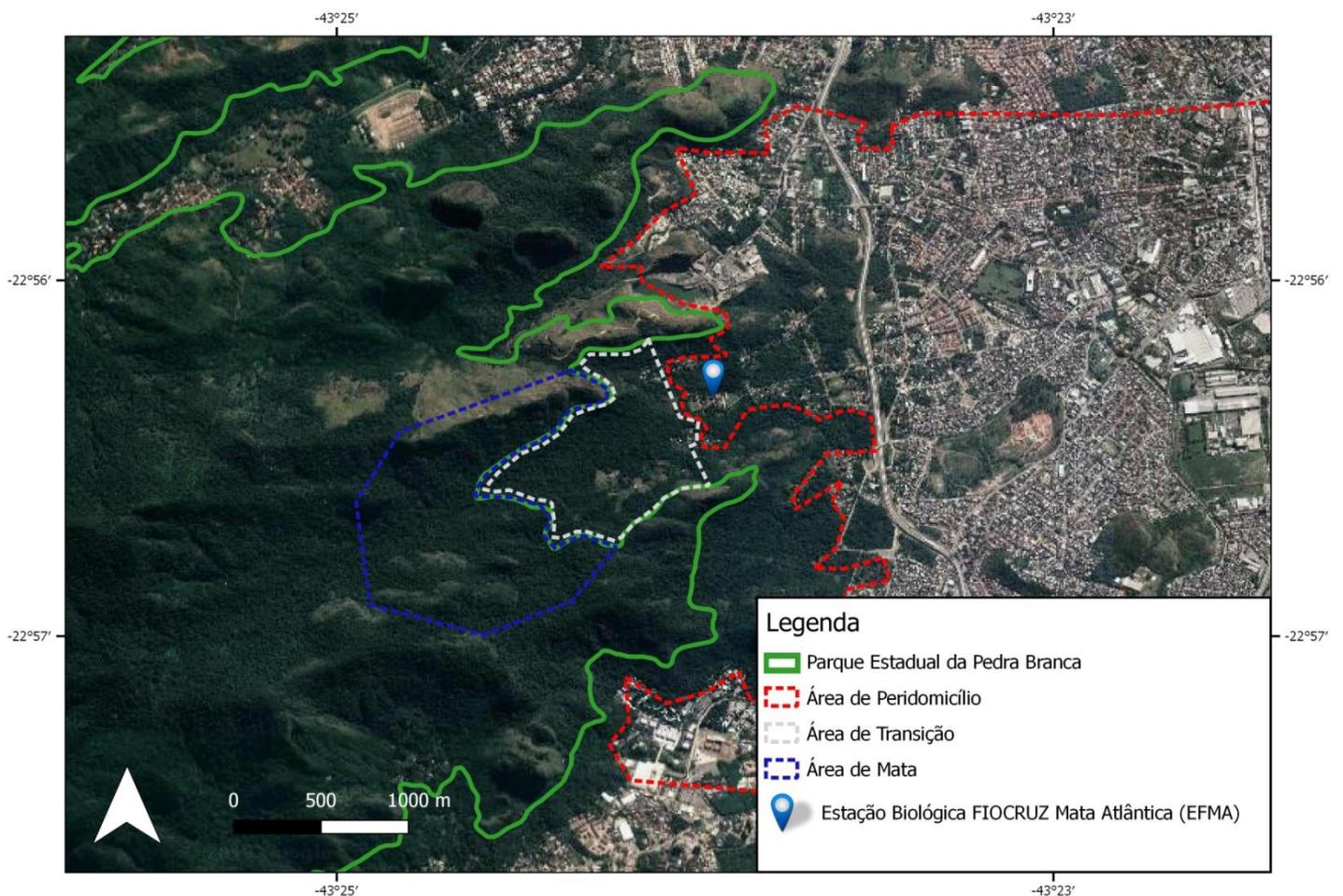
(i) área de peridomicílio: consiste na área mais próxima das habitações humanas e, conseqüentemente, a mais degradada. Ao longo das trilhas desta área é possível encontrar características de intervenções antrópicas, como animais domésticos (cães), locais com esgoto a céu aberto, objetos deixados

por humanos e amplas áreas de gramado com uma grande circulação de veículos.

(ii) área de transição: área intermediária, relativa à borda da floresta, que possui uma distância de cerca de 50m ao início da mata fechada. A vegetação desta área é composta por plantas de porte médio a baixo mesclando áreas conservadas com áreas degradadas, sendo um ambiente que está atualmente passando por um processo de reflorestamento.

(iii) área de mata: é a área mais preservada, onde possui menos interferência antrópica, caracterizando-se por ser uma área de mata fechada com árvores de dossel, onde possui um clima mais úmido em relação às outras áreas de coleta.

MAPA 2: Divisão das áreas de coletas dos pequenos mamíferos: área de peridomicílio está circundada em vermelho, área de transição está circundada em branco e a área de mata está circunda em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca. O símbolo azul e branco representa a localização da Estação Biológica FIOCRUZ Mata Atlântica (EFMA).



4.2. Captura dos pequenos mamíferos e coleta de tecidos

A realização das coletas dos pequenos mamíferos não voadores foi realizada pelo LABPMR, assim como a identificação e processamento das espécies de pequenos mamíferos não voadores.

Os pequenos mamíferos não voadores (marsupiais e roedores) foram atraídos por iscas compostas de uma mistura de banana, bacon, manteiga de amendoim e aveia, onde foram capturados através de armadilhas do tipo “live-traps”, modelos Sherman® (Modelo XLK; 3 x 3.75 x 12 polegadas; Tallahassee, Florida, USA) e Tomahawk® (Modelo 201; 16 x 5 x 5 polegadas; Hazelhurst, Wisconsin, USA).

As trilhas foram dispostas em 6 transectos lineares nomeadas de A a F, onde as trilhas C e D foram classificadas como área de peridomicílio, as trilhas A e B como área de transição e as trilhas E e F como área de mata.

Ao todo foram utilizadas 240 armadilhas-noite por expedição. Cada transecto possuía 20 pontos de captura com uma distância de 10 metros entre cada ponto. Em cada ponto, foi disposta uma armadilha do tipo Sherman® e uma do tipo Tomahawk®.

Os 96 pequenos mamíferos não voadores foram capturados em seis expedições que ocorreram em julho/2012, novembro/2012, abril/2013, julho/2013, novembro/2013 e abril/2014. Ao todo foram coletados 80 espécimes de marsupiais e 16 espécimes de roedores.

A realização das coletas dos pequenos mamíferos voadores foi realizada pelo Programa de Biodiversidade do Campus FIOCRUZ Mata Atlântica, assim como a identificação e processamento das espécies de pequenos mamíferos voadores.

Os 94 pequenos mamíferos voadores (morcegos) foram coletados em cinco expedições que ocorreram nos meses de outubro/2013, novembro/2013, fevereiro/2014, junho/2014 e outubro/2014, através de redes de neblina (mistnets), com uma altura de 2,5m a 3m, e um comprimento entre 6m a 12m.

As 3 áreas de coletas foram denominadas como: P1 (área de peridomicílio), P2 (área de transição) e P3 (área de mata), onde foram utilizadas 10 redes de neblina em um período de 3 noites por 6 horas em cada área de coleta, totalizando a utilização de 90 redes de neblina por expedição.

Todos os pequenos mamíferos capturados foram levados para o laboratório de campo montado na própria EFMA, onde foram eutanasiados para a coleta de seus tecidos para fins diagnósticos, incluindo fragmentos de baço, fígado e pele. Estes foram armazenados em eppendorfs com etanol absoluto e conservados a -20°C em freezer do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP) (IOC/Fiocruz).

4.3. Licenças e Aspectos Éticos

Todos os espécimes de mamíferos silvestres foram capturados em concordância com a Instrução Normativa do IBAMA nº154/2007 (Licenças 13373-1 e 19037-1) e os procedimentos com animais previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), licença LW81-12.

4.4. Diagnósticos anteriormente realizados nos pequenos mamíferos

No presente projeto foram analisadas 422 amostras de tecidos de baço, pele e fígado de pequenos mamíferos, os quais já haviam sido analisados anteriormente através de outros exames de diagnósticos, dentro do escopo de outros projetos do laboratório (PONTES, 2015; RODRIGUES, 2016; SENDER, 2018).

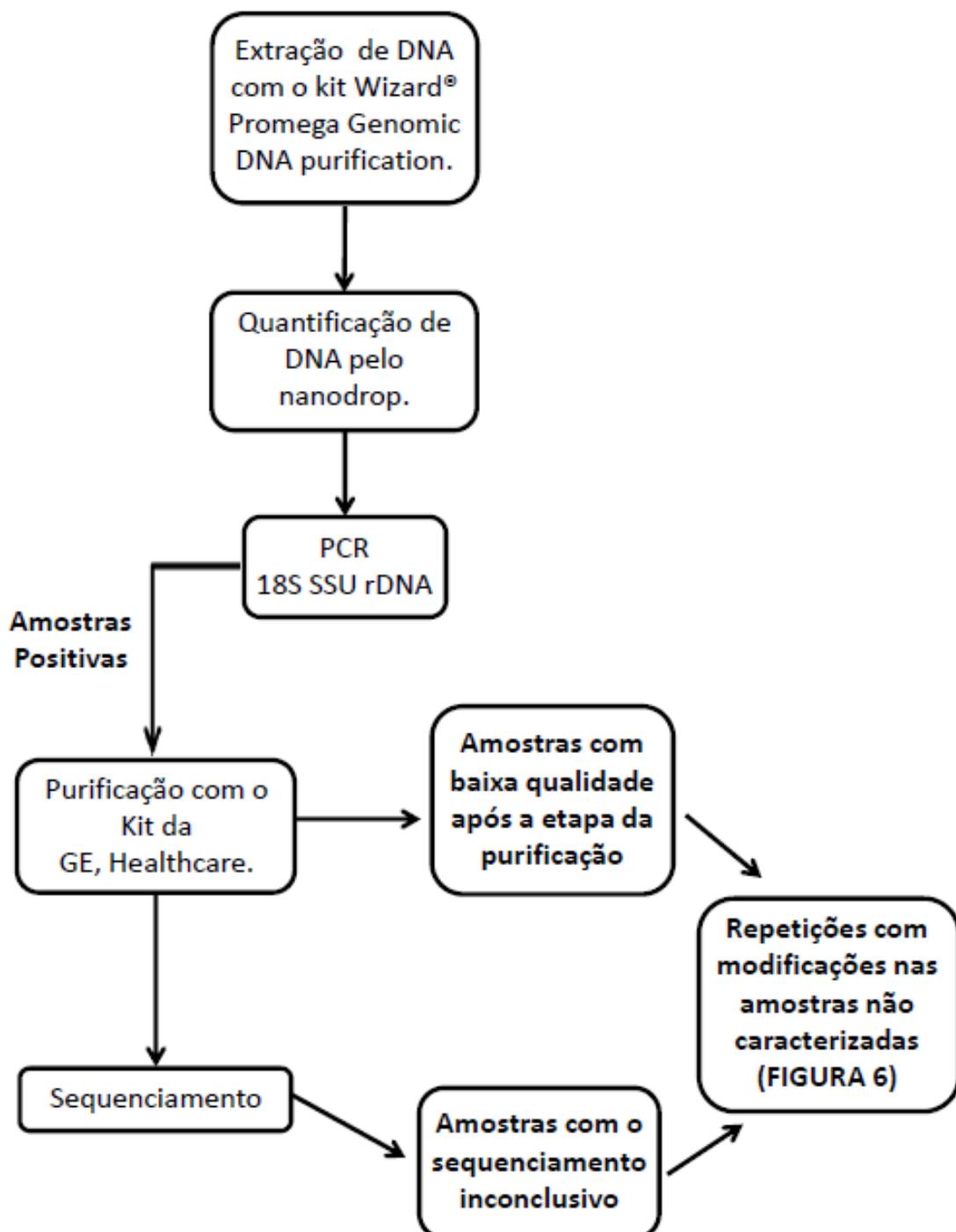
Os pequenos mamíferos terrestres foram submetidos aos exames a fresco de sangue, culturas de sangue e tecidos, sorologia (RIFI) frente a *T. cruzi* e *Leishmania* sp. e PCR em tecidos para diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp., através da utilização do alvo molecular kDNA (PONTES, 2015; RODRIGUES, 2016).

A caracterização molecular dos isolados provenientes das culturas de sangue e tecidos foi realizada através da análise de sequências utilizando-se fragmentos do alvo 18S (SENDER, 2018). Os morcegos foram submetidos aos mesmos exames de diagnósticos (PONTES, 2015; RODRIGUES, 2016), à exceção da sorologia que não é realizada nestes animais pela ausência de conjugados comerciais disponíveis para esse grupo de mamíferos.

4.5. Protocolo Experimental

Todas as 422 amostras de tecidos de baço, fígado e pele utilizados neste estudo passaram pelas seguintes etapas, descritas na FIGURA 5:

FIGURA 5: Organograma das etapas (extração e quantificação de DNA), PCR (alvo 18S SSU rDNA), purificação do DNA amplificado, sequenciamento do DNA que apresentou uma boa qualidade viável na purificação e repetição com modificações nas amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas (conforme o organograma da FIGURA 6) envolvendo as 422 amostras de tecidos de baço, fígado e pele dos pequenos mamíferos examinados.



4.5.1. Extração de DNA dos tecidos

O DNA das 422 amostras de tecidos já havia sido previamente extraído no período em que foram coletadas (2012 a 2014), através do kit Wizard® Promega Genomic DNA purification, Madison, EUA.

Antes da utilização do kit de extração, os tecidos passaram por uma lavagem e hidratação através da resuspensão em H₂O ultra pura, onde essa etapa era repetida por três vezes seguidas.

Depois deste processo os tecidos eram distribuídos em papel filtro para a secagem dos mesmos, e a partir desta etapa o processo de extração se dava de acordo com as recomendações do fabricante, que consistia em adicionar fragmentos de tecidos medindo entre 0,5 a 1 cm em tubos de 1,5 mL estéreis juntamente com a mistura das soluções “Nuclei Lysis Solution” (500µL), 0,5M EDTA (120 µL) e proteinase K (17,5 µL), e colocados em um termobloco (BIOPLUS IT-2002) sob temperatura de 55 °C por 3 h com o intuito de dissolver os fragmentos de tecidos.

Após essa etapa foi adicionado 200 µL da solução “Protein Precipitation Solution” para a separação do DNA e os restos celulares dos tecidos, onde os mesmos foram agitados em Vórtex (LABNET - ANALÍTICA) rigorosamente por 20 s e colocadas em uma centrífuga (Eppendorf – Centrifuge 5424) a 14.000 g por 4 min. O sobrenadante resultante da centrifugação foi adicionado em novos tubos contendo 600 µL de Isopropanol, dando início a etapa de precipitação do DNA, onde as amostras foram colocadas em um agitador (UNICO® - Test Tube Rocker 200) por 10 min.

Posteriormente a essa etapa as amostras passaram por outro processo de centrifugação a 14.000 g por 1 min., onde o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 600 µL de etanol 70% nas amostras, e então colocadas no agitador por 5 min. Após esse procedimento, esta etapa foi repetida mais uma vez, onde o sobrenadante foi desprezado e o tubo com as amostras foi distribuído em papel filtro por 20 min. para a secagem do etanol.

Ao final da extração foram adicionados nas amostras 100 µL da solução de reidratação “DNA Rehydrataion Solution”, e as mesmas foram colocadas para incubação no termobloco a 65°C por 1 h. Após esse processo as amostras foram armazenadas -20°C em freezer na DNAteca.

Foram utilizados como controles positivos e negativos, tecidos de hamsters infectados experimentalmente e não infectados, respectivamente, provenientes do biotério do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), e todos os tecidos utilizados como controles haviam sido previamente testados. O controle positivo estava infectado com a cepa de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) obtida da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC).

Todas as amostras foram quantificadas pelo nanodrop 1000 thermoscientific®, onde o valor da quantificação foi utilizado como base para a quantidade de DNA utilizada na reação de PCR.

As amostras que mostraram resultado negativo no nanodrop foram submetidas a análises através do gel de agarose a 2% para confirmação de seu estado de preservação. As amostras que de fato estavam degradadas apresentavam um rastro de DNA no gel de agarose a 2%, e por esta razão amostras destes tecidos foram submetidas à nova extração de DNA pelo mesmo kit Wizard® Pomega Genomic DNA purification.

4.5.2. Diagnóstico molecular

O alvo utilizado foi o 18S SSU (subunidade menor) rDNA que é constituída por oito regiões conservadas (U1-U8) e por nove regiões variáveis (V1-V9) (HERNÁNDEZ *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 2008). A sua utilização no diagnóstico de tripanosomatídeos é comumente empregada, por conta de suas regiões variáveis e não variáveis (diferentes níveis de conservação) que possibilitam a diferenciação entre as espécies de tripanosomatídeos, além da ampla disponibilidade de sequências de referência depositadas em bancos de dados.

As 422 amostras foram submetidas à amplificação por meio de uma Nested-PCR que consiste em uma PCR com duas etapas distintas (2 *rounds*), onde ambas foram submetidas à uma ciclagem de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial à 95 °C por 15 min., seguido por 30 ciclos à 94 °C por 30 s, 55 °C por 60 s e 72 °C por 92 s em um Termociclador Swift™ Max Pro Thermal Cycler 16 (modelo SWT-MXP-BLC-1). Foi utilizado um volume final de 25 µL, contendo 13,5 µL de H₂O ultrapura, 8,5 µL de Go Taq Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2µL de DNA em ambas as etapas.

No primeiro *round* foi utilizado 0,5 μ L dos primers TRY R (5'CTACTGGGCAGCTTGGA3') e F (5'GAAACAAGAAACACGGGAG3') (Eurofins Genomics®) a 16 pmol e no segundo *round* foi utilizado 0,5 μ L dos primers SSU R (5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3') e F (5'TGGGATAACAAAGGAGCA3') (Eurofins Genomics®) a 16 pmol. Após o término do primeiro *round*, o mesmo foi diluído em uma concentração de 1:10, e desta diluição, 2 μ L de DNA amplificado foi utilizado no segundo *round* da Nested-PCR, para uma nova amplificação deste DNA.

As amostras de DNA que apresentaram um valor maior que 200 ng na quantificação no nanodrop foram diluídas em H₂O ultra pura em uma concentração de 1:1 para evitar que a alta concentração de DNA interferisse nas reações de PCR. Desta diluição, 2 μ L de DNA eram utilizadas nas reações.

Já as amostras em que o valor de DNA era menor que 100 ng na quantificação no nanodrop, não foram diluídas e obtiveram o volume de DNA aumentado para 5 μ L nas reações de PCR, evitando que a baixa concentração de DNA pudesse interferir na reação. O volume de H₂O também foi adaptado para manter o volume final de 25 μ L.

Todas as amostras que ficaram entre o valor de 100 ng a 200 ng na quantificação no nanodrop, foram aplicadas no volume de 2 μ L nas reações de PCR, onde não sofreram nenhum tipo de modificação, como diluição na concentração de 1:1 do DNA ou aumento do mesmo para 5 μ L. Foi utilizado como controle positivo, DNA de *T. cruzi* proveniente de hemocultura (cepa Y), e como controle negativo H₂O ultrapura.

O produto amplificado foi aplicado (5 μ L) em gel de agarose (Sigma-Aldrich®) 2% em tampão TBE (Tris 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal utilizando fontes modelo PW300 (PWSys18) a 85 V, durante 1,5 h. Após esta etapa, o gel e as suas bandas (banda de interesse 600pb) foram visualizados no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MISE, utilizando como referência um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Ludwig Biotec).

4.5.3. Identificação taxonômica dos parasitos

Após a PCR, os produtos amplificados foram purificados de acordo com as suas especificações: (i) as amostras que mostravam banda única no gel de agarose eram purificadas diretamente pelo produto da PCR; e (ii) as amostras que aparentavam bandas inespecíficas além da banda de interesse da altura de 600 pb foram sacadas com um bisturi, através da visualização da banda de interesse pelo transiluminador (UV transilluminator 2000-Bio-Rad).

Após esse processo todas as amostras foram purificadas com o kit ilustra™ GFX™ PCR DNA / Gel Band Purification (GE, Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, onde eram compostos por colunas, filtros e três tampões de lavagem que consistia em: adicionar 500 µL de tampão tipo 3 (captura) para cada 100 µL de amostra, em ambos os tipos (direto do produto da PCR e amostras com bandas sacadas), onde após essa etapa as amostras com bandas sacadas foram colocadas em um termoshaker (UNISCIENCE/ BIOSAN/ TS-100) por 20 min. para o derretimento do gel de agarose a 2%. Em seguida todas as amostras foram despejadas na coluna e filtro de purificação, onde ficaram por 10 min. em temperatura ambiente e em seguida passaram por uma centrifugação (Eppendorf - Centrifuge 5415 C) de 12.000 g por 30 s.

Após esse procedimento foram adicionados 500 µL do tampão tipo 1 (lavagem) na coluna, onde as mesmas foram centrifugadas por mais 30 s a 12.000 g e depois desta etapa foram adicionados 20 µL do tampão tipo 6 (eluição), por fim todas as amostras ficaram por 10 min. em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas por 3 min. a 12.000 g.

Após a etapa de purificação, as amostras foram visualizadas em gel de agarose a 2% para confirmação do resultado da purificação.

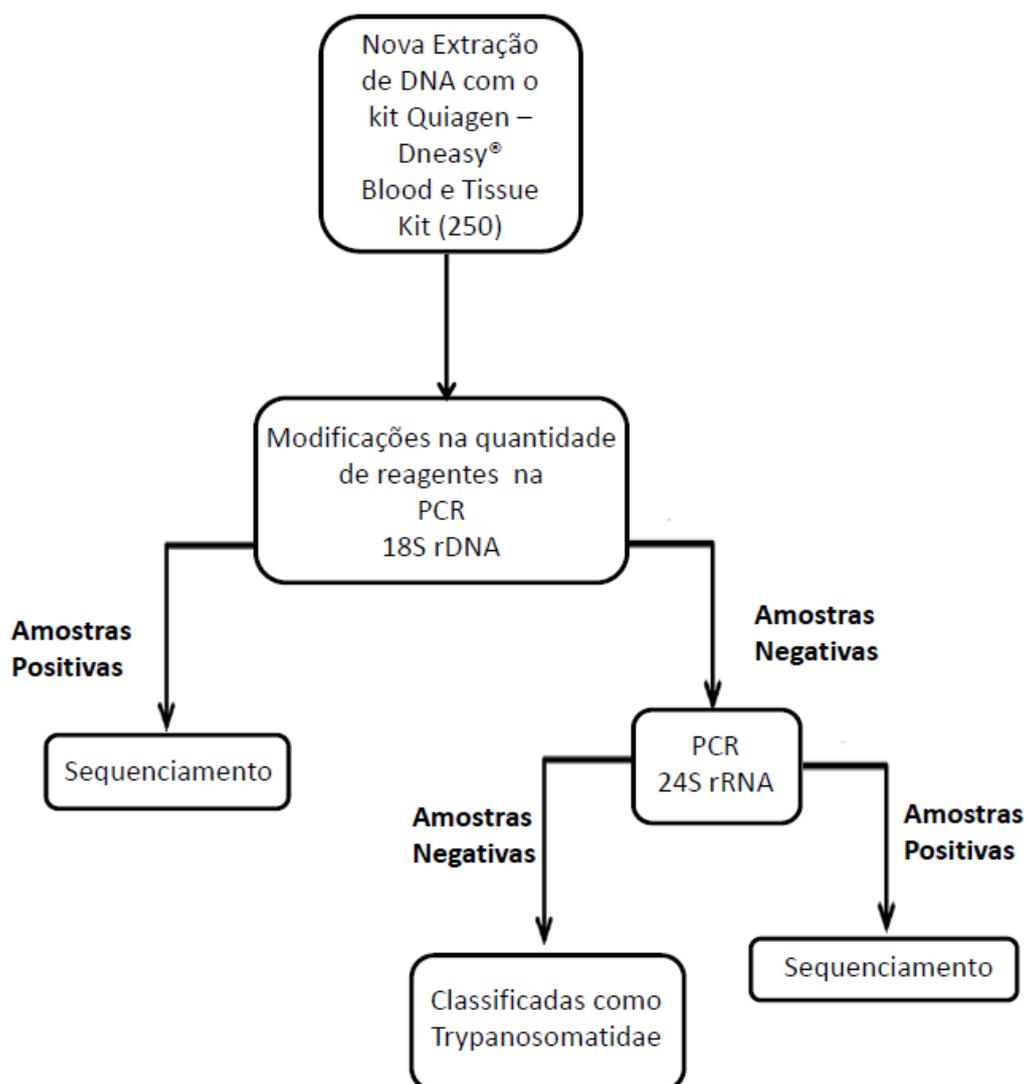
As amostras de DNA purificadas foram preparadas para o sequenciamento através de uma reação que é composta por 1 µL de primer R e 1 µL primer F (iniciadores), até 6,5 µL de DNA, H₂O ultra pura (para completar o volume da reação quando a quantidade de DNA for inferior a 6,5 µL), 100 µL de Big Dye e 150 µL de tampão de sequenciamento 5x, onde passam pelas etapas de precipitação e desnaturação e então sequenciadas em um sequenciador automático (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) na

Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz, onde são geradas as fitas gênicas para posterior análise filogenética.

As amostras que não foram sequenciadas por conta da perda de DNA na etapa da purificação por apresentarem bandas muito fracas e/ou por conterem muitas bandas inespecíficas; e as amostras que retornavam do sequenciamento com eletroferogramas que apresentavam picos muito altos e/ou muito baixos foram repetidas em condições distintas das descritas anteriormente para a sua caracterização.

As modificações realizadas nessas amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas ocorreram conforme descrito na FIGURA 6.

FIGURA 6: Organograma das modificações (nova extração de DNA com o Kit Quiagen, modificações na quantidade de reagentes na PCR (18S rDNA) e PCR através do alvo 24SrRNA) realizadas nas amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas. As amostras que não foram possíveis de serem caracterizadas, mesmo com essas modificações foram classificadas como Trypanosomatidae.



A nova extração de DNA foi realizada através da utilização do kit Quiagen – Dneasy® Blood e Tissue Kit (250), após uma resuspensão em H₂O ultra pura, etapa que foi repetida por três vezes seguidas. Após esse processo os tecidos foram distribuídos em papel filtro para a sua secagem, e partir desta etapa o processo de extração se deu de acordo com as recomendações do fabricante do kit, que consistia em adicionar fragmentos de tecidos medindo entre 10 mg (baço) e 25 mg (outros tecidos) em tubos de 1,5 mL estéreis, juntamente com 180 µL do buffer ATL e 20 µL de proteinase K. Os tecidos foram agitados em vórtex (BASIC KASVI K45-2810 - VORTEX) e incubados (VHD - Thermo-Shaker) a 56 °C até estarem completamente lisados.

Após este procedimento foi adicionado 200 µL do buffer AL, onde foram misturados através do vórtex, e em seguida foi adicionado 200 µL de etanol (96% - 100%), onde foram novamente misturados pelo vórtex e colocados nas colunas e filtros provenientes do kit para então serem centrifugados (Thermo Scientific - Sorvall Legend Micro 17 Centrifuge) a 6000 g por 2 min.

Após esta etapa foi adicionado 500 µL do buffer AW1 e centrifugados novamente nas mesmas condições. Após este procedimento foram adicionados 500 µL do buffer AW2 e centrifugação a 20000 g por 3 min. Por fim foram adicionados 50 µL tampão de eluição buffer AE, onde as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min., centrifugadas por 3 min. a 6000 g e armazenadas em freezer a -20°C.

Além dessa nova extração de DNA também houve modificações nas quantidades de reagentes na PCR (alvo 18S) com o intuito de melhorar a rentabilidade do material amplificado, onde foram utilizados: 2 µL ou 5 µL de DNA (dependendo do valor da quantificação da amostra), 8,5 µL ou 5,5 µL de H₂O ultra pura (dependendo da amostra), 12,5 µL de Go Taq Master Mix, 1,0 µL dos primers R e F (TRY/SSU) a 20 pmol e uma ciclagem de 35 ciclos que consistia na desnaturação inicial a 94 °C por 3 min.; seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 60 s, e 72 °C por 90 s; e a etapa final de extensão à 72 °C por 10 min.

Após essas modificações algumas amostras ainda continuaram sem a possibilidade de sua caracterização, e por esta razão foi realizada uma PCR com outro alvo molecular, 24S rRNA, que corresponde à subunidade

ribossomal maior (ARRUDA *et al.*, 1990), amplificando de 200 a 300 pares de bases.

Esta tentativa de caracterização das amostras ocorreu, a partir das seguintes condições: 5 µL de DNA, 12,5 µL de Go Taq Master Mix, 2 µL dos primers (Invitrogen™) F D75 (5'GCAGATCTTGGTTGGCGTAG3') e R D76 (5'GGTTCTCTGTTGCCCTTTT3') a 10 pmol e 3,5 µL de H₂O ultrapura.

A ciclagem desta PCR é composta pelos seguintes ciclos: 1 ciclo a 94 °C por 15 min.; 3 ciclos a 94 °C por 1 min., 60 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; 3 ciclos a 94 °C por 1 min., 58 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; 3 ciclos a 94 °C por 1 min., 56 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; 3 ciclos a 94 °C por 1 min., 54 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; 35 ciclos a 94 °C por 1 min., 52 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; 1 ciclo a 72 °C por 10 min.

4.6. Análise Filogenética

Para as análises filogenéticas, as sequências R e F foram pareadas e editadas manualmente através do programa SeqMan-DNAstar (LASERGENE, 1994). Após esta etapa, as sequências editadas foram salvas com extensão fasta e comparadas por similaridade, com outras sequências depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Para a identificação das espécies foram levados em consideração os seguintes valores de similaridade de cobertura (>98%), identidade (>96%) e E-value (0,0). O alinhamento das sequências e construção das árvores filogenéticas foi realizado utilizando o programa Mega 6, onde apenas as sequências que possuíam o tamanho mínimo de 400 pb foram incluídas.

As árvores filogenéticas foram construídas, a partir das sequências provenientes do gene 18S utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML), empregando o melhor modelo de parâmetro estatístico escolhido no programa (*Akaike information criterion* (AIC)) para cada grupo de sequências (TAMURA *et al.*, 2011).

4.7. Análise Espacial

Para análise da distribuição espacial dos tripanosomatídeos, os locais de captura de seus hospedeiros foram georreferenciados com receptor GPS (Sistema de Posicionamento Global). Todas as coordenadas foram obtidas do ponto exato de captura no formato de coordenadas grau decimal e o sistema geodésico adotado foi WGS 84 (World Geodetic System). Essas coordenadas foram previamente coletadas pelos laboratórios colaboradores das coletas: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR) (marsupiais e roedores) e equipe da EFMA (morcegos).

A imagem de satélite dos locais de coleta foi obtida através do programa Terra Incognita™ e sobrepostas em camadas vetoriais do limite municipal do Estado do Rio de Janeiro, obtido do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (<<https://www.ibge.gov.br/>>) e o limite da unidade de conservação do Parque Estadual da Pedra Branca do Estado do Rio de Janeiro foi obtido junto ao Ministério do Meio Ambiente (<<https://www.mma.gov.br/>>), através de arquivos no formato *shapefile* (shp).

Os limites das áreas de coletas (peridomicílio, transição e mata) foram definidos pela equipe da EFMA, através dos diferentes níveis de degradação das áreas. Todos os mapas foram construídos através do programa *Quantum GIS*® versão 2.18.23 (QGIS).

4.8. Análise Estatística

Para a realização da análise estatística foi utilizado o teste Qui-quadrado, através do programa Microsoft Excel 2007, onde os valores eram considerados significativos, quando o valor de *P* era menor que 0,05.

5. RESULTADOS

Das 422 amostras de tecidos de pele, baço e fígado analisadas, 33 (7,8%) foram positivas no diagnóstico molecular. Esses tecidos positivos eram provenientes de 26 indivíduos: três roedores, nove marsupiais e 14 morcegos (QUADRO 1).

Dentre os tecidos analisados frente à infecção por tripanosomatídeos, o baço teve o maior número de positivos (17), seguido pelo fígado (10) e pele (6). Sete indivíduos obtiveram mais de um tecido positivo para a infecção por tripanosomatídeos, onde o baço sempre esteve associado a outro tecido, como: pele em *Metachirus nudicaudatus* (n=1), *Didelphis aurita* (n=1), *Micoureus paraguayanus* (n=2) e *Akodon cursor* (n=1); ou fígado em *Marmosa paraguayana* (n=1) e *Myotis nigricans* (n=1) (QUADRO 1).

QUADRO 1: Informações e classificação dos tecidos positivos frente à infecção por tripanosomatídeos, através do diagnóstico molecular.

Nº de Registro	Ordem	Pequeno Mamífero	Data de Captura	Área de Coleta*	Tecido**	Diagnóstico da infecção	
LBCE 15991	Rodentia	<i>Akodon cursor</i>	11/2013	P	B	Trypanosomatidae	
					P	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 15994		<i>Akodon cursor</i>	11/2013	P	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 15995		<i>Rattus rattus</i>	11/2013	P	F	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 15999	Didelphimorphia	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	11/2013	T	B	Trypanosomatidae	
					P	Trypanosomatidae	
LBCE 16000		<i>Didelphis aurita</i>	11/2013	T	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
					P	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 17666		<i>Didelphis aurita</i>	07/2012	T	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 17670		<i>Didelphis aurita</i>	07/2012	P	F	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 17675		<i>Didelphis aurita</i>	07/2012	T	P	Trypanosomatidae	
LBCE 17678		<i>Marmosa paraguayana</i>	07/2012	M	P	Trypanosomatidae	
					B	Trypanosomatidae	
LBCE 17679		<i>Marmosa paraguayana</i>	07/2012	M	P	Trypanosomatidae	
					B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 17685		<i>Marmosa paraguayana</i>	07/2012	M	F	Trypanosomatidae	
					B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	
LBCE 17737		<i>Didelphis aurita</i>	11/2013	P	B	Trypanosomatidae	
RM 436		Quiróptera	<i>Carollia perspicillata</i>	10/2013	M	F	<i>Trypanosoma</i> sp, Neobat 1
RM 438			<i>Carollia perspicillata</i>	10/2013	T	F	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 4
RM 452	<i>Myotis nigricans</i>		11/2013	P	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 462	<i>Myotis nigricans</i>		11/2013	P	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
					F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 463	<i>Desmodus rotundus</i>		11/2013	P	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 468	<i>Carollia perspicillata</i>		11/2013	T	B	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 4	
RM 481	<i>Artibeus lituratus</i>		02/2014	P	B	Trypanosomatidae	
RM 491	<i>Mimon bennettii</i>		02/2014	T	B	<i>Trypanosoma</i> sp, Neobat 1	
RM 493	<i>Artibeus lituratus</i>		02/2014	T	B	<i>Trypanosoma</i> sp, Neobat 1	
RM 500	<i>Dermanura cinerea</i>		02/2014	M	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 501	<i>Mimon bennettii</i>		02/2014	M	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 541	<i>Micronycteris minuta</i>		06/2014	T	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	
RM 565	<i>Plathirynus reciphinus</i>		10/2014	P	F	<i>Trypanosoma rangeli</i> A	
RM 578	<i>Artibeus lituratus</i>		10/2014	T	B	Trypanosomatidae	

* M = Mata, P = Peridomicílio e T= Transição.

** B = Baço, F = Fígado e P = Pele.

5.1. Caracterização dos tripanosomatídeos

A identificação das espécies de tripanosomatídeos foi possível em 22 dos 33 tecidos positivos (66,7%). Além disso, apenas duas destas amostras obtiveram valor de E-value acima de 0.0. Isso ocorreu por conta do tamanho das sequências que foi inferior a 600pb, pois o alvo molecular utilizado para a caracterização dessas duas amostras foi o 24S rRNA que amplifica de 200 a 300 pb (QUADRO 2).

QUADRO 2: Tripanosomatídeos identificados no nível de espécie e suas respectivas informações relacionadas aos valores de identidade, cobertura, e-value, alvo molecular utilizado (18S e 24S) e a sequência de referência junto com o número de acesso da mesma no GenBank.

Nº de Registro	Tecido*	Tripanosomatídeo Identificado	Identidade	Cobertura	E-value	Alvo Molecular	Sequência de referência	Acesso no GenBank
LBCE 15994	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	98,88%	99%	3e-130	24S	Sylvio x10/cl1 Tcl7	CP015657
LBCE 15995	F	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	100%	99%	4e-140	24S	Sylvio x10/cl1 Tcl25	CP015675
LBCE 15991	P	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	98,71%	98%	0.0	18S	EM 715	MH411644
LBCE 16000	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	99,68%	100%	0.0	18S	Jose clone 2	AY785574
LBCE 16000	P	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	99,54%	99%	0.0	18S	Jose clone 2	AY785574
LBCE 17666	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	100%	99%	0.0	18S	Mogi	KF788250
LBCE 17670	F	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	98,69%	100%	0.0	18S	CBT 152	KP197167
LBCE 17679	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	100%	99%	0.0	18S	Mogi	KF788250
LBCE 17685	B	<i>Trypanosoma cruzi</i> Tcl	100%	99%	0.0	18S	Mogi	KF788250
RM 452	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	99,65%	100%	0.0	18S	543CT	KY689927
RM 462	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	98,79%	99%	0.0	18S	543CT	KY689927
RM 462	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	99,13%	100%	0.0	18S	543CT	KY689927
RM 463	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	98,72%	100%	0.0	18S	R15-094	KX227603
RM 500	B	<i>Trypanosoma dionisii</i>	100%	100%	0.0	18S	LBT 5226	MF141883
RM 501	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	99,65%	100%	0.0	18S	543CT	KY689927
RM 541	F	<i>Trypanosoma dionisii</i>	99,58%	100%	0.0	18S	570CT	KY689931
RM 438	F	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 4	100%	100%	0.0	18S	HLN443	MH319702
RM 468	B	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 4	100%	100%	0.0	18S	HLN443	MH319702
RM 436	F	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 1	98,56%	100%	0.0	18S	RNMO63	KT368796
RM 491	B	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 1	99,82%	100%	0.0	18S	RNMO63	KT368796
RM 493	B	<i>Trypanosoma</i> sp. Neobat 1	99,82%	99%	0.0	18S	RNMO63	KT368796
RM 565	F	<i>Trypanosoma rangeli</i> A	96,39%	100%	0.0	18S	LBCE 18618	MN381027

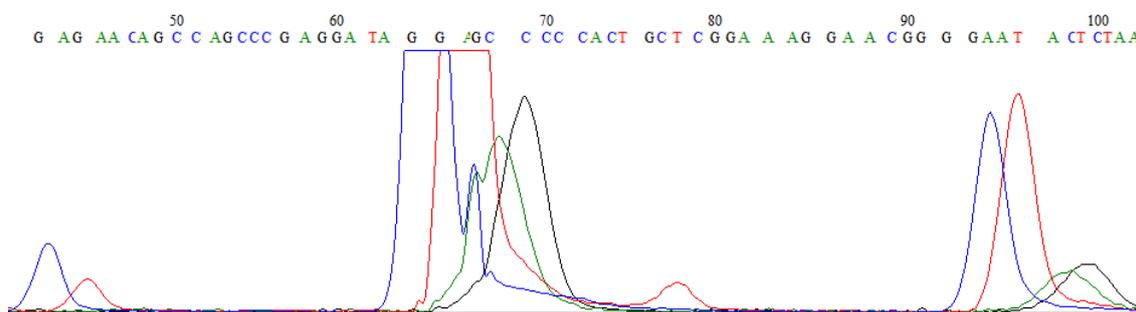
* B = Baço, F = Fígado e P = Pele.

Das 33 amostras positivas, 11 não foram possíveis de serem caracterizadas, mesmo havendo inúmeras repetições de suas reações com modificações na quantidade de reagentes utilizados, ciclagem e utilização de outros primers. Essa dificuldade provavelmente ocorreu por conta das bandas com intensidade fraca e/ou presença de bandas inespecíficas visualizadas no gel de agarose (FIGURA 7), dificultando a purificação da mesma, e conseqüentemente o seu sequenciamento que apresentava eletroferogramas com picos muitos altos e/ou muitos baixos (FIGURA 8). Essas amostras foram caracterizadas como Trypanosomatidae.

FIGURA 7: Imagem representativa de um gel de agarose a 2% (PCR - alvo 18S). As amostras LBCE 17678B e RM 481B, exemplificam as amostras com bandas fracas e com muitas bandas inespecíficas (sinalizado em vermelho), respectivamente. Controle positivo: *Trypanosoma cruzi* proveniente da Cepa Y; Controle negativo: H₂O ultra pura; Marcador: peso molecular de 100 pares bases.



FIGURA 8: Imagem representativa de uma amostra não caracterizada, onde apresentou um eletroferograma com picos muito altos e baixos.



5.2. Análise Filogenética dos tripanosomatídeos caracterizados

Das 22 amostras caracterizadas, 19 foram utilizadas na construção das árvores filogenéticas (FIGURAS 9 e 10). As três amostras não incluídas nas árvores filogenéticas foram: LBCE 15994B, LBCE 15995F e RM 436F.

As amostras LBCE 15994B e LBCE 15995F, foram caracterizadas como *T. cruzi* TcI, e não foram incluídas nas árvores por se tratarem de amostras com sequências curtas (< 300 pb) e com o E-value acima de 0.0, o que certamente interferiria na construção das árvores filogenéticas e na posição filogenética correta das outras sequências.

A amostra RM 436F, caracterizada como *Trypanosoma* sp. Neobat 1, não foi incluída na árvore filogenética mesmo possuindo uma sequência acima de 400 pb e com o valor de E-value 0.0, sua inserção na árvore filogenética estava interferindo na posição filogenética correta das outras sequências utilizadas.

As duas árvores filogenéticas representam o clado *T. cruzi*. A primeira (FIGURA 9) contempla a posição filogenética dos tripanosomatídeos caracterizados como: *T. cruzi* TcI, *T. dionisii* e *T. rangeli* A. A segunda árvore filogenética (FIGURA 10), representa o clado dos Neobats caracterizados como: *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e *Trypanosoma* sp. Neobat 4. A escolha por fazer duas árvores filogenéticas, se deu em razão da posição filogenética errônea de algumas sequências, quando gerava apenas uma árvore filogenética com todas as 19 amostras incluídas.

Das 19 amostras incluídas nas árvores filogenéticas, três apresentaram ramificações com relação as sequências de referências utilizadas (FIGURA 9): RM 463B E RM 541F, caracterizadas como *T. dionisii*; RM 565F, caracterizada como *T. rangeli* A.

FIGURA 9: Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene 18S SSU rDNA por meio do método de Máxima Verossimilhança. A árvore indica a posição filogenética os tripanosomatídeos caracterizados como: *Trypanosoma cruzi* TcI (circundado em rosa), *Trypanosoma dionisii* (circundado em verde) e *Trypanosoma rangeli* A (circundado em roxo). Todas as seqüências de referência utilizadas estão com os seus respectivos números de acesso e são provenientes do banco de dados do GenBank. Os tecidos de baço (B), fígado (F) e pele (P), estão ao lado dos respectivos números de registros das amostras caracterizadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. A barra de escala mostra o número de substituições nucleotídicas por local. *Trypanosoma wauwau* foi utilizado como grupo externo.

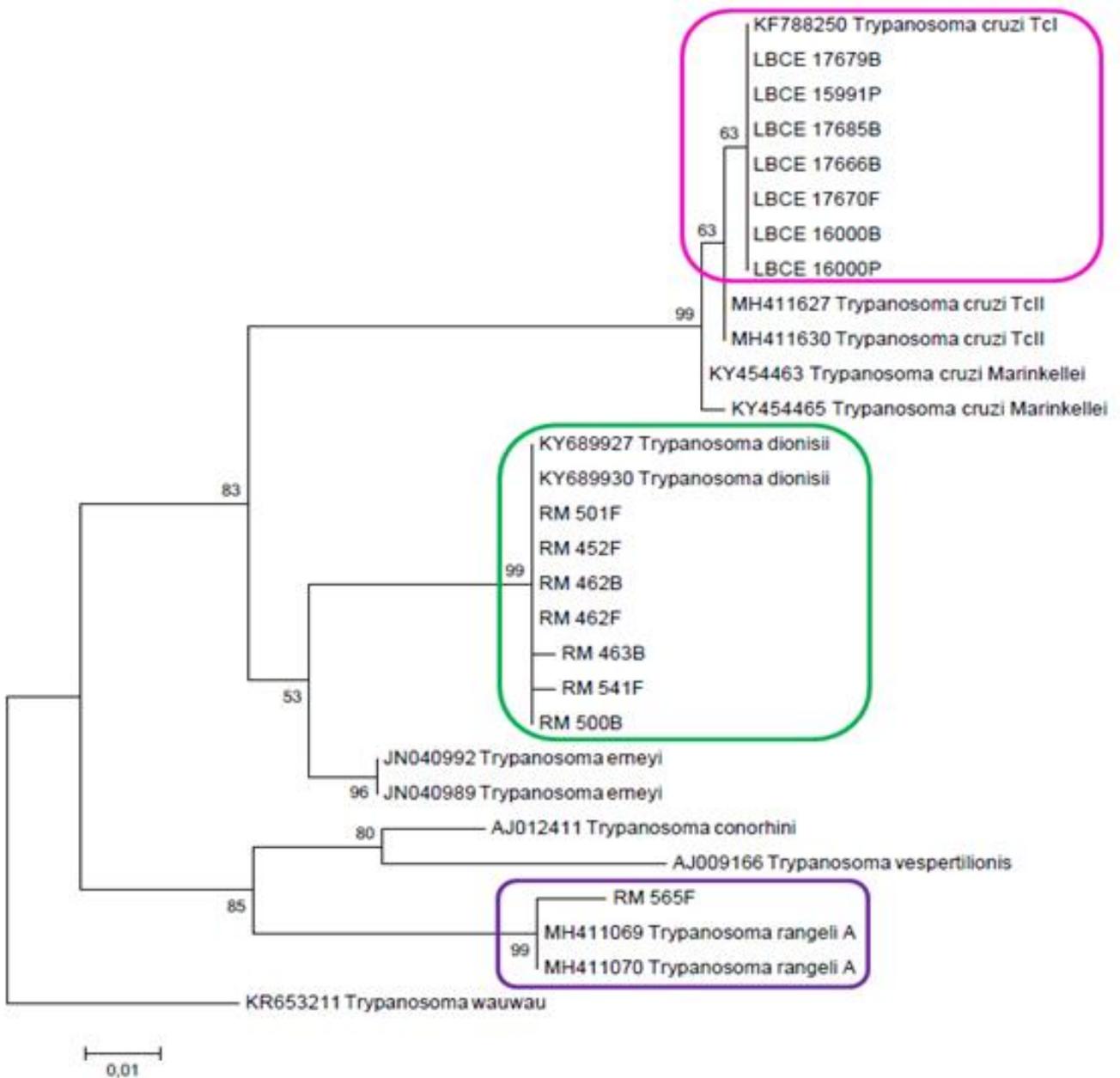
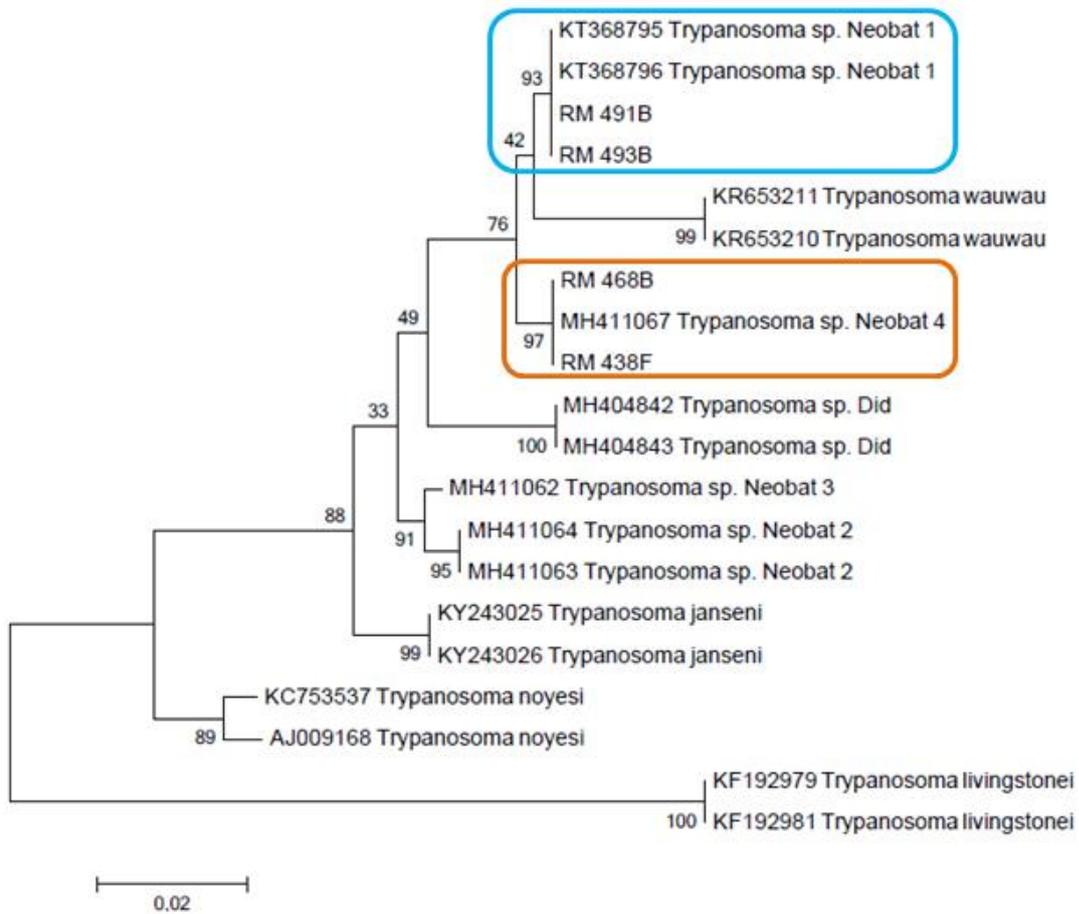


FIGURA 10: Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 18S SSU rDNA por meio do método de Máxima Verossimilhança. A árvore indica a posição filogenética os tripanosomatídeos caracterizados como: *Trypanosoma* sp. Neobat 1 (circundado em azul) e *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (circundado em laranja). Todas as sequências de referência utilizadas estão com os seus respectivos números de acesso e são provenientes do banco de dados do GenBank. Os tecidos de baço (B), fígado (F), estão ao lado dos respectivos números de registros das amostras caracterizadas. Os números nos nós correspondem aos valores de apoio estatístico das inferências derivados de 1000 replicações de *bootstrap*. A barra de escala mostra o número de substituições nucleotídicas por local. *Trypanosoma livingstonei* foi utilizado como grupo externo.



5.3. Amostras positivas em outros diagnósticos

Dos 26 indivíduos que obtiveram os seus tecidos positivos para a infecção por tripanosomatídeos, 15 foram positivos em outros testes diagnósticos, sendo nove pequenos mamíferos terrestres (QUADRO 3) e seis pequenos mamíferos voadores (QUADRO 4) (PONTES, 2015; RODRIGUES, 2016; SENDER, 2018).

Os indivíduos de pequenos mamíferos terrestres foram positivos em dois diagnósticos (QUADRO 3):

1. Sorologia (RIFI) direcionada para a detecção das infecções causadas por *T. cruzi* e *Leishmania* sp., onde sete indivíduos foram positivos neste diagnóstico: quatro indivíduos positivos para a infecção somente por *T. cruzi*, um indivíduo positivo somente para a infecção por *Leishmania* sp., além de dois indivíduos positivos para ambas as infecções (PONTES, 2015).
2. Hemocultivo positivo em três indivíduos, onde um indivíduo apresentou infecção por *T. cruzi*, tanto para a DTU TcI quanto TcII. Outro indivíduo mostrou infecção por *T. janseni* e um terceiro indivíduo foi positivo para a infecção por algum tripanosomatídeo que não foi possível de ser caracterizado (PONTES, 2015; SENDER, 2018).

Além disso, um espécime de *D. aurita* foi positivo na sorologia (RIFI) e no hemocultivo (QUADRO 3).

QUADRO 3: Informações dos pequenos mamíferos terrestres positivos nos diagnósticos realizados anteriormente: sorologia (RIFI) e hemocultivo (PONTES, 2015; SENDER, 2018).

Nº de Registro	Espécie	Sorologia (RIFI)	Hemocultivo
LBCE 15995	<i>Rattus rattus</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/10	–
LBCE 15999	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	–	Positivo (N.R.)
LBCE 16000	<i>Didelphis aurita</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/80	<i>Trypanosoma cruzi</i> TCI e TCII*
LBCE 17666	<i>Didelphis aurita</i>	<i>Leishmania</i> sp. 1/40	–
LBCE 17675	<i>Didelphis aurita</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/80 <i>Leishmania</i> sp. 1/40	–
LBCE 17678	<i>Marmosa paraguayana</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/160 <i>Leishmania</i> sp. 1/80	–
LBCE 17679	<i>Marmosa paraguayana</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/40	–
LBCE 17685	<i>Marmosa paraguayana</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1/160	–
LBCE 17737	<i>Didelphis aurita</i>	–	<i>Trypanosoma janseni</i> *

* Reação de PCR em sedimento de cultura não estabelecida

Os indivíduos de pequenos mamíferos voadores foram positivos em três diagnósticos (QUADRO 4) (RODRIGUES, 2016):

1. Hemocultivo positivo em um indivíduo e caracterizado como *T. dionisii*.
2. Exame a fresco positivo em um indivíduo, porém sem isolamento em cultura e, conseqüentemente, sem caracterização do tripanosomatídeo envolvido nesta infecção.
3. Diagnóstico molecular direcionado para a infecção por *Leishmania* sp., através do alvo molecular kDNA em tecidos de fígado (n=3) e de pele (n=1) pertencentes a quatro indivíduos.

O diagnóstico sorológico não foi realizado nestes indivíduos de pequenos mamíferos voadores, devido à ausência de anticorpos específicos para este grupo.

QUADRO 4: Informações dos pequenos mamíferos voadores positivos nos diagnósticos realizados anteriormente: hemocultivo, exame à fresco e PCR direcionada à infecção por *Leishmania sp* em tecidos de pele, baço e fígado, através do alvo molecular kDNA (RODRIGUES, 2016).

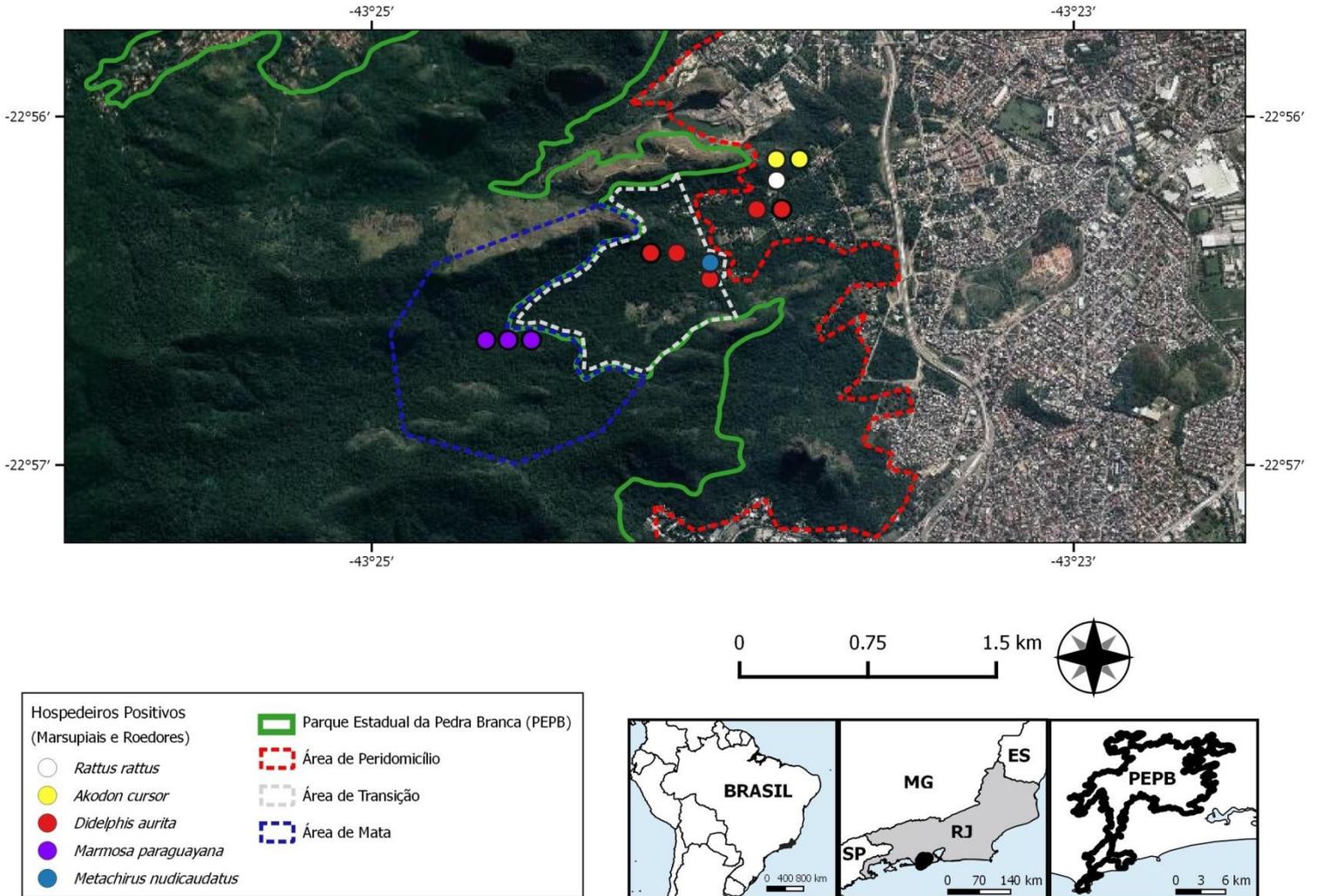
Nº de Registro	Espécie	Hemocultivo	Exame à Fresco	PCR <i>Leishmania sp.</i>
RM 436	<i>Carollia perspicillata</i>	–	Positivo (N.R.)	–
RM 438	<i>Carollia perspicillata</i>	–	–	Positivo (Fígado)
RM 452	<i>Myotis nigricans</i>	–	–	Positivo (Fígado)
RM 481	<i>Artibeus lituratus</i>	–	–	Positivo (Fígado)
RM 493	<i>Artibeus lituratus</i>	–	–	Positivo (Pele)
RM 541	<i>Micronycteris minuta</i>	<i>Trypanosoma dionisii</i>	–	–

5.4. Distribuição espacial dos tripanosomatídeos e seus hospedeiros

Os pequenos mamíferos capturados foram encontrados nas três áreas de coleta: peridomicílio (n=10), área de transição (n=10) e área de mata (n=6).

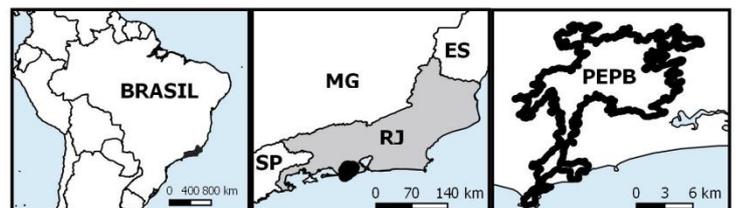
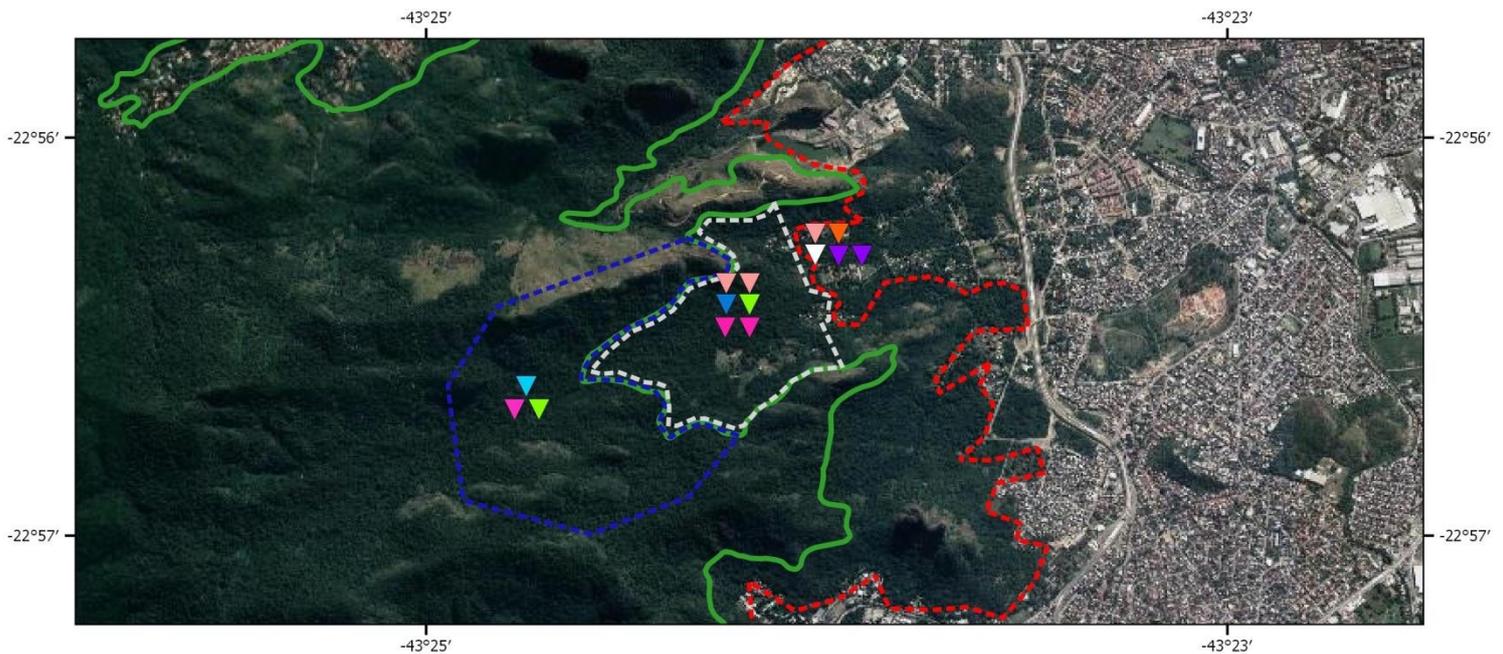
Os mamíferos não voadores também se distribuíram nas três áreas de coleta, sendo os roedores (n=3) encontrados apenas na área de peridomicílio e os marsupiais encontrados nas três áreas de coletas: área de peridomicílio (n=2), área de transição (n=4) e área de mata (n=3) (MAPA 3).

MAPA 3: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos não voadores positivos (Marsupiais: *Didelphis aurita*, *Marmosa paraguayana* e *Metachirus nudicaudatus*; Roedores: *Rattus rattus* e *Akodon cursor*) frente à infecção por tripanosomatídeos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circunscrita em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.



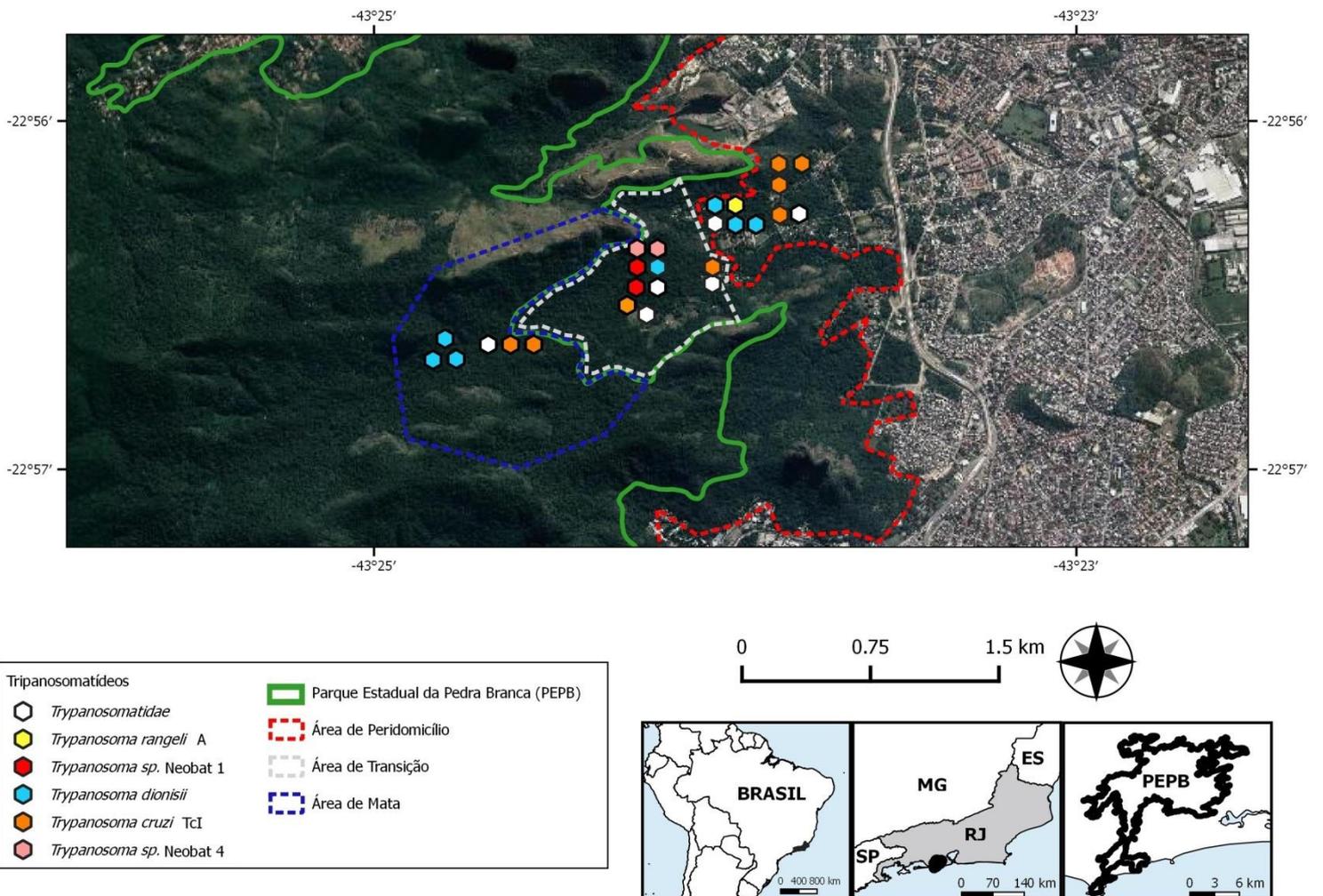
Os pequenos mamíferos voadores (morcegos) foram capturados nas três áreas: área de peridomicílio (n=5), área de transição (n=6) e área de mata (n=3) (MAPA 4).

MAPA 4: Distribuição das espécies de pequenos mamíferos voadores (*Artibeus lituratus*, *Mimon bennettii*, *Micronycteris minuta*, *Dermanura cinerea*, *Plathirrynus reciphinus*, *Myotis nigricans*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*) positivos frente à infecção por tripanosomatídeos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circunda em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.



Os tripanosomatídeos diagnosticados diretamente em tecidos desses pequenos mamíferos foram encontrados nas 3 áreas de coleta: *Trypanosoma cruzi* TcI foi encontrado na área de mata, transição e peridomicílio; *Trypanosoma dionisii* também foi encontrado em todas as áreas de coletas; *Trypanosoma* sp. Neobat 4 e *Trypanosoma* sp. Neobat 1 foram encontrados apenas na área de transição; e *Trypanosoma rangeli* A foi encontrado apenas na área de peridomicílio (MAPA 5).

MAPA 5: Distribuição espacial dos tripanosomatídeos detectados pelo diagnóstico molecular (*Trypanosomatidae*, *Trypanosoma rangeli* A, *Trypanosoma* sp. Neobat 1, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma cruzi* TcI e *Trypanosoma* sp. Neobat 4) diretamente em tecidos de pequenos mamíferos, pelas três áreas de coletas: área de peridomicílio circundada em vermelho, área de transição circundada em branco e a área de mata circunda em azul. A área circundada em verde representa o Parque Estadual da Pedra Branca.



6. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular diretamente em tecidos foi eficiente em detectar as infecções por tripanosomatídeos, principalmente quando se leva em consideração que este tipo de material pode revelar infecções de parasitas que não são detectáveis por meio de outros métodos de diagnósticos e/ou parasitas que não conseguem se estabelecer em meios de cultura. Ou ainda infecções efêmeras no organismo dos hospedeiros (parasitos não viáveis), restando apenas parte de seu DNA nos tecidos diagnosticados.

Além disso, devemos considerar o fato de que o diagnóstico molecular é um método altamente sensível e específico, principalmente quando se utiliza um alvo molecular universal como o utilizado neste estudo. A desvantagem em relação à utilização do diagnóstico molecular diretamente em tecidos está relacionada com a qualidade do DNA obtido, visto que muitas dessas amostras não foram capazes de gerar sequências gênicas de boa qualidade que possibilitassem a caracterização do parasita envolvido na infecção.

Dentre os tecidos utilizados, o baço foi o que obteve o maior número de reações positivas, e isto pode ser consequência de algumas funções atribuídas a este órgão, como filtração e armazenamento de células sanguíneas e imunológicas, hematopoiese, hemocaterese, entre outros. Estas funções acabam tornando o baço um alvo importante para o diagnóstico da infecção por tripanosomatídeos, pois alguns destes parasitos podem chegar a este órgão por meio destes processos e ali ficarem retidos, independente de conseguirem ou não estabelecer a infecção no hospedeiro (CESTA, 2006; FINOL & GONZÁLEZ, 2014).

O fígado também é um alvo importante para este tipo de diagnóstico, visto que este órgão é uma das maiores glândulas do organismo dos vertebrados e possui várias funções de armazenamento e filtração de células do sistema digestivo e sanguíneo, podendo auxiliar na retenção e estabelecimento de parasitas (FINOL & GONZÁLEZ, 2014). O fígado foi o segundo tecido com mais amostras positivas frente à infecção por tripanosomatídeos.

O menor número de amostras positivas foi observado em pele, tecido que apresentou o menor número de tripanosomatídeos caracterizados (N=2). Isto provavelmente se deve ao fato de que o DNA deste tecido é extraído em menor quantidade, e é mais suscetível à degradação em relação aos outros tecidos.

Por conta destas razões, a identificação em nível específico neste tecido é mais difícil, e, talvez por isso, as infecções por tripanosomatídeos também sejam mais raras de serem diagnosticadas na pele (PIRES *et al.*, 2017).

6.1. Diversidade de tripanosomatídeos

Com relação à diversidade de tripanosomatídeos caracterizados molecularmente, obteve-se uma diversidade de três espécies diferentes (*T. cruzi* TcI, *T. rangeli* A e *T. dionisii*), além de outras duas unidades taxonômicas distintas (*Trypanosoma* sp. Neobat 1 e *Trypanosoma* sp. Neobat 4).

Dos mamíferos infectados (n=26), 11 (42%) foram positivos somente no diagnóstico molecular (18S) diretamente em tecidos, mostrando a importância deste diagnóstico para detectar a infecção por esses parasitas, principalmente para tripanosomatídeos que até o momento não foram possíveis de serem cultivados em meio de cultura, como as unidades taxonômicas *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e 4 (BARROS *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Além disso, a caracterização em nível de genótipo intraespecífico só foi obtida por conta do diagnóstico molecular diretamente em tecido como no caso da DTU TcI do parasita *T. cruzi* em animais sorologicamente positivos.

Com relação à análise filogenética destes tripanosomatídeos caracterizados, foi observado que todas essas espécies e unidades taxonômicas são pertencentes ao clado *Trypanosoma cruzi*, por conta da posição filogenética dessas sequências gênicas nas árvores filogenéticas.

6.1.1. *Trypanosoma cruzi*

O parasita *T. cruzi* foi o mais detectado nos tecidos dos pequenos mamíferos (n=9), sendo encontrado em tecidos de marsupiais (*D. aurita* (n=4) e *M. paraguayana* (n=2)) e em tecidos de roedores (*A. cursor* (n=2) e *R. rattus* (n=1)). Todas essas infecções foram caracterizadas como pertencentes à DTU TcI.

Apesar de a DTU TcI ser a mais comum de ser encontrada em ciclos de transmissão silvestre (ROMAN *et al.*, 2018), existe um histórico de registros de marsupiais e roedores infectados não só por *T. cruzi* TcI, mas também por outras DTU's (TcII, TcIII e TcIV) não só nesta região da EFMA, mas também por todo o território brasileiro (PONTES, 2015; BARROS *et al.*, 2017; RANGEL *et al.*, 2019) Na maioria dessas áreas, as DTU's TcI e TcII são as mais prevalentes, e as mais detectadas em hospedeiros distintos e em ambientes ecológicos e geográficos diferentes (BARROS *et al.*, 2017).

A DTU TcI aparenta ter uma sobreposição em relação as outras DTU's, e é frequente a detecção de infecções mistas entre as diferentes DTU's, principalmente em hospedeiros tido como generalistas, como no caso de espécies de marsupiais e roedores, como *D. aurita* e *R. rattus*, respectivamente (JANSEN *et al.*, 2017; JANSEN *et al.*, 2018; ROMAN *et al.*, 2018).

Neste estudo a DTU TcI foi encontrada em maior número em tecidos de indivíduos da espécie *D. aurita*, sendo encontrado até mesmo em dois tecidos diferentes de um mesmo indivíduo, e isto pode ser justificado pelo fato de que *D. aurita* pode apresentar um grande potencial de infectividade e altos níveis de parasitemia, principalmente quando infectados por parasitos pertencentes a esta DTU, e por estas razões este hospedeiro pode ser considerado um bioacumulador de *T. cruzi* TcI (JANSEN *et al.*, 2018; ROMAN *et al.*, 2018).

Ambos os indivíduos de *M. paraguayana* positivos no diagnóstico molecular (18S) em tecido de baço, estavam também positivos no diagnóstico sorológico (RIFI) frente à infecção por *T. cruzi*. Contudo, apenas no diagnóstico molecular foi possível verificar qual a DTU envolvida nesta infecção, mostrando que o alvo 18S, não só confirmou a infecção por *T. cruzi*, como também complementou o resultado sorológico identificando a DTU envolvida na infecção.

Outro indivíduo de *D. aurita* foi positivo no diagnóstico sorológico (RIFI) para *Leishmania* sp., mas no diagnóstico molecular (18S) em tecidos foi detectado a infecção por *T. cruzi* TcI. Este indivíduo poderia estar com uma infecção mista pelos dois parasitas, ou poderia se tratar de uma reação cruzada, visto que o ponto de corte utilizado no diagnóstico sorológico para marsupiais é 1/40, a mesma titulação detectada na RIFI para *Leishmania* sp.

Reações cruzadas entre *Leishmania* sp. e *T. cruzi* são comuns de acontecerem, pois são parasitas da mesma família que possuem características antigênicas em comum podendo influenciar nos resultados de um diagnóstico sorológico como a RIFI (MATOS *et al.*, 2015; TAHIR *et al.*, 2018).

Um indivíduo *D. aurita* foi positivo para *T. cruzi* no diagnóstico sorológico, e também no hemocultivo, onde foi caracterizado com uma infecção mista pelas DTUs TcI e TcII, através do alvo molecular mini-exon. No diagnóstico molecular (18S) foi detectado apenas a infecção por *T. cruzi* TcI nos tecidos de baço e pele, e três hipóteses poderiam explicar essas distintas caracterizações:

- (i) A população parasitária de *T. cruzi* TcII poderia estar presente em outro fragmento de tecido do hospedeiro que não foi o utilizado para o diagnóstico molecular;
- (ii) A infecção por *T. cruzi* TcI estava bem estabelecida no hospedeiro, pois foi encontrada também em seu tecido e a infecção por *T. cruzi* TcII poderia ser recente já que foi detectada apenas no sangue deste indivíduo.
- (iii) A infecção por *T. cruzi* TcII também poderia estar estabelecida, só que em outros tecidos do hospedeiro (ex. coração), e não em fígado, baço e pele que foram utilizados para o diagnóstico molecular.

6.1.2. *Trypanosoma dionisii*

Trypanosoma dionisii foi a segunda espécie de tripanosomatídeo mais encontrada nos tecidos analisados (n=7), sendo as infecções observadas em diferentes espécies de morcegos, mostrando mais uma vez a capacidade que este parasita possui em conseguir infectar e se estabelecer em diferentes tecidos e espécies dentro dessa ordem de mamíferos.

Mesmo que este parasita tenha sido pontualmente (e apenas recentemente) encontrado em outras ordens de mamíferos, os morcegos ainda são seu principal grupo de hospedeiros, o que justifica seu encontro em espécies de morcegos nesta região da EFMA. Além disso, vale ressaltar que a

interação entre morcegos e *T. dionisii* está bem estabelecida nesta região, visto que a mesma foi já reportada anteriormente por RODRIGUES, 2016; RANGEL *et al.*, 2019.

Dentre os 7 indivíduos encontrados infectados por *T. dionisii*, apenas um indivíduo de *Micronycteris minuta* foi também positivo em hemocultivo. Neste caso, podemos afirmar que este animal apresentava alta parasitemia e uma infecção bem estabelecida, pois foi possível detectar este parasita em diferentes tecidos deste hospedeiro.

Outro indivíduo de *M. nigricans* mostrou-se com infecção mista em seu fígado: *T. dionisii* através do diagnóstico molecular (18S) e *Leishmania* sp. através do diagnóstico molecular com a utilização do alvo kDNA.

Contudo, a infecção por *Leishmania* sp. deve ser confirmada, visto que o alvo utilizado neste diagnóstico molecular foi o kDNA, que não é um alvo comumente sequenciável. A confirmação deste resultado será realizada posteriormente através da utilização de outros alvos moleculares como, por exemplo, o HSP70 e o ITS1, seguido da análise das sequências gênicas obtidas.

Com relação à análise filogenética destes parasitas, foi observado que dois indivíduos provenientes das amostras RM 463B e RM 541F, apresentaram ramificações na árvore filogenética. A ramificação de *T. dionisii* pertencente à amostra RM 463B, pode estar relacionada com as diferenças nucleotídicas entre esta sequência com as sequências de referências utilizadas. Além disso, vale considerar que o percentual de identidade (98,72%) desta amostra foi o mais baixo em relação às outras sequências caracterizadas como *T. dionisii*, sugerindo que esta diferença pode ter gerado esta ramificação na árvore filogenética.

Já a sequência proveniente da amostra RM 541F não apresentou um percentual de identidade muito diferente das outras sequências caracterizadas como *T. dionisii* (99,58%), contudo, a mesma apresentou uma ramificação na árvore filogenética, mostrando que a diferença nucleotídica desta sequência pode não ter gerado um percentual de identidade muito distinto das outras sequências, porém foi o suficiente para gerar uma ramificação na árvore.

6.1.3. *Trypanosoma rangeli*

O parasita *T. rangeli* possui uma distribuição geográfica sobreposta ao *T. cruzi*, podendo ocorrer nas Américas Central e do Sul (ESPINOSA, 2014). Este parasita é capaz de infectar inúmeras espécies de hospedeiros vertebrados, sempre mamíferos, como animais domésticos e humanos. No entanto, há ainda vários aspectos desconhecidos no ciclo de vida no que se refere à infecção no hospedeiro vertebrado, mas sabe-se que a sua infecção em humanos, aparentemente não causa nenhuma sintomatologia (ÁLVAREZ *et al.*, 2018).

Esse perfil é distinto do observado em hospedeiros invertebrados (triatomíneos) que podem ter algumas funções do seu sistema digestório comprometido por conta desta infecção, como dificuldades no repasto sanguíneo do triatomíneo, assim como no processo de ecdise deste inseto, entre outros (GUHL & VALLEJO, 2003; ESPINOSA, 2014).

Os principais vetores deste parasita são os triatomíneos pertencentes ao gênero *Rhodinus* sp., cuja transmissão ocorre através da inoculação de parasitas através da saliva destes triatomíneos (DARIO *et al.*, 2017b). Apesar de existir alguns relatos da presença de *T. rangeli* em triatomíneos pertencentes a outros gêneros como: *Panstrongylus megistus* (LUCENA & VERGETTI, 1973; STEINDEL *et al.*, 1994) e *Triatoma dimidiata* (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992), não existe a certeza de que estes triatomíneos possam atuar como possíveis vetores deste parasita.

Este parasita possui heterogeneidade genética que pode ser agrupada em cinco genótipos (A, B, C, D e E), sem ter aparentemente relação com os seus hospedeiros e distribuição geográfica, tanto que a maioria destes genótipos já foram encontrados em diversas localidades, como: Genótipo A - Colômbia, Honduras, Guatemala, Venezuela e em vários estados do Brasil (Pará, Acre, Goiás, Rondônia e Minas Gerais); Genótipo B - Brasil (Amazonas, Acre, Pará e Espírito santo); Genótipo C - Panamá, El salvador, Colômbia e Costa Rica; Genótipo D - Brasil (Santa Catarina e Espírito Santo); Genótipo E - Brasil (Mato Grosso do Sul) (MAIA DA SILVA *et al.*, 2007; MAIA DA SILVA *et al.*, 2009; DARIO *et al.*, 2017a; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Na região da EFMA este parasita já havia sido reportado anteriormente em sedimento de tecido sanguíneo de um indivíduo de *D. aurita* e

caracterizado como *T. rangeli* pertencente à subpopulação A. No presente estudo, *T. rangeli* foi detectado em um tecido de fígado pertencente a um indivíduo de morcego *Plathirrynus reciphinus*, e caracterizado também como *T. rangeli* A.

Este indivíduo de morcego foi considerado negativo no diagnóstico de exame à fresco e hemocultivo realizados anteriormente. Sugere-se que estes outros resultados negativos tenham a ver com uma provável baixa parasitemia, comum em mamíferos (RAMIREZ *et al.*, 1998; MAIA DA SILVA *et al.*, 2009; JÚNIOR *et al.*, 2018), e por esta razão este parasita não foi detectado nestes exames anteriormente realizados.

A identificação da população A deste parasita em uma espécie de morcego é mais uma informação com relação à presença desta população nesses hospedeiros, visto que este genótipo A já foi relatado anteriormente, não só em espécies de morcegos, mas também em outros grupos distintos de hospedeiros, como em humanos, macacos, cachorros, entre outros. Assim como a sua distribuição geográfica, onde esta população já foi detectada em diversos países e localidades do Brasil. (MAIA DA SILVA *et al.*, 2007; MAIA DA SILVA *et al.*, 2009; DARIO *et al.*, 2017a).

Com relação à análise filogenética deste parasita, foi observada a presença de uma ramificação na sequência desta amostra, em comparação com as sequências de referências utilizadas. Sugere-se que isto pode ter ocorrido por conta de diferenças nucleotídicas presentes entre estas sequências, visto que a porcentagem de identidade desta amostra foi de 96,39%, em relação às sequências de referência, mostrando que este percentual pode ter influenciado na origem desta ramificação presente na árvore filogenética.

6.1.4. *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e 4

Os tripanosomatídeos pertencentes ao clado *Trypanosoma*. spp. Neobats consistem em genótipos de tripanosomatídeos que não foram devidamente caracterizados morfológicamente por não conterem isolados, sendo detectados somente por meio de diagnósticos moleculares. Atualmente são reconhecidos quatro destes genótipos, denominados de 1 a 4 (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Até o momento estes genótipos só foram detectados em espécies de morcegos, mas não se pode afirmar que os mesmos sejam restritos a este grupo de hospedeiros, visto que estes genótipos foram descritos recentemente e são ainda pouco conhecidos.

A descrição de *Typanosoma* sp. Neobat 1, 2 e 3 ocorreu originalmente em amostras de tecidos sanguíneos de uma espécie de morcego chamada *Artibeus jamaicensis* proveniente do Panamá (COTTONTAIL *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019). Já o parasita *Typanosoma* sp. Neobat 4 foi descrito recentemente por RODRIGUES *et al.*, 2019, em amostras de coágulos sanguíneos de morcegos pertencentes a espécie *Carollia perspicillata*.

Os parasitas *Typanosoma* sp. Neobat 1, 2 e 3 possuem uma ampla distribuição geográfica, que pode estar atrelada a capacidade de voo e longevidade dos morcegos, onde esta infecção já foi reportada em países como Panamá, Colômbia e Brasil, mais especificamente nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Rio de Janeiro (LIMA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019). O ciclo de vida destes parasitas e tudo o que o envolve, como vetores e formas de transmissão, ainda permanece desconhecido. (RODRIGUES *et al.*, 2019).

O parasita *Typanosoma* sp. Neobat 1 foi detectado neste estudo em amostras de baço (n=2) de um espécime de *Artibeus lituratus* e um espécime de *Mimon bennettii*, e em tecido de fígado (n=1) de um espécime de *Carollia perspicillata*, demonstrando pela primeira vez a circulação deste genótipo na região da EFMA. Além deste, também foi detectado neste estudo a infecção por *Typanosoma* sp. Neobat 4 em dois indivíduos de morcegos pertencentes a espécie *Carollia perspicillata* em seus tecidos de baço (n=1) e fígado (n=1).

Em um primeiro momento, esses dados poderiam sugerir que o genótipo *Typanosoma* sp. Neobat 4 estaria relacionado à espécie *C. perspicillata*, mas não pode se afirmar que o mesmo seja restrito a esta espécie de morcego, visto que este parasita é pouco conhecido, tendo apenas a descrição recente de seu genótipo, não se sabendo seus vetores, modo de transmissão e o ciclo de vida deste parasita, o que torna frágil qualquer tipo de associação deste parasita a uma dada espécie de hospedeiro.

A detecção destas infecções diretamente em tecidos, por meio do diagnóstico molecular, mostra mais uma vez como o advento ao acesso as sequencias gênicas, vem auxiliando cada vez mais em ampliar o conhecimento relacionado a estes tripanosomatídeos.

Um destes indivíduos infectados por *Trypanosoma* sp. Neobat 4 em fígado também estava positivo neste mesmo tecido para a infecção por *Leishmania* sp., detectada através do diagnóstico molecular com a utilização do alvo kDNA. Já o indivíduo de *A. lituratus* positivo em baço para a infecção por *Trypanosoma* sp. Neobat 1, também estava positivo em pele para a infecção por *Leishmania* sp., demonstrando também uma infecção mista, porém detectada em tecidos distintos do mesmo hospedeiro.

Esses dois casos de infecções por *Leishmania* sp também carecem de confirmação destes diagnósticos, através de alvos moleculares sequenciáveis, visto que somente a utilização de um alvo molecular não sequenciável como o kDNA, pode não ser suficiente para confirmar esta infecção, principalmente quando se leva em consideração que os hospedeiros em questão, são animais silvestres, pouco estudados e que albergam uma grande diversidade de espécies de tripanosomatídeos, provavelmente muitos dos quais ainda desconhecidos.

Um dos indivíduos de *Carollia perspicillata* também foi positivo no exame a fresco, no entanto não foi possível o isolamento desses parasitos em seu sangue. O diagnóstico molecular diretamente em seu tecido de fígado demonstrou a infecção por *Trypanosoma* sp. Neobat 1. Uma hipótese que pode ser levantada é que esses parasitos eram os mesmos observados no exame a fresco e que não resultaram em hemoculturas positivas por se tratar de parasitos não cultiváveis nos meios axênicos usualmente utilizados.

6.2. Tripanosomatídeos não caracterizados

Com relação as 11 amostras de tecidos em que não foram possíveis a caracterização de seus tripanosomatídeos, 4 foram positivas apenas no diagnóstico molecular (18S) e 7 amostras (proveniente de 5 indivíduos) foram positivas também em outros diagnósticos realizados anteriormente.

A possível razão do insucesso da caracterização destas amostras está atrelada a qualidade do DNA amplificado, visto que as mesmas apresentaram bandas fracas e/ou bandas inespecíficas associadas à banda na altura esperada, dificultando os processos de purificação e sequenciamento das amostras.

Essas amostras apresentavam eletroferogramas com picos muitos altos e/o muito baixos em seu sequenciamento, indicando que o DNA utilizado nessas reações não era o ideal para gerar sequências boas, e consequentemente caracterizar os parasitas presentes nesses tecidos.

Mesmo que a caracterização destes tripanosomatídeos não tenha sido realizada, há um ganho importante de informação com esses resultados, visto que 4 destes indivíduos foram positivos apenas neste diagnóstico molecular (18S), mostrando a eficiência deste diagnóstico em detectar a infecção por tripanosomatídeos.

6.3. Distribuição espacial dos tripanosomatídeos a partir da localização dos pequenos mamíferos

Os 26 hospedeiros infectados foram encontrados nas 3 áreas de coleta: área de peridomicílio (n=10), área de transição (n=10) e área de mata (n=6), entretanto, as áreas de peridomicílio e transição foram as áreas onde tiveram um maior número de hospedeiros positivos, e isto está relacionado com o sucesso de captura nestas áreas, onde foram maiores nas áreas de peridomicílio (n=92) e transição (n=72), com relação a área de mata (n=26).

A razão pela qual as áreas de peridomicílio e transição, são as áreas com o maior sucesso de captura, provavelmente estão relacionadas com a proximidade às habitações humanas, e o fato de que os pequenos mamíferos capturados buscam estas regiões pela oferta de alimentos.

Outro aspecto a ser considerado é que a taxa de infecção entre as áreas de coleta (peridomicílio (10%), transição (13%) e mata (23%)), não foram estatisticamente significantes ($p= 0,27$), sugerindo que essas infecções tenham relação com a distribuição dos hospedeiros e não necessariamente com as áreas de coletas.

A infecção dos pequenos mamíferos terrestres por *T. cruzi* pode ter ocorrido pela ingestão de insetos vetores infectados, como espécies de triatomíneos, ou por via vetorial clássica, através das fezes destes insetos, visto que esses vetores, geralmente vivem juntos de sua fonte alimentar como em ninhos e em tocas, onde alguns desses pequenos mamíferos, como espécies de roedores vivem.

Em relação à infecção por *T. dionisii* em pequenos mamíferos voadores permanece sem muitas respostas, visto que pouco se conhece sobre as formas de transmissão deste parasita a este hospedeiro. Existe uma hipótese que sugere que estes hospedeiros podem ser infectados por meio de ectoparasitas da família Cimicidae, contudo não há relatos desses insetos no novo mundo, além destas infecções terem sido realizadas por meio de infecções experimentais, não havendo relatos até o momento dessa infecção na natureza (DARIO et al., 2017a; WANG et al., 2019).

Por outro lado, já foi relatado por DARIO et al., 2017a a infecção por *T. dionisii* em triatomíneos da espécie *Triatoma vitticeps*, mostrando que este inseto pode ser o possível vetor destes parasitas em espécies de morcegos, contudo, esta infecção foi encontrada no trato digestivo deste triatomíneo (e não em sua glândula salivar), deixando em dúvida se realmente este inseto pode agir como vetor deste parasita.

Com relação à forma de transmissão de *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e 4 também permanece desconhecida, visto que existem poucas informações não só sobre os vetores destes parasitas, mas também com relação ao ciclo de vida destes (BARROS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019).

A infecção por *T. rangeli* A em um indivíduo de morcego pode ter ocorrido por via oral, através da ingestão do inseto vetor deste parasita, ou via transmissão vetorial clássica, através da saliva do vetor.

Além disso, devemos levar em consideração que a maioria destas espécies de morcegos infectadas por tripanosomatídeos são insetívoras, havendo a possibilidade de os mesmos terem sido infectados pela via oral, além de viverem em ambientes escuros e fechados, propiciando um ambiente ideal para o estabelecimento de colônias destes insetos.

As infecções por *T. cruzi* TcI (n=9) foram encontradas nas três áreas de coleta, mostrando que este parasita está amplamente disperso nestas regiões

da EFMA. Além disso, é possível observar que a predominância deste parasita é maior nas áreas de peridomicílio e transição em comparação com a área de mata, e isto se deve ao fato de que os hospedeiros (*D. aurita* e *R. rattus*) presentes nestas duas áreas possuem hábitos considerados sinantrópicos, com exceção do roedor *Akodon cursor* que não é considerado sinantrópico, mas também é comumente encontrado em ambientes antropizados. A presença de *A. cursor* em área antrópica como a área de peridomicílio sugere que o mesmo poderia estar próximo das habitações humanas em busca de alimentos, pois este roedor é onívoro.

Já as três infecções por *T. cruzi* TcI encontradas na área de mata são provenientes de três espécies de *Marmosa paraguayana* que é um marsupial que ocorre em fragmentos florestais com graus moderados de perturbação como as encontradas nas áreas de mata do EFMA (GENTILE *et al.*, 2018).

Esses dados reforçam que a presença deste parasita na EFMA está bem estabelecida, pois a maioria desses hospedeiros é facilmente encontrada em ambientes urbanizados e próximos de habitações humanas, que são em sua maior parte locais carentes com pouco acesso à educação ambiental e saúde de qualidade, podendo manter o parasito muito próximo das habitações humanas (HERRERA & URDANETA-MORALES, 2017).

Os morcegos infectados por *T. dionisii* estão distribuídos ao longo das três áreas de coletas, dado este que está diretamente ligado ao fato de que os seus hospedeiros são espécies de morcegos sinantrópicos, que se deslocam com facilidade entre essas áreas através do voo. Além disso, vale ressaltar que os locais de captura não são necessariamente os locais de infecção destes morcegos, principalmente quando se leva em consideração a longevidade, dispersão e ampla locomoção destes indivíduos.

Além disso, pode se observar que indivíduos da mesma espécie, como *A. lituratus*, *C. perspecillata* e *M. bennettii* foram capturados em mais de uma área de coleta, mostrando a ampla capacidade de locomoção dos morcegos, e consequentemente de dispersão de parasitas, quando infectados.

O espécime de *T. rangeli* A foi encontrado na área de peridomicílio, sendo proveniente da espécie de morcego *P. reciphinus*, e a sua presença em uma área amplamente antrópica como a de peridomicílio é um dado em que deve

ser levado em consideração, pois assim como o *T. dionisii*, este tripanosomatídeo pode ocasionalmente infectar humanos.

Os espécimes de *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (N=2) e os espécimes de *Trypanosoma* sp. Neobat 1 (N=2) foram em sua maioria encontrados na área de transição, indicando que estes genótipos ainda pouco conhecidos, também estão circulando próximo das habitações humanas, além da área de mata onde foi capturado um espécime infectado por *Trypanosoma* sp. Neobat 1.

Além destes, os 11 indivíduos infectados por espécimes classificadas como Trypanosomatidae, foram encontrados nas três áreas de coletas, no qual um desses hospedeiros (*M. nudicaudatus* (N=1)) foi coletado na área de transição, contudo esta espécie de marsupial não é considerada uma espécie sinantrópica, mas pode ocorrer em áreas com graus moderados de perturbação (GENTILE *et al.*, 2018).

A presença destes parasitas em todas as áreas de coleta mostra a importância deste tipo de estudo, visto que os seus ciclos de transmissão estão sendo mantidos por diferentes espécies de hospedeiros, e a expansão urbana que acontece nestas áreas da EFMA interfere nestes ciclos, afetando diretamente na transmissão desses parasitas, e em um possível estabelecimento de zoonoses causadas por alguns destes tripanosomatídeos (TRÜEB *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÕES

- Áreas altamente antropizadas e com baixa riqueza de fauna, como a EFMA, também podem manter uma importante diversidade de espécies de tripanosomatídeos;
- O diagnóstico molecular diretamente em tecidos se mostrou eficiente em detectar a infecção por tripanosomatídeos, principalmente parasitos que até o momento não são cultiváveis em meios axênicos, como *Trypanosoma* sp. Neobat 1 e *Trypanosoma* sp. Neobat 4;
- O diagnóstico molecular complementou e confirmou os diagnósticos realizados anteriormente, além de detectar infecções por tripanosomatídeos em hospedeiros considerados previamente negativos;
- A construção das relações filogenéticas entre as espécies de tripanosomatídeos identificadas mostrou que todas estão posicionadas filogeneticamente no clado *Trypanosoma cruzi*;
- A distribuição das espécies de tripanosomatídeos a partir da localização dos pequenos mamíferos infectados não mostrou relação com os diferentes níveis de degradação encontrados na área da EFMA;

8. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **Fiocruz inaugura primeira estação biológica do município do Rio.** 11/10/2016. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-inaugura-primeira-estacao-biologica-do-municipio-do-rio>> Acessado em: 17/01/2020.
- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **Fundação promove seminários sobre biodiversidade e saúde.** 11/07/2017. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/fundacao-promove-seminarios-sobre-biodiversidade-e-saude>> Acessado em: 17/01/2020.
- ÁLVAREZ OE. **spliced leader (SL) RNA: Análises de genes e regiões intergênicas com aportes na filogenia, taxonomia e genotipagem de *Trypanosoma* spp. de todas as classes de vertebrados.** Programa de Pós-Graduação em biologia da relação patógeno-hospedeiro. São Paulo 2017. tese de doutorado. Instituto de ciências biomédicas da universidade de são Paulo.
- ÁLVAREZ OE, ORTIZ PA, LIMA L, COSTA-MARTINS AG, SERRANO MG, HERDER S, BUCK GA, CAMARGO EP, HAMILTON PB, STEVENS JR, TEIXEIRA MMG. ***Trypanosoma rangeli* is phylogenetically closer to Old World trypanosomes than to *Trypanosoma cruzi*.** International Journal for Parasitology 48 (2018) 569–584.
- ARRUDA MV, REINACH FC, COLLI W, ZINGALES B. **Sequence of the 24S ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*.** Molecular and Biochemical Parasitology, 40 (1990) 35–42 Elsevier.
- BARBOSA AD, MACKIE JT, STENNERD R, GILLET A, IRWINA P, RYANA U. ***Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*).** Veterinary Parasitology 223 (2016) 214–221.
- BARROS JHS, XAVIER SCC, BILAC D, LIMA VS, DARIO MA, JANSEN AM. **Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV.** Acta Tropica 172 (2017) 173–179.
- BARROS JHS, LIMA L, SCHUBACH AO, TEIXEIRA MMG. ***Trypanosoma madeirae* sp. n.: A species of the clade *T. cruzi* associated with the neotropical common vampire bat *Desmodus rotundus*.** Parasites and Wildlife 8 (2019) 71–81.
- BORGHEAN TC, FERREIRA RC, TAKATA CSA, CAMPANER M, BORDA CC, PAIVA F, MILDERA RV, TEIXEIRA MMG, CAMARGO EP. **Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies.** Protist, Vol. 164, 129–152, January 2013.
- BOTERO A, COOPER C, THOMPSON CK, CLODE PL, ROSE K, THOMPSON RCA. **Morphological and Phylogenetic Description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: An Australian Wildlife Trypanosome within the *T. cruzi* Clade.** Protist, Vol. 167, 425–439, November 2016.
- CÁCERES NC. **Os Marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação.** 2nd edn. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

- CALDART ET, FREIRE RL, FERREIRA FP, RUFFOLO BB, SBEGHEN MR, MAREZE M, JOÃO LUIS GARCIA JL, MITSUKA-BREGANÓ R, NAVARRO IT. **Leishmania in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-27, jan.-mar. 2017.
- CAMACHO E, RASTROJO A, SANCHIZ A, GONZÁLEZ-DE LA FUENTE S, AGUADO B, REQUENA JM. **Leishmania Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles**. Genes 2019, 10, 758.
- CAVALIER-SMITH T. **Higher classification and phylogeny of Euglenozoa**. European Journal of Protistology. 56 (2016) 250–276.
- CESTA MF. **Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen**. Toxicologic Pathology, 34:455–465, 2006 Copyright C by the Society of Toxicologic Pathology ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601 online DOI: 10.1080/01926230600867743.
- COSTA WA. **AÇÕES INTEGRADAS DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES DE AGENTES ETIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES: EXPERIÊNCIA COM COMUNIDADES DE ÁREA ENDÊMICA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, CAMPUS FIOCRUZ MATA ATLÂNTICA, JACAREPAGUÁ, RIO DE JANEIRO, RJ, BRASIL**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e saúde, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2016.
- COTTONTAIL VM, KALKO EKV, COTTONTAIL I, WELLINGHAUSEN N, TSCHAPKA M, PERKINS SL, PINTO CM. **High Local Diversity of Trypanosoma in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* Clade**. PLOS ONE | www.plosone.org 2 September 2014 | Volume 9 | Issue 9 | e108603.
- D'ALESSANDRO A & SARAIVA NG. ***Trypanosoma rangeli***. In Parasitic Protozoa (1992), 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego, p. 1-54.
- DA COSTA AP, FERREIRA JIGDS, DA SILVA RE, TONHOSOLO R, ARAÚJO ADC, GUIMARÃES MF, HORTA MC, LABRUNA MB, MARCILI A. ***Trypanosoma cruzi* in Triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil**. Rev Soc Bras Med Trop 51(4):445-451, July-August, 2018 doi: 10.1590/0037-8682-0098-2018.
- DARIO MA, RODRIGUES MS, BARROS JH, XAVIER SC, D'ANDREA PS, ROQUE AL, JANSEN AM. **Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil)**. Parasit Vectors. 2016 Aug 31;9:477.
- DARIO MA, LISBOA CV, COSTA LM, MORATELLI R, NASCIMENTO MP, COSTA LP, LEITE YLR, LLEWELLYN MS, XAVIER SCC, ROQUE ALR, JANSEN AM. **High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil**. PLOS ONE | Trypanosoma spp. diversity in Atlantic forest, Brazil. November 27, 2017a.
- DARIO MA, MORATELLI R, SCHWABL P, JANSEN AM, LLEWELLYN MS (2017) **Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats**. PLoS Negl Trop Dis (2017b) 11(7): e0005790 .
- DE SOUZA NA, DA SILVA JB, GODOY RE, DE SOUZA FJM, DE ANDRADE-COELHO CA, DA SILVA VC, DE AZEVEDO ACR, RANGEL EF. **Studies on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in the Campus FIOCRUZ Mata**

Atlântica, Jacarepaguá, in the City of Rio de Janeiro, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(1):26-32, Jan-Feb, 2015.

DOS SANTOS FCB, LISBOA CV, XAVIER SCC, DARIO MA, VERDE R DE S, CALOURO AM, ROQUE ALR, JANSEN AM. ***Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil.** © Cambridge University Press 2017. Parasitology <https://doi.org/10.1017/S0031182017001834>.

ESPINOSA ZDCC, **origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma*.** Programa de Pós-Graduação em biologia da relação patógeno-hospedeiro São Paulo 2014 tese de doutorado. Instituto de ciências biomédicas da universidade de são Paulo.

FERREIRA JIGS, DA COSTA AP, NUNES PH, RAMIREZ D, FOURNIER GFR, SARAIVA D, TONHOSOLO R, MARCILI A. **New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado.** Acta Tropica 176 (2017) 249–255.

FINOL HJ & GONZÁLEZ AR. **Ultrastructural study on tissue alterations caused by trypanosomatids in experimental murine infections.** published: 08 July 2014 doi: 10.3389/fpubh.2014.00075.

GENTILE R, CARDOSO TS, COSTA-NETO SF, TEIXEIRA BR, D'ANDREA PS. **Community structure and population dynamics of small mammals in an urban-sylvatic interface area in Rio de Janeiro, Brazil.** Zoologia 35: e13465. 2018.

GUHL F, AUDEHEIDE A, RAMÍREZ JD. **From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas.** Int J Parasitol. 2014; 44:605–12.

GUHL F & VALLEJO GA. ***Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – Na Updated Review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2003. 98(4): 435-442.

HAMILTON PB, ADAMS ER, NJIOKOU F, GIBSON WC, CUNY G, HERDE S. **Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals.** Infection, Genetics and Evolution 9 (2009) 81–86.

HERNÁNDEZ R, RIOS P, VALDÉS AM, PIÑERO D. **Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids.** Molecular and biochemical parasitology, v. 41, n. 2, p. 207–12, jun. 1990.

HERRERA L & URDANETA-MORALES S. ***Trypanosoma cruzi*: patologia em reservatórios silvestres.** PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS. 02/07/2017. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/reservatorios-de-vida/#patologia>> Acessado em: 18/01/2020.

HOARE AC. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph.** 1972. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE (INEA). **BIODIVERSIDADE E ÁREAS PROTEGIDAS/Unidades de Conservação. Parque Estadual da Pedra Branca (2019).** Disponível em: <<http://www.inea.rj.gov.br/biodiversidade-territorio/conheca-as-unidades-de-conservacao/parque-estadual-da-pedra-branca/>> Acessado em: 17/01/2020.

- JANSEN AM, LISBOA CV, DARIO MA, XAVIER SCDC. **Distribuição das DTUs de *Trypanosoma cruzi* na natureza.** PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS. 02/07/2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/biogeografia/>> Acessado em: 17/01/2020.
- JANSEN AM, XAVIER SCDC, ROQUE ALR. ***Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil.** Parasites & Vectors (2018) 11:502.
- JÚNIOR RDS, VIEIRA FDAC, BARBOSA JDC, GOMES SAO, FEDER MD. ***Blastocrithidia triatoma*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*: tripanosomatídeos de triatomíneos.** ReonFacema. 2018 4(Esp):963-967.
- KAUFER A, ELLIS J, STARK D, BARRATT J. **The evolution of trypanosomatid taxonomy.** Parasites & Vectors (2017) 10:287 DOI 10.1186/s13071-017-2204-7.
- KOSTYGOV AY & YURCHENKO V. **Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae).** Institute of Parasitology, Biology Centre CAS Folia Parasitologica 2017, 64: 020 doi: 10.14411/fp.2017.020.
- KRAEVA N, BUTENKO A, HLAVÁČOVÁ J, KOSTYGOV A, MYŠKOVA J, GRYBCHUK D, ET AL. ***Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*.** (2015) PLoS Pathog 11(8): e1005127. doi:10.1371/journal.ppat.1005127.
- LASERGENE. **User's guide: A manual for the Lasergene System.** [s.l.] Biocomputing Software for Windows, 1994.
- LIMA L, ESPINOSA-ÁLVAREZ O, PINTO CM, CAVAZZANA MJR, PAVAN AC, CARRANZA JC, LIM BK, CAMPANER M, TAKATA CSA, CAMARGO EP, HAMILTON PB, TEIXEIRA MMG. **New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes.** Parasites & Vectors (2015) 8:657 DOI 10.1186/s13071-015-1255-x.
- LOPES CMT, BARRETO RFSM, PAVAN MG, PEREIRA CS, ROQUE ALR. ***Trypanosoma janseni* n. sp. (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae) in the Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro, Brazil: integrative taxonomy and phylogeography within the *Trypanosoma cruzi* clade.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2018.
- LUCENA DT & VERGETTI JG. **INFECÇÃO NATURAL DE *PANSTRONGYLUS MEGISTUS* (BURMEISTER, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do Estado de Alagoas.** REV. INST. MED. TROP. SÃO PAULO 15(4):171-178, JULHO-AGOSTO, 1973.
- MADEIRA MF, SOUSA MA, BARROS JHS, FIGUEIREDO FB, FAGUNDES A, SCHUBACH A, DE PAULA AA, FAISSAL BNS, FONSECA TS, THOMA HK, MARZOCHI MCA. ***Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil.** Parasitology 2009; 136: 411-23.
- MAIA DA SILVA F, JUNQUEIRA ACV, CAMPANER M, RODRIGUES AC, CRISANTE G, RAMIREZ LE, CABALLERO ZCE, MONTEIRO FA, COURA JR, AÑEZ N, TEIXEIRA MMG. **Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and**

- Rhodnius (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors.** *Molecular Ecology* (2007) 16, 3361–3373.
- MAIA DA SILVA F, MARCILI A, LIMA L, CAVAZZANA MJR., ORTIZ PA, CAMPANER M, TAKEDA GF, PAIVA F, NUNES VLB, CAMARGO EP, TEIXEIRA MMG. ***Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences.** *Acta Tropica* 109 (2009) 199–207.
- MAFIE E, RUPA FH, TAKANO A, SUZUKI K, MAEDA K, SATO H. **First record of *Trypanosoma dionisii* of the T. cruzi clade from the Eastern bent-winged bat (*Miniopterus fuliginosus*) in the Far East.** *Parasitology Research* (2018) 117:673–680.
- MARUYAMA SR, DE SANTANA AKM, TAKAMIYA NT, TAKAHASHI TY, ROGERIO LA, OLIVEIRA CAB, MILANEZI CM, TROMBELA VA, CRUZ AK, JESUS AR, BARRETO AS, DA SILVA AM, ALMEIDA RP, RIBEIRO JM, SILVA JS. **Non-Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil.** *Emerg Infect Dis.* 2019 Nov;25(11):2088-2092.
- MASLOV DA, OPPERDOES FR, KOSTYGOV AY, HASHIMI H, LUKEŠ J, YURCHENKO V (2018). **Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution.** *Parasitology* 146, 1–27. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>.
- MATOS HJ, PINTO AYN, MIRANDA AMM, SILVA FLC, RAMOS FLP. **Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças.** *Rev Pan-Amaz Saude* 2015; 6(1):51-54.
- MELOS JLR & ECHEVARRIA A. **Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos.** *Rev. Virtual Quim.* |Vol 4| |No. 4| |374-392| 2012.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Mata Atlântica.** Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento> Acessado em: 17/01/2020.
- MOLINARI J & MORENO SA. **The correct subgeneric name of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Euglenozoa: Trypanosomatidae), a human-infective endoparasite of neotropical mammals.** *Zootaxa* 4418 (1): 098–100 Copyright © 2018 Magnolia Press.
- MOREIRA D, LÓPEZ-GARCÍA P, VICKERMAN K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 1861–1875.
- MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. **Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles.** 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6810–6814.
- NAVEA-PÉREZ HM, DÍAZ-SÁEZ V, CORPAS-LÓPEZ V, MERINO-ESPINOSA G, MORILLAS-MÁRQUEZ F, MARTÍN-SÁNCHEZ J. ***Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts?** *Parasitol Res.* 2015 Jun;114(6):2363-70.

- NOGUEIRA MR, LIMA IP, MORATELLI R, TAVARES VC, GREGORIN R, PERACCHI AL. **Checklist of Brazilian Bats, with commentson original records.** Check List 10(4): 808-821. 2014.
- ORTIZ PA, GARCIA HA, LIMA L, SILVA FMD, CAMPANER M, PEREIRA CL, JITTAPALAPONG S, NEVES L, DESQUESNES M, CAMARGO EP, TEIXEIRA MMG. **Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of rodents.** Infection, Genetics and Evolution 63 (2018) 380–390.
- PATTON JL, PARDIÑAS UFJ, D'ELÍA. **Mammals of South America: rodents.** Eds. Vol. 2 The University of Chicago Press, Chicago, p. 1384. 2015.
- PAGLIA AP, FONSECA GAB, RYLANDS AB, HERRMANN G, AGUIAR LM, CHIARELLO AG, LEITE YLR, COSTA LP, SICILIANO S, KIERULFF MCM, MENDES SL, TAVARES VC, MITTERMEIER RA, PATTON JL. **Annotated Checklist of Brazilian Mammals.** 2nd edn. Occas Pap Conserv Biol 6:1-76. 2012.
- PIRES RC, BOITE MC, D'ANDREA PS, HERRERA HM, CUPOLILLO E, JANSEN AM, ROQUE ALR. **Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil.** PLOS Neglected Tropical Diseases. www.plosntds.org 2. December 2014 | Volume 8 | Issue 12 | e3389.
- PIRES RC, DE MELO MDFAD, BARBOSA RDH, ROQUE ALR (2017). **Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts.** PLoS ONE 12(3): e0173922.
- PONTES, ES. **INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM PEQUENOS MAMÍFEROS PROVENIENTES DE ÁREAS COM DISTINTOS PERFIS DE DEGRADAÇÃO AMBIENTAL NO ENTORNO DO MACIÇO DA PEDRA BRANCA, RIO DE JANEIRO/RJ.** Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharel em Ciências Biológicas das Faculdades São José, Rio de Janeiro, 2015.
- QUINTAL APN, RIBEIRO EDS, RODRIGUES FP, ROCHA FS, FLOETER-WINTERD LM, NUNES CM. ***Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil.** Veterinary Parasitology 176 (2011) 112–119.
- RAMIREZ LE, MACHADO MI, MAYWALD PG, MATOS A, CHIARI E, SILVA EL. **Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.31 n.1 Uberaba Jan./Feb. 1998.
- RAMIREZ JD, HERNANDEZ C, MONTILLA M, ZAMBRANO P, FLOREZ AC, PARRA E, CUCUNUB ZM. **First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype.** © 2013 Blackwell Verlag GmbH Zoonoses and Public Health, 61, 477–479.
- RANGEL, DA. **TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS DE ÁREAS FLORESTAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2017.
- RANGEL DA, LISBOA CV, NOVAES RLM, SILVA BA, SOUZA RDF, JANSEN AM, MORATELLI R, ROQUE ALR. **Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil.** (2019) PLoS Negl Trop Dis 13(7): e0007527.

- REIS NR, PERACCHI AL, PEDRO WA, LIMA IP. (Eds.). **Mamíferos do Brasil. 2nd ed.** Londrina; 2011. p. 31–69.
- RODRIGUES, CN. FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ, Brasil 2016. ***Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em morcegos provenientes de áreas com distintos perfis de degradação ambiental no entorno do Maciço da Pedra Branca, Rio de Janeiro/RJ.** Relatório Final de Bolsa FAPERJ - Iniciação Científica (até Maio, 2016). Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
- RODRIGUES MS. **Diversidade, especificidade e distribuição geográfica de *Trypanosoma* spp. em mamíferos.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2019.
- RODRIGUES MS, LIMA L, XAVIER SCDC, HERRERA HM, ROCHA FL, ROQUE ALR, MMG TEIXEIRA, JANSEN AM. **Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots.** *Parasites and Wildlife* 8 (2019) 171–181.
- ROMAN F, IÑIGUEZ AM, YEO M, JANSEN AM. **Multilocus sequence typing: genetic diversity in *Trypanosoma cruzi* I (TcI) isolates from Brazilian didelphids.** *Parasites & Vectors* (2018) 11:107.
- ROQUE ALR & JANSEN AM. **Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores.** In: GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014b, pp. 75-87. *Zoologia: guias e manuais de identificação series*. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books.
- SENDER BSL. FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ, Brasil 2018. **Infecção por tripanosomatídeos em pequenos mamíferos silvestres provenientes de áreas com distintos perfis de degradação ambiental no entorno do Maciço da Pedra Branca, Rio de Janeiro/RJ.** Relatório Final de Bolsa FAPERJ - Iniciação Científica (até Maio, 2018). Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
- SMITH A, CLARK P, AVERIS S, LYMBERY AJ, WAYNE AF, MORRIS KD, THOMPSON RCA. **Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoridae).** *Parasitology* 2008; 135:1329–35.
- SOS Mata Atlântica (2019).** Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>> Acessado em: 10/06/2019.
- STEINDEL M, DIAS NETO E, PINTO CJ, GRISARD EC, MENEZES CL, MURTA SM, SIMPSON AJ, ROMANHA AJ. **Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains.** *J Eukaryot Microbiol.* 1994 May-Jun;41(3):261-7.
- STEVENS JR, NOYES HA, SCHOFIELD CJ, GIBSON W. **The molecular evolution of *Trypanosomatidae*.** *Adv Parasitol.* 2001;48:1-56.
- SZŐKE K, SÁNDOR AD, BOLDOGH SA, GÖRFÖL T, VOTÝPKA J, TAKÁCS N, ESTÓK P, KOVÁTS D, CORDUNEANU A, MOLNÁR V, KONTSCHÁN J, HORNOK S. **DNA OF FREE-LIVING BODONIDS (EUGLENOZOA: KINETOPLASTEA) IN BAT ECTOPARASITES: POTENTIAL RELEVANCE TO**

- THE EVOLUTION OF PARASITIC TRYPANOSOMATIDS.** Acta Veterinaria Hungarica 65 (4), pp. 531–540 (2017) DOI: 10.1556/004.2017.051.
- TAHIR D, DAVOUSTA B, HEUC K, LAMOURB T, DEMARC M, MARIÉA JL, BLANCHET D. **Molecular and serological investigation of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in French Guiana.** Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports 12 (2018) 106–109.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S., MEGA5: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** Mol Biol Evol 2011; 28:2731-39.
- THOMPSON CK, GODFREY SS, THOMPSON RCA. **Trypanosomes of Australian mammals: A review.** Int J Parasitol Parasites Wildl 2014; 3: 57–66.
- TRÜEB I, PORTELA RD, FRANKE CR, CARNEIRO IO, RIBEIRO JR. GJ, SOARES RP, BARROUIN-MELO SM. **TRYPANOSOMA CRUZI AND LEISHMANIA SP. INFECTION IN WILDLIFE FROM URBAN RAINFOREST FRAGMENTS IN NORTHEAST BRAZIL.** doi: 10.7589/2017-01-017 Journal of Wildlife Diseases, 54(1), 2018, pp. 76–84.
- VARZINCZAK LH, MOURA MO, LIMA CS, PASSOS FC. **How do bat, rodent, and marsupial communities respond to spatial and environmental gradients? Insights from a deconstruction of mammal beta diversity from the Atlantic Forest of South America.** © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018.
- WANG LJ, HAN HJ, MIN Z, LIU JW, LUO LM, WEN HL, QIN XR, ZHOU CM, QI R, YU H, YU XJ. ***Trypanosoma dionisii* in insectivorous bats from northern China.** Acta Tropica 193 (2019) 124–128.
- WESTPHALEN EVN, BISUGO MDC, DE ARAÚJO MDFL. **Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano.** BEPA 2012;9(105):18-35.
- ZINGALES B. ***Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?** Revista da Biologia (2011) 6b: 44-48.