

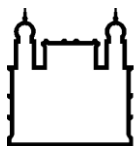
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro

ÉLIDA MILLENA DE VASCONCELOS BRANDÃO

Rio de Janeiro
Março de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ÉLIDA MILLENA DE VASCONCELOS BRANDÃO

Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro

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

Orientadores: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque
 Profa. Dra. Samanta Cristina das Chagas Xavier

RIO DE JANEIRO

Março de 2021

Brandão, Élica Millena de Vasconcelos.

Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro / Élica Millena de Vasconcelos Brandão. - Rio de Janeiro, 2021.

xix, 97f. f.; il.

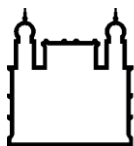
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Co-orientadora: Samanta Cristina das Chagas Xavier.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania* spp.. 3. hospedeiros silvestres e domésticos. 4. ecologia da paisagem. 5. agroecossistema do cerrado. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ÉLIDA MILLENA DE VASCONCELOS BRANDÃO

Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro

ORIENTADORES: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque
Profa. Dra. Samanta Cristina das Chagas Xavier

Aprovada em: 30/março/2021

EXAMINADORES:

Dr. Rafael Maciel de Freitas – Presidente
Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ

Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves - Revisor
Universidade de Brasília - UnB

Dr. Omar Cantillo-Bazarrá
Universidad de Antioquia - Udea

Dr. Daniel de Almeida Balthazar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Dra. Marina Galvão Bueno
Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 30 de março de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Elida Millena de Vasconcelos Brandão**, sob orientação do Dr. André Luiz Rodrigues Roque e coorientada pela Dr^a. Samanta Cristina das Chagas Xavier. Ao trigésimo dia do mês de março de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **“Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* em uma área do cerrado brasileiro”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Rafael Maciel de Freitas – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves– UnB/DF, Dr. Omar Cantillo Barraza – UDEA/ANTIOQUIA, e como suplentes: Dr. Daniel de Almeida Balthazar- UFRRJ/RJ e Dr^a. Marina Galvão Bueno - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de março de 2021.

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador Adjunto do Programa):

Dedico a paiho e à mainha: Edmilson e Cícera Brandão. À minha amada avó (*in memorian*) e a todas as pessoas e circunstâncias que cruzaram meu caminho até aqui, com as quais tive a grande sorte de aprender... *seja pelo amor ou pela dor!!*

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar meus agradecimentos que não fosse pelo início cronológico. Uma alagoana, do interior do Estado, viu no Rio de Janeiro a oportunidade de trilhar novos caminhos e possibilidades que talvez não alcançasse em sua terra. Uma terra pouco provida de recursos, de investimentos e mal administrada. Um povo excluído e esquecido, fruto de um histórico longínquo de desprezo pelo poder público e pelo inconsciente coletivo. No Rio de Janeiro, experimentei muitas oportunidades de crescimento: profissional e, sobretudo, pessoal. Uma trajetória repleta de alegrias e de muitas dores. Assim, deixo o meu enorme agradecimento ao Rio de Janeiro, por vezes tão cruel e preconceituoso às diferenças, mas que através dele aprendi sobre possibilidades e a olhar com mais valorização para as minhas origens.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CNPq pelo auxílio financeiro.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária pela oportunidade de crescimento.

A todos os membros do Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos – LABTRIP, que me receberam, desde o mestrado. Por todas as vivências e partilhas, tanto em caráter científico quanto pessoal. No tocante ao doutorado, minha trajetória foi marcada por muitas dores pessoais e, por isso, agradeço a todos que escolheram o caminho da paciência, da empatia e da generosidade, porque mesmo vivenciando suas próprias dores internas, passaram por cima de seus preconceitos e julgamentos e souberam acolher a minha dor.

Agradecimento especial e carinhoso à Dra Ana Maria Jansen. Talvez nunca consiga expressar em palavras o tamanho da minha gratidão a essa profissional, mulher e ser humano em minha vida. Mas agradeço a ela por todo acolhimento que recebi, desde 2013, quando ainda estava em Alagoas e planejando ingressar na Pós-graduação no RJ. Por todos os momentos que me fez acreditar em mim mesma, que soube extrair de mim o que tenho de melhor, quando me ouviu e fez com que eu mesma me ouvisse, por todos os abraços que recebi dela quando faltou o aconchego dos meus pais. Acredito que foi a pessoa que melhor soube acolher e entender meus processos, quando nem mesma eu era capaz de me entender.

Aos meus orientadores: André Luiz Rodrigues Roque e Samanta Cristina das Chagas Xavier, pela paciência, generosidade e por toda oportunidade de aprendizado que me ofereceram. Juntos, eles foram incentivo, parceria, ombro amigo e trabalho em conjunto. Parte da gratidão que sinto pela Dra Ana, também pode ser extrapolada ao André, que me acompanha desde o mestrado como orientador e que é parte significativa do meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço por todas as vezes em que acreditou em mim, em que me deu voz, em que houve a possibilidade de diálogo, em que me orientou a resolver minhas questões pessoais de uma forma assertiva e madura. Por todos os momentos que foi firmeza, mas também acolhida.

Ao Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado e à Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela parceria para que essa tese se materializasse. Através da colaboração com essas instituições tive o prazer de conhecer muita gente que foi acolhida e aprendizado. Onde pude vivenciar trocas científicas, trabalhos de campo (e descobrir que gosto muito dessa atividade), aprender sobre trabalho em equipe e jogo de cintura. Foram mais de seis anos de parceria, desde o mestrado, por isso meus sinceros agradecimentos a todos. Nessa etapa do doutorado, agradeço especialmente ao Frederico Gemésio Lemos e ao Caio Motta que estiveram mais de perto e cujas trocas foram maiores.

À Maria Augusta, por darmos um novo significado a nossa amizade, quando decidimos dar uma chance de permanecermos uma na vida da outra. Por ser uma pessoa que me faz bem. Agradeço a ela e à Marina Rodrigues, por toda disposição em me ensinarem e ajudarem a materializar essa tese. Gratidão porque foram, tantas vezes, disponibilidade, empatia, auxílio, acolhimento e ouvidos.

Agradeço à Diana Rangel, por todas as nossas partilhas de vida, pelos nossos diálogos, pelo apoio que oferecemos uma à outra, por ter sido ombro amigo e pela disposição em estreitar nossos laços, mesmo estando em continentes diferentes.

À Kátia Cristina, Fernanda Alves, Fabíola Roman, Alice Berbigier, Suellen Sanches, Valquíria Trajano, Cláudia Calheiros, Elis Dionísio, Lariane Lacerda, Lauren Jaeger e Lorena Barreto porque, com cada uma delas e, cada uma a seu modo, partilhamos sobre positividade, amizade, empatia, firmeza, sorrisos, carinho, fé e apoio.

Às amigas Thaíse Melo e Fabiana Chimes, por toda expressão de carinho, de cuidado, de aprendizados, e todas as boas vivências que fortaleceram nossa amizade. Ao

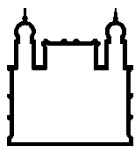
estimado amigo Arion Aranda por toda a sua amizade e suas palavras de conforto e apoio.

Pelo momento caótico e nebuloso que estamos enfrentando e pelo meu próprio caos interno, agradeço imensamente aos terapeutas que me acompanharam: Marisol Seabra, Rosemary Bonifácio e Gustavo Machado, sem os quais eu não teria conseguido chegar até aqui.

À segunda temporada no pensionato, onde pude ressignificar uma parte do meu passado. Agradeço às meninas que estiveram lá, por toda partilha que vivemos e por poder aprendermos umas com as outras. Agradecimento especial à Solange Rocha, por despertar em mim meu lado mais sorridente.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à toda a minha família (aos encarnados e desencarnados) e ao meu amado irmão Hexiton Brandão. Agradeço aos meus queridos pais que me ensinaram sobre honestidade, integridade, humildade, hospitalidade, carinho, responsabilidade, amor e respeito. Por me amarem a ponto de me darem liberdade para voar e viver minha vida e minhas escolhas. Gratidão a eles porque, dentro das suas possibilidades, me deram sempre o melhor: a possibilidade de ser eu mesma.

“Continue a nadar...”
(Personagem Dory do Filme Procurando Nemo)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro

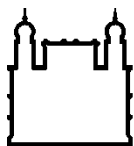
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Élida Millena de Vasconcelos Brandão

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* spp. são parasitas de uma diversidade de mamíferos e insetos hematófagos vetores, que estão imersos em complexos ciclos de transmissão na natureza. Em um agroecossistema, como na região do Limoeiro (Cumari/Goiás), as espécies silvestres, domésticas e humanas compartilham áreas, podendo estabelecer uma estreita rede de interconexões, favorecendo as relações ecológicas, como o fluxo de parasitas entre elas. Além disso, o ambiente com as características ecológicas espaciais da paisagem também pode ter influência nos ciclos de transmissão de parasitas. Nosso objetivo foi analisar, em um recorte espaço-temporal, os encontros e as interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não voadores como fator de dispersão de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do Cerrado brasileiro. Foram realizadas excursões para a captura de pequenos mamíferos (2013-2015), canídeos silvestres (2013-2017) e domésticos (2014-2017). Foram coletadas amostras de sangue de todos os grupos de animais, amostras de pele, baço e fígado dos pequenos mamíferos e amostras de pele e medula óssea dos canídeos silvestres. Do sangue coletado foram realizados exames a fresco, hemocultivos (NNN/LIT) e uma parte foi centrifugado para obtenção do soro para testes sorológicos (RIFI, ELISA e/ou DPP). Amostras de pele, baço, fígado e medula óssea foram semeadas em meio NNN/Schneider e, com exceção do último, fragmentos de todos os demais tecidos também foram conservados em etanol para diagnóstico molecular por PCR. Análise espacial foi baseada na abordagem da Ecologia da Paisagem, através das métricas da paisagem e do Índice de Vegetação

por Diferença Normalizada, sendo realizada no software QGIS. Foram capturados 558 animais, sendo 283 cães domésticos, 131 canídeos silvestres e 144 pequenos mamíferos. As taxas de recapturas de cães domésticos e silvestres foram de 33% e 15%, respectivamente. A espécie de canídeo silvestre mais capturada foi *Cerdocyon thous* e a mais recapturada foi *Lycalopex vetulus*. *Gracilinanus agilis* foi a espécie de pequeno mamífero mais abundante e a única com potencial infectivo frente à infecção por *T. cruzi* (7/70; 10%). As taxas de infecção por *T. cruzi* foram maiores que as de *Leishmania* spp. em todos os animais investigados e mais predominante no ambiente silvestre. As variáveis ambientais que melhor explicaram a infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos silvestres foram abundância das espécies, área núcleo, cobertura do solo e grau de proximidade. As características ecológicas espaciais da área demonstraram que a infecção por *T. cruzi* nesses animais foi mais relacionada a fragmentos de maior tamanho, com formas irregulares e maior grau de proximidade. Uma maior riqueza de espécies de tripanossomatídeos e/ou genótipos de *T. cruzi* foi encontrada nos pequenos mamíferos que nos canídeos, sendo que canídeos silvestres, domésticos e marsupiais compartilharam a mesma DTU TcIII. Na área, pequenos mamíferos não voadores podem ser fonte de infecção aos canídeos por meio da predação ou servindo de fonte de infecção para os vetores que podem vir a infectar os canídeos. Canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores estão envolvidos numa rede sobreposta de transmissão desses parasitas, com conectividade espacial entre si.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Interactions between wild canids, domestic dogs, and non-flying small mammals in the transmission network of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian Cerrado

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Élida Millena de Vasconcelos Brandão

Trypanosoma cruzi and *Leishmania* spp. are parasites of a diversity of mammals and blood-sucking insect vectors, which are immersed in complex transmission cycles in nature. In an agroecosystem, such as in the Limoeiro region (Cumari/Goiás), wild, domestic, and human species share areas, being able to establish a close network of interconnections and favor ecological relations, including parasites' flow. Moreover, the environment with the spatial ecological characteristics of the landscape can also influence the parasite transmission cycles. Our objective was to analyze, in a space-time perspective, the encounters and interactions between wild and domestic canids, and non-flying small mammals as dispersion factor for *T. cruzi* and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian Cerrado. Expeditions were carried out to capture small mammals (2013-2015), wild canids (2013-2017) and domestic canids (2014-2017). Blood samples were collected from all groups of animals; skin, spleen, and liver samples from small mammals; skin and bone marrow samples from wild canids. Fresh blood tests, hemocultures in NNN/LIT medium and centrifugation to obtain serum for serological tests (IFAT, ELISA and/or DPP) were performed. Samples of skin, spleen, liver, and bone marrow were cultivated in NNN/Schneider medium and, except for the last one, fragments of all the other tissues were also preserved in ethanol for molecular diagnosis by PCR. Spatial analysis was based on the Landscape Ecology approach, through the metrics of the landscape and Normalized Difference Vegetation Index, being performed in the QGIS software. A total of 558 animals were captured during the study period, with 283 domestic dogs, 131 wild canids and 144 small mammals.

Recapture rates for domestic and wild dogs were 33% and 15%, respectively. The most captured wild canid species was *Cerdocyon thous* and the most recaptured was *Lycalopex vetulus*. *Gracilinanus agilis* was the most abundant small mammal species and the only one that displayed potential to be source of *T. cruzi* infection (7/70; 10%). Infection rates for *T. cruzi* were higher than for *Leishmania* spp. in all investigated animals and more prevalent in the wild environment. The environmental variables that best explained *T. cruzi* infection in small mammals and wild canids were abundance of species, core area, land cover and degree of proximity. The spatial ecological characteristics of the area demonstrated that *T. cruzi* infection in these animals were more related to larger fragments, with irregular shapes and a greater degree of proximity. A greater richness of trypanosomatid species and/or genotypes of *T. cruzi* was found in small mammals than in canids, with wild canids, domestic dogs and marsupial sharing the same TcIII DTU. In the area, non-flying small mammals can be a source of infection to canids through predation or serving as a source of infection for vectors that may infect canids. Wild canids, domestic dogs and non-flying small mammals are involved in an overlapping transmission network of these parasites, with spatial connectivity between them.

ÍNDICE

RESUMO XI

ABSTRACT XIII

1 INTRODUÇÃO GERAL.....1

1.1 *Trypanosoma cruzi*.....2

1.2 *Leishmania* spp.4

1.3 Pequenos mamíferos x Infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.6

1.4 Canídeos silvestres x Infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.8

1.5 Bioma Cerrado e as interações Tripanossomatídeos-Hospedeiro-Ambiente..... 10

1.6 Ecologia da Paisagem e suas aplicações em estudos de infecção..... 11

1.7 Justificativa..... 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 Objetivo Geral..... 16

2.2 Objetivos Específicos 16

CAPÍTULO 1 - Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in central Brazil: another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape.....17

CAPÍTULO 2 - Wild and domestic canids and their interactions in the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian Cerrado.....33

CAPÍTULO 3 - Landscape Ecology Model in the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in wild canids and small mammals in Limoeiro region, Goiás state, Brazil.....53

Materiais e Métodos.....54

Área de estudo e período das coletas.....54

Ecologia da paisagem.....54

Métricas da Paisagem.....54

Índice de Vegetação por Diferença Normalizada - NDVI.....58

| | | |
|----------|---|-----------|
| | Análise espacial da Ecologia da Paisagem..... | 59 |
| | Análise estatística..... | 59 |
| | Resultados..... | 60 |
| | Análise espacial da Ecologia da Paisagem..... | 61 |
| | Análise estatística..... | 70 |
| | Perspectivas..... | 72 |
| 3 | DISCUSSÃO | 73 |
| 4 | CONCLUSÕES | 81 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

Lista de Figuras

Figura 1. Relação entre a distribuição espacial das espécies de pequenos mamíferos e canídeos silvestres capturadas com o tamanho da área dos fragmentos (A) que compõem a região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil, destacando o fragmento 394 - Trilha E (B), classificado com tamanho médio e que apresentou percentuais significativos de riqueza, abundância e infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos.....62

Figura 2. (A) Distribuição espacial da infecção por *Trypanosoma cruzi* nos pequenos mamíferos e canídeos silvestres capturados na região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil, mostrando a relação da infecção com o tamanho dos fragmentos e a distribuição das DTUs (Unidades de Tipagem Discretas) encontradas nos animais estudados. Em (B) uma área com detecção da DTU TcIII em pequenos mamíferos e em (C) uma área focal com presença de pequenos mamíferos e canídeos silvestres detectados infectados com a mesma DTU TcIII.....65

Figura 3. Relação da distribuição espacial dos animais capturados e da infecção por *Trypanosoma cruzi* com o Índice de forma dos fragmentos com capturas. (A): distribuição de pequenos mamíferos e canídeos silvestres mais capturados dentro ou próximo de fragmentos com formas irregulares (índice de forma >2), destacando o único fragmento com forma relativamente irregular (Fragmento 394 – Trilha E), no canto superior direito. (B): distribuição espacial da infecção por *T. cruzi* (diagnóstico sorológico, parasitológico e caracterização das DTUs) em pequenos mamíferos e canídeos silvestres com os fragmentos com formas irregulares (índice de forma >2).....67

Figura 4. Relação da distribuição espacial dos animais capturados (A) e da infecção por *Trypanosoma cruzi* (B) com o grau de proximidade dos fragmentos com capturas. Em (A) visualiza-se no canto superior direito o fragmento 394 – Trilha E, com baixo grau de proximidade em relação aos demais fragmentos com capturas. A infecção por *T. cruzi* foi realizada através dos diagnósticos parasitológicos, sorológicos e caracterização molecular das DTUs (Unidades de Tipagem Discretas).....69

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação da área dos fragmentos florestais (medida em hectares), agrupados em cinco classes de tamanho diferentes..... | 55 |
| Tabela 2. Descrição das métricas da paisagem disponíveis no plugin LecoS (Landscape Ecology Statistics) do software QGIS (Quantum Geographic Information System)..... | 56 |
| Tabela 3. Valores (absoluto e qualitativo) e porcentagem de perda e ganho de área dos fragmentos por classe em um período de cinco anos (2013 a 2017) na região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil..... | 60 |
| Tabela 4. Relação entre a riqueza, abundância das espécies e a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> com o tamanho e o índice de forma dos fragmentos com capturas de pequenos mamíferos e canídeos silvestres..... | 63 |
| Tabela 5. Teste ANOVA comparando os 10 modelos estatísticos gerados e seus valores de AIC (Critério de Informação de Akaike)..... | 70 |
| Tabela 6. Modelo final completo da análise estatística, mostrando a relação das covariáveis avaliadas com a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em pequenos mamíferos e canídeos silvestres da região do Limoeiro, Cumari/GO..... | 71 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| DTUs | <i>Discrete Typing Units</i> – Unidades discretas de tipagem |
| LVC | Leishmaniose Visceral Canina |
| mOTUs | <i>Metagenomic operational taxonomic units</i> - Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares |
| GO | Goiás |
| NDVI | <i>Normalized Difference Vegetation Index</i> - Índice de Vegetação por Diferença Normalizada |
| GPS | <i>Global Positioning System</i> – Sistema de Posicionamento Global |
| WGS-84 | World Geodetic System – Sistema Geodésico Mundial |
| QGIS | Quantum Geographic Information System – Sistema de Informação Geográfica Quântica |
| LecoS | Landscape Ecology Statistics – Estatísticas de Ecologia da Paisagem |
| Ha | Hectare |
| m ² | metro quadrado |
| m | metro |
| m/ha | metros por hectare |
| INPE | Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais |
| NIR | <i>Near Infra-red band</i> - Banda Infra-Vermelho Próximo |
| R | <i>Red band</i> – Banda Vermelho |
| AIC | Critério de Informação de Akaike |
| RR | Fragmentos com forma relativamente regular |
| I | Fragmentos com formas irregulares |
| PXfg | Grau de proximidade funcional |
| ANOVA | Teste de análise de variância |
| TIFF | <i>Tagged Image Format File</i> - Formato de Arquivo de Imagem com Tags |

1 INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e espécies do gênero *Leishmania* Ross, 1903 são protozoários flagelados pertencentes à família Trypanosomatidae Doflein, 1901. Quanto ao ciclo de vida são heteroxênicos, visto que participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado (Stevens 2008; Lukeš et al. 2018). São parasitas obrigatórios de múltiplos hospedeiros, capazes de infectar várias espécies de mamíferos e de insetos vetores hematófagos, os quais apresentam-se imersos em complexos ciclos de transmissão na natureza, que se caracterizam por serem dinâmicos e multivariáveis (Ashford 1996; Jansen, Xavier, Roque 2015). *T. cruzi* e *Leishmania* spp. são caracterizados por alta diversidade genética, bioquímica e molecular, o que, em parte, explica sua expressiva plasticidade biológica (Roque, Jansen 2014; Lukeš et al. 2018). São primariamente enzootias de mamíferos silvestres, e no caso de *T. cruzi*, a via oral, por predação de vetores e mamíferos infectados, é apontada como a principal estratégia de dispersão na natureza (Jansen, Roque 2010; Rocha et al. 2013; Roque, Jansen 2014). Em humanos, *T. cruzi* e as diferentes espécies de *Leishmania* são causadores da Doença de Chagas e das Leishmanioses, respectivamente, constituindo um problema de saúde pública em todo o mundo.

A destruição de ecossistemas, em especial através de processos de fragmentação de habitat, aquecimento global, atividades exploratórias não sustentáveis, expansão da agricultura e da pecuária impõem importantes restrições de área e alimento às populações de mamíferos silvestres, e são fatores que contribuem para fronteiras cada vez menores entre os animais silvestres, domésticos e os humanos (Aguirre, Tabor 2008; Jones et al. 2008). A consequência deste processo é a intensificação do contato entre eles, aumentando as oportunidades ou chances de exposição à troca mútua de parasitas (Roque et al. 2008; Thompson et al. 2010; Colwell et al. 2011; Ramos et al. 2020). Esses cenários de mudança da paisagem tanto são preocupantes por conta do impacto direto para a conservação da biodiversidade local e ambiental, quanto são relevantes para a saúde pública (Otranto et al. 2015).

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um flagelado amplamente distribuído na natureza, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (Roellig et al. 2008; Piccinali et al. 2010, Brenière et al. 2016). Esse parasita é extremamente generalista, estabelecendo infecções em centenas de espécies de mamíferos e dezenas de espécies de insetos triatomíneos vetores (Ordem Hemiptera), que são hematófagos (Noireau et al. 2009; Jansen, Roque 2010). Em seus hospedeiros mamíferos, infecções por *T. cruzi* podem ser estáveis e de longa duração, as quais são moduladas por peculiaridades inerentes às diferentes espécies hospedeiras (e até mesmo indivíduos) e outros fatores, como as subpopulações do parasita, a via de infecção, o *status* nutricional do hospedeiro e infecções mistas com diferentes genótipos de *T. cruzi* e/ou outros parasitas (Jansen, Xavier, Roque 2015).

A diversidade de hospedeiros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, e as consequentes pressões seletivas de distintas interações se refletem na sua diversidade genética (Macedo et al. 2004; Freitas et al. 2006). A este fator, considerado uma importante vantagem evolutiva, soma-se ao fato de *T. cruzi* ser capaz de infectar todas as células nucleadas em qualquer tecido dos mamíferos. Além disso, suas diversas formas infectivas representam uma estratégia bem sucedida da transmissão desse parasita na natureza (Jansen, Xavier, Roque 2018).

A origem da sua heterogeneidade ainda representa um desafio a ser compreendido (Jansen, Xavier, Roque 2018). Embora a estrutura populacional de *T. cruzi* seja principalmente clonal, eventos como introgressão mitocondrial e hibridização ocorrem tanto intra como inter- DTUs (*Discrete Typing Units*) (Tomasini 2018). A frequência com que esses fenômenos ocorrem na natureza e sua importância como promotores da diversidade de *T. cruzi* tem sido um assunto muito discutido por décadas (Jansen, Xavier, Roque 2018).

Atualmente, o conjunto dessas subpopulações de *T. cruzi* está subdividido em sete unidades taxonômicas ou DTUs, reconhecidas como TcI-TcVI e Tcbat (Marcili et al. 2009; Zingales et al. 2012; Jansen, Xavier, Roque 2018). Esta última, anteriormente assumida como restrita a morcegos, já foi descrita infectando múmias humanas pré-colombianas (Guhl et al. 2014; Ramirez et al. 2014). As tentativas que foram feitas para associar uma determinada subpopulação de *T. cruzi* com as diferentes formas clínicas da doença humana, a ecologia de suas espécies hospedeiras (mamíferos e

insetos vetores) e o bioma de sua ocorrência ainda são controversas (Dario et al. 2016). Se existe alguma associação, apenas estudos de longo prazo com um número representativo de isolados de *T. cruzi* e de espécies de mamíferos de diferentes biomas e habitats poderão estabelecer isso (Jansen, Xavier, Roque 2018). Devido a subamostragem de hospedeiros e habitats, uma vez que as amostras são obtidas geralmente em apenas uma única ocasião de um único indivíduo infectado, e ao fato de que essas amostras são submetidas às pressões seletivas inerentes ao isolamento, a ecologia das DTUs de *T. cruzi* está longe de ser bem compreendida (Dario et al. 2016; Jansen, Xavier, Roque 2018). Populações de *T. cruzi* podem ser selecionadas quando crescem em condições de laboratório pós isolamento, ou mesmo em infecções naturais (dentro de seu hospedeiro), e representam fatores que podem levar a conclusões errôneas em relação a variedade de DTU e suas possíveis associações (Deane et al. 1984a; Morel et al. 1986).

Quanto à forma de transmissão dos tripanossomas, *T. cruzi* faz parte da seção Stercoraria, uma vez que se desenvolve na porção posterior do intestino do hospedeiro invertebrado, o que determina a transmissão vetorial contaminativa, isto é, eliminação das formas metacíclicas (sobre a pele ou mucosas), juntamente com as fezes durante o repasto sanguíneo do vetor (Hoare 1972).

A infecção por *T. cruzi* pode ocorrer por várias vias: vetorial contaminativa, oral, transfusional, por transplantes de órgãos, congênita, transmissão sexual (Dias 2006; Dias e Neto 2011; Roque e Jansen 2014; Ribeiro et al. 2015), sendo que todas essas formas contribuem para a dispersão do parasita. Esta última é um tema pouco estudado, principalmente entre os mamíferos silvestres, pelas dificuldades inerentes ao trabalho de campo. No entanto, estudos experimentais em camundongos infectados são freqüentemente usados para avaliar a transmissão desse parasita e demonstram que a transmissão sexual do *T. cruzi* é um evento comum que pode contribuir para a manutenção do ciclo enzoótico do parasita (Ribeiro et al. 2015; Rios et al. 2018). Entre os animais silvestres, a clássica via vetorial contaminativa por formas metacíclicas eliminadas nas fezes dos triatomíneos infectados e alcançando a circulação sanguínea a partir da lesão originada pela picada do inseto vetor pode ocorrer frequentemente em animais em seus abrigos e ninhos (Rocha et al. 2013; Jansen, Xavier, Roque 2018). Mas a principal e provavelmente mais eficiente estratégia de dispersão de *T. cruzi*, na natureza, é a via oral (Noireau et al. 2009). Esta

via também tem sido responsável pela maior parte das infecções humanas nos últimos anos (Pereira et al. 2010; Filigheddu et al. 2017).

A infecção de mamíferos pela via oral pode ocorrer em diversas circunstâncias: (i) quando o animal coça o local da picada com a boca e ingere fezes contaminadas de triatomíneos, (ii) ingestão de frutos ou sementes contaminados por fezes infectadas de triatomíneos ou excreção da glândula de cheiro de *Didelphis* spp., que podem eliminar formas infectivas do parasita (tripomastigotas metacíclicas) (Deane et al. 1984b), (iii) interações agonísticas que envolvam mordeduras com perfuração que permitam o contato da mucosa oral de um animal com sangue infectado de outro, (iv) ingestão de triatomíneos infectados; ou (v) predação de mamíferos infectados (Thomas et al. 2007; Roelling et al. 2009; Jansen, Roque 2010). Desse modo, a transmissão de *T. cruzi* na natureza está profundamente imersa em redes tróficas (Rocha et al. 2013; Jansen, Xavier, Roque 2015).

1.2 *Leishmania* spp.

As espécies de *Leishmania* exibem uma distribuição mundial, estando presentes em áreas tropicais e subtropicais, incluindo as Américas do Norte, Central e do Sul, Bacia do Mediterrâneo, sudeste da Europa, Oriente Médio, centro e sudeste da Ásia, subcontinente indiano e África. Alguns relatórios também têm demonstrado sua presença na Austrália (Rose 2004; Akhoundi et al. 2016).

Seus hospedeiros invertebrados são fêmeas de flebotomíneos (Ordem Diptera) e os hospedeiros vertebrados incluem répteis e mamíferos (OPAS 2020). No caso desse último, nas Américas, compreende pelo menos sete diferentes ordens, como Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata e Chiroptera (Roque, Jansen 2014).

Classicamente, se considera que estes organismos apresentam um modo de propagação clonal. No entanto, esse gênero também apresenta uma grande diversidade genética inter- e intraespecífica, resultado do possível intercâmbio genético dentro da mesma espécie ou entre espécies muito similares filogeneticamente e, ao que tudo indica, após eventos de recombinação, os híbridos resultantes se propagam como clones (OPAS 2020; Akhoundi et al. 2016; Akhoundi et al. 2017). Essa expressiva heterogeneidade levou a várias tentativas de se formular classificações para as espécies de *Leishmania* ao longo do tempo (Lainson 1972;

Vickerman 1976; Saf'janova 1982; Rioux 1990; Thomaz-Soccol et al. 1993; Cupolilo et al. 2000; Lainson 2010).

Atualmente, esse gênero se encontra organizado em 3 subgêneros: (i) *L. (Sauroleishmania)* Ranque, 1973; (ii) *L. (Leishmania)* Saf'janova, 1982 e; (iii) *L. (Viannia)* Lainson e Shaw, 1987. O primeiro inclui somente parasitas de répteis e os outros dois subgêneros são parasitas de mamíferos (Fraga et al. 2010; OPAS 2020).

Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* foram descritas (sem considerar os sinônimos e incluindo todos os subgêneros e complexos). Dessas, 31 espécies são conhecidas como parasitas de mamíferos e 20 espécies são patogênicas para seres humanos (Akhoundi et al. 2016). Até o momento, no continente americano, se tem confirmado a circulação de 12 espécies de *Leishmania*, todas causadores das leishmanioses (OPAS 2020).

A categorização das infecções em Visceral e Tegumentar, e sua associação com as diferentes espécies de *Leishmania* está diretamente relacionado à infecção em humanos, não sendo aplicado a infecções para outros mamíferos, uma vez que já se demonstrou cães com parasitas em pele íntegra infectados com espécies de *Leishmania* associadas a forma visceral (Madeira et. al. 2009) e, espécies de *Leishmania* associadas a forma cutânea presentes em vísceras de roedores (Nery-Guimarães 1951; Roque et al. 2010; Brandão 2016).

Na natureza, as leishmanias se mantêm e são transmitidas entre mamíferos e flebotomíneos em seus ciclos naturais, apesar das baixas taxas de infecções usualmente registradas na fauna silvestre. Apesar da variedade de hospedeiros, estudos indicam que apenas uma minoria dentre as espécies pode ser considerada um potencial reservatório, isto é, que apresentam características favoráveis para infectar vetores (OPAS 2020; Roque, Jansen 2014; Brandão et al. 2019). Só recentemente foi demonstrado que a carga do parasita, principalmente na pele, pode estar relacionada com a transmissibilidade do parasita durante a infecção natural (Courtenay et al. 2014).

Apesar da forma vetorial ser a principal via de transmissão, o registro da ocorrência de flebotomíneos com baixas taxas de infecção por *Leishmania* spp., bem como transmissão autóctone na ausência de encontro de vetores em áreas com LVC (Leishmaniose Visceral Canina), sugerem que outros mecanismos de transmissão podem estar envolvidos (Ferreira et al. 2009; Colombo et al. 2011). Embora a via oral ainda não tenha sido demonstrada através da predação de mamíferos, sabe-se que

amastigotas são capazes de infectar, e esta é uma via que ainda não pode ser descartada de ocorrer na natureza. Lainson et al. (2002), testaram a infectividade de amastigotas de *Leishmania infantum* em roedores *Proechimys guyannensis* e usaram hamsters (*Mesocricetus aureus*) como grupo controle. Embora nenhum *P. guyannensis* tenha sido infectado, todos os hamsters apresentaram amastigotas em abundância no fígado e no baço quando examinados depois de seis meses da inoculação. Spotin e Parvizi (2015) testaram a patogenicidade de amastigotas de *Leishmania major* em camundongos BALB/c e concluíram que uma baixa dose de amastigotas é capaz de infectar hospedeiros susceptíveis, atribuindo essa condição possivelmente a fatores de virulência em potencial, altamente expressos pelas formas amastigotas, como as proteínas específicas como Glicosil Inositol Fosfolipídeos (GIPLs), Lipofosfoglicanos (LPGs), proteases cisteínas e metaloproteases (GP63), sendo indicativos da possível infectividade das formas amastigotas.

1.3 Pequenos mamíferos x infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Segundo Hayward, Phillipson (1979), o termo “pequenos mamíferos” não constitui claramente uma definição taxonômica e é geralmente considerada como referindo-se a qualquer conjunto de espécies de mamíferos de pequeno porte que não exceda 5kg quando adulto. Desse modo, estão inseridos membros de diferentes ordens. Para o presente trabalho foram considerados os marsupiais (Ordem Didelphimorphia) e os roedores (Ordem Rodentia).

Pequenos mamíferos são considerados bons bioindicadores ambientais e modelos adequados para estudos do fenômeno parasitismo, por: (i) apresentarem populações numerosas; (ii) possuírem curto tempo de vida – o que permite monitorar novos casos de infecção; (iii) serem encontrados em todos os biomas e ecótopos – naturais e modificados – e ocuparem todos os estratos florestais, o que permite compreender em que nível acontece a transmissão; (iv) incluírem gêneros de comportamento nômade, o que favorece a dispersão de parasitos; e (v) serem alvos de predação pelos animais de topo de cadeia, possibilitando uma eficiente via de dispersão de várias espécies de parasitas (Mills, Childs 1998), incluindo *T. cruzi* e, talvez também, espécies de *Leishmania*. Além disso, embora silvestres, algumas espécies vivem em áreas peridomésticas e/ou ambientes rurais e se adaptam bem à

presença do homem, ou seja, apresentam um caráter sinantrópico (Roque et al. 2013, Roque, Jansen 2014).

A ordem Didelphimorphia é a única ordem de marsupial reconhecida nas Américas. Mamíferos desta ordem têm uma ampla distribuição, principalmente *Didelphis* spp., devido à sua notável adaptabilidade a diferentes nichos ecológicos, particularmente para ambientes com alto grau de atividade humana (Austad 1988; Olifiers et al. 2005; Roque, Jansen 2014). Marsupiais são reconhecidos como hospedeiros muito antigos de espécies do clado *T. cruzi* (Stevens et al. 1998; Lopes et al. 2018), embora, a origem deste clado ainda permanece inconclusiva. Espécies do gênero *Didelphis*, em especial, têm a capacidade de albergar uma diversidade expressiva de espécies de tripanossoma e unidades taxonômicas (mOTUs) (Jansen, Xavier, Roque 2018). Membros dessa ordem também já foram encontrados infectados ou são potenciais reservatórios de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* (Arias et al. 1981; Grimaldi et al. 1991; Llanos-Cuentas et al. 1999; Schallig et al. 2007; Quaresma et al. 2011; Carreira et al. 2012).

Os roedores são incluídos na ordem mais diversificada (aproximadamente 2000 espécies) e dispersa de mamíferos nas Américas: a Ordem Rodentia (Oliveira, Bonvincino 2006; OPAS 2020). Embora altamente susceptíveis a infecção experimental por *T. cruzi*, na natureza os roedores parecem desempenhar um papel secundário como reservatórios desse parasita, uma vez que, no geral, apresentam baixas taxas de infecção. Porém, há que se considerar também que os padrões de transmissão de *T. cruzi* podem variar no tempo e no espaço e, portanto, dependendo da localidade os roedores podem ser importantes reservatórios, como foi observado na Caatinga, onde as espécies *Rattus rattus* e *Thrichomys laurentius* apresentaram altas taxas de hemoculturas positivas (Jansen, Xavier, Roque 2018). A respeito da infecção por *Leishmania*, este táxon é provavelmente o mais estudado em termos de infecção em condições naturais e experimentais (Roque, Jansen 2014). Roedores têm sido encontrados infectados por uma grande diversidade de espécies de *Leishmania* (Peterson et al. 1988; Travi et al. 2002; Brandão-Filho et al. 2003; Oliveira et al. 2005; Dantas-Torres, Brandão-Filho 2006; Rotureau 2006; Quinnell, Courtenay 2009; Roque et al. 2010; Quaresma et al. 2011; de Freitas et al. 2012; Lima et al. 2013; Cássia-Pires et al. 2014; Cardoso et al. 2015; Caldart et al 2017; Foroutan et al. 2017). Apesar dos inúmeros estudos que implicam que os roedores são reservatórios de *L.*

braziliensis, *L. mexicana* e *L. amazonensis* somente algumas espécies de roedores, especialmente aquelas da subordem Hystricognathi (caviomorfos), podem ser consideradas atualmente seus potenciais reservatórios, devido ao frequente parasitismo cutâneo confirmado por cultura de tecidos (isolamento de parasitas), em infecções naturais, e pela capacidade de manter a infecção e o reisolamento de parasitas, em infecções experimentais (Dedet et al. 1989; Travi et al. 1998; Travi et al. 2002; Rotureau 2006; Roque, Jansen 2014; Roque et al. 2010; OPAS 2020).

1.4 Canídeos X Infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Atualmente, existem 35 espécies de canídeos, distribuídos em 12 gêneros (Sillero-Zubiri et al. 2004), sendo os gêneros *Atelocynus*, *Cerdocyon*, *Chrysocyon*, *Lycalopex* e *Speothos* endêmicos da América do Sul (Dias 2019). Das seis espécies de canídeos que ocorrem no Brasil, três delas ocorrem simpatricamente na maior parte do Cerrado brasileiro: lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (Juarez, Marinho-Filho 2002; Jácomo et al. 2004), sendo que esses canídeos também podem esporadicamente compartilhar áreas com cães domésticos. Baseado nas técnicas moleculares de comparação de sequências genéticas, verificou-se que o cão doméstico seria uma subespécie do lobo-cinza (*Canis lupus*), portanto, fora denominado *Canis lupus familiaris* (Wozencraft 1993), termo empregado atualmente.

Fatores como grandes áreas de deslocamento (incluindo sobreposição com diferentes espécies) e importante massa corporal que estes mamíferos apresentam são aspectos importantes para a dispersão e o fluxo de parasitas entre as espécies (Rocha et al. 2013; Iranzo et al. 2013). Além disso, apresentam uma dieta variada incluindo frutas, insetos e até mesmo pequenos mamíferos (Jácomo et al. 2004; Kotviski et al. 2019), que constituem oportunidades dos canídeos se infectarem através da predação (via oral), especialmente para o caso de *T. cruzi* (Jansen, Roque 2010; Rocha et al. 2013). Canídeos também são considerados importantes para estudo de monitoramento da infecção por tripanossomatídeos porque, no geral, apresentam vida longa e podem manter os parasitas por toda sua vida (Rocha et al. 2013).

Canídeos são hospedeiros de *T. cruzi* e *Leishmania* sp. nas Américas (Rocha et al. 2013; Roque, Jansen 2014). Raposa do campo, lobo-guará, cachorro-do-mato e

cachorro vinagre já foram encontrados com testes sorológicos e/ou qPCR positivos para *T. cruzi* (Rocha et al. 2013, Reis et al. 2020), e o isolamento do parasita foi obtido em duas raposas-do-campo provenientes de Cumari/GO, mesma área de estudo da presente tese (Rocha et al. 2013; Barros et al. 2017). O papel do cão doméstico como reservatório de *T. cruzi* é controverso, podendo ser importante reservatório no Chaco Argentino, Venezuela e sul dos Estados Unidos (Crisante et al. 2006; Gurtler et al. 2007; Kjos et al. 2008) ou apresentar-se infectado (sorologicamente positivos), mas raramente sendo infectivos ao vetor, como ocorre no Brasil (Herrera et al. 2005; Xavier et al. 2012). Neste caso, cães têm sido importantes como sentinelas da presença de um ciclo de transmissão silvestre (Castañera et al. 1998; Roque, Jansen 2008; Xavier et al. 2014).

Em relação à infecção por *Leishmania* spp., lobo-guará, cachorro-do-mato, cachorro-vinagre e raposa-do-campo já foram encontrados infectados, sendo o isolamento e caracterização realizado apenas em cachorro vinagre (*L. infantum*) e cachorro-do-mato (*L. infantum* e *L. amazonensis*) (Deane, Deane 1955; Courtenay et al. 1996; Figueiredo et al. 2008; Luppi et al. 2008; Souza et al. 2010). O cão doméstico é reconhecido como principal reservatório de *L. infantum* em áreas urbanas, devido ao contato próximo com humanos e a presença de alta carga parasitária na sua pele, característica que o torna infectivo para o vetor e responsável pela manutenção da transmissão desse parasita (Diniz et al. 2008; Nunes et al. 2016; Sevá et al. 2016; OPAS 2020). No entanto, cães domésticos também já foram encontrados infectados por pelo menos outras seis espécies de *Leishmania* (Dantas-Torres 2009; Madeira et al. 2003).

Embora os canídeos silvestres sejam geralmente considerados reservatórios de *L. infantum*, seu papel como reservatório desse parasita ainda não está claro. Das espécies de canídeos mais abundantes nas Américas, somente *C. thous* (em maior frequência) e *S. venaticus* são, de fato, potenciais reservatórios desse tripanossomatídeo (OPAS 2020). A susceptibilidade em desenvolver manifestações clínicas decorrentes da infecção por *L. infantum* já foi demonstrada em cachorro-vinagre e lobo-guará (Luppi et al. 2008; Malta et al. 2010), e no caso dos lobos-guarás também foi demonstrada uma possível capacidade infectiva (através do xenodiagnóstico), embora o sucesso de infecção nos vetores tenha sido baixo, indicando baixo potencial infectivo (Mol et al. 2015). A persistência da infecção ou

mesmo o potencial para infectar vetores, nunca foi observado em *L. vetulus* (OPAS 2020).

1.5 Bioma Cerrado e as interações Tripanossomatídeos-Hospedeiro-Ambiente

O Cerrado é o segundo maior ecossistema brasileiro e o segundo bioma mais rico em biodiversidade (Oliveira, Ratter 2002; Mittermeier et al. 2005), embora muitas espécies estejam ameaçadas de extinção (Marinho-Filho et al. 2002; Paula et al. 2013; Lemos et al. 2020). A conversão da vegetação natural em consequência da expansão da agricultura e da pecuária, tem levado à redução e fragmentação dos habitats nesse bioma (Klink, Machado 2005; Carvalho et al. 2009; Lemos, Facure, Azevedo 2011). Algumas áreas do Brasil Central, como no sudeste do estado de Goiás, têm sido intensamente impactadas por ações antrópicas, com cerca de 75% ou mais da vegetação original transformada em algum tipo de atividade humana para a produção, especialmente pastagens exóticas (*Urochloa* sp.) para o gado (Lemos, Facure, Azevedo 2011; Bickley et al. 2019). Apesar disso, a região ainda apresenta uma considerável diversidade de mamíferos, como canídeos, felídeos, procionídeos, pequenos mamíferos, entre outros. Os remanescentes naturais são caracterizados por um mosaico de fisionomias que variam de campos abertos a formação vegetal densa, que em algumas regiões apresenta influência do bioma Mata Atlântica (Lemos, Facure, Azevedo 2011). Esses impactos negativos no Cerrado têm levado, em alguns casos, a formação de agroecossistemas, constituídos de três subsistemas que interagem fortemente: os subsistemas produtivos, os habitats (semi)-naturais e os subsistemas humanos, compostos por assentamentos e infraestruturas (Moonem et al. 2008; Kazemi et al. 2018). Nesse contexto, os animais silvestres podem se aproximar das populações humanas e animais domésticos, consequentemente contribuindo para o aumento do contato e a possibilidade de *spillover* de parasitas entre eles (Otranto et al. 2015; Ramos et al. 2020). O fluxo de parasitas dos animais silvestres para os domésticos, e vice-versa, depende das variantes ecológicas específicas que caracterizam cada área e as vias de transmissão de parasitas inter-espécies são caracterizadas por teias complexas dentro e entre seus ecossistemas (Otranto et al. 2015; Thomas et al. 2000).

Pequenos mamíferos utilizam fragmentos florestais como habitat e, algumas espécies são mais adaptadas as áreas abertas, enquanto os canídeos silvestres são

mais versáteis quanto ao uso de diferentes habitats e tendem a utilizar fragmentos florestais como refúgio, especialmente as bordas. Em ambientes de transição entre áreas abertas e remanescentes florestais, pequenos mamíferos servem de fonte de alimento para muitos animais da ordem Carnivora, incluindo canídeos (Juarez, Marinho-Filho 2002; Jácomo et al. 2004; Kotviski et al. 2019). Pequenos mamíferos e canídeos também podem se expor a insetos vetores de parasitas devido ao uso de habitats onde esses insetos são encontrados (Eisenberg, Redford 1999; Dalponte, Courtenay 2004). Em áreas rurais, os cães são usados para vigiar as propriedades ou para companhia no campo e são também frequentemente usados para caça, onde a exposição a parasitas pode resultar do contato (incluindo encontros agonísticos com canídeos silvestres) ou consumo de animais silvestres (Brady 1979; Daszak et al. 2000; Butler et al. 2004; Thompson et al. 2009; Lemos et al. 2011; Lemos et al. 2013).

1.6 Ecologia da Paisagem e suas aplicações em estudos de infecção

O termo Ecologia da Paisagem foi mencionado pela primeira vez por Toll nos anos 40 (Turner, Gardner, O'Neill 2001) e surgiu pela influência de abordagens tanto geográficas quanto ecológicas (Forman, Godron 1986; Metzger 2001). Portanto, a Ecologia da Paisagem une os conhecimentos sobre ecologia de ecossistemas e geografia com aplicações ao planejamento e uso da terra, partindo do princípio de que a paisagem é formada por um mosaico (Naveh, Lieberman 1994). Segundo Metzger (2001), a paisagem é definida na abordagem ecológica como: uma área heterogênea composta por conjuntos de ecossistemas que interagem, um mosaico de relevos, tipos de vegetação e formas de ocupação; e estuda principalmente os efeitos da estrutura espacial da paisagem sobre os processos ecológicos.

Uma paisagem pode sofrer processos de fragmentação florestal tanto por processos naturais devido a fatores ambientais quanto originada por ações antrópicas, como a construção de ferrovias, rodovias, pastagens e urbanização (Machado 1995). O processo de desmatamento em áreas florestais leva a formação de fragmentos isolados que funcionam como "ilhas" de mata cercadas por habitats não florestados. Com base nisso, a ecologia da paisagem foi particularmente influenciada pela Teoria da Biogeografia de Ilhas, proposta por MacArthur, Wilson (1967), devido à analogia dos fragmentos florestais às ilhas oceânicas (Turner, Gardner, O'Neill 2001), no que diz respeito as relações entre padrões espaciais e processos ecológicos.

As consequências do processo de fragmentação florestal podem incluir redução no tamanho e conectividade dos ambientes, eliminação de espécies e perda da biodiversidade local (Shida, Pivello 2005; Haddad et al. 2015); redução das populações de algumas espécies que possuem elevados requisitos espaciais para alimentação e reprodução, isto é, menos tolerantes a perda de habitats (Shida, Pivello 2005; Massara 2009), bem como aumento populacional de outras espécies, que são beneficiadas pela degradação da paisagem (McKinney, Lockwood 1999; López-Cancino et al. 2015). Também pode aumentar a proximidade dos animais silvestres às populações humanas e animais domésticos, favorecendo a transmissão e troca de parasitas entre eles (Curi 2005).

Como a ecologia da paisagem avalia a relação entre padrões espaciais e processos ecológicos, a análise da fragmentação da paisagem requer uma abordagem espacial; para isso uma série de “métricas” ou “índices” de paisagem é utilizada. A dinâmica da paisagem pode ser interpretada através de métricas, que medem e descrevem a estrutura espacial dos fragmentos, classes de fragmentos ou da totalidade (Batista 2014). E os índices permitem a comparação entre paisagens, a identificação das principais diferenças e a determinação das relações entre os processos funcionais e os padrões das paisagens (Valente, Vettorazzi 2002). A grande variedade de índices pode ser agrupada em diferentes categorias, assim existem os índices de área, de densidade, de forma, de borda, de distância, de dispersão e de justaposição, por exemplo.

Um índice amplamente utilizado para cobertura vegetal é o NDVI (Índice de Vegetação por Diferença Normalizada) (Tucker 1979; Myneni 1995), e é formado pela divisão da diferença entre a refletância nas regiões espectrais do infravermelho próximo e vermelho pela soma da refletância nas mesmas duas bandas (Tucker 1979). O NDVI se correlaciona com diversos parâmetros biofísicos da vegetação, de modo que nos produtos das imagens NDVI as respostas de vegetação apresentam um máximo de reflectância em vegetação densa (florestas principalmente), máximo de absorção em locais desprovidos de vegetação (solo exposto, edificações) e comportamento intermediário em áreas relativamente vegetadas (Ponzoni, Shimabukuro 2007; Kariyeda, van Leeuwen 2011).

Em aplicações relacionadas a infecções, os estudos de Ecologia da Paisagem são particularmente importantes para a identificação e mapeamento do uso e cobertura da terra associada aos habitats e dinâmica populacional de hospedeiros,

vetores e/ou organismos e, facilita também a identificação de áreas de alto risco para infecções transmitidas por vetores (Hay, Lennon 1999; Wayant et al. 2010; Bhunia et al. 2012). Assim, quantificar características da paisagem pode ser importante para compreender padrões e quantificar o impacto de como os organismos são afetados pela fragmentação (Ricklefs 2006).

Kubacka et al. (2019) mostraram uma associação entre as características da paisagem, relacionadas à borda de fragmentos, com o parasitismo sanguíneo em aves migratórias que nidificam em um pântano aberto, demonstrando que a infecção por *Trypanosoma* sp. diminuiu com a área do núcleo do fragmento (*patch area core*) e aumentou com a densidade da borda do habitat. Esse tipo de abordagem colabora para apoiar medidas de conservação de espécies. Outro exemplo foi o trabalho realizado por Medeiros-Sousa et al. (2019) em uma Unidade de Conservação em São Paulo, que investigaram a relação entre as métricas da paisagem e as variações na abundância e acrodendrofilia (preferência por viver e se alimentar nas copas das árvores) de *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, principal vetor da malária humana e símia na Mata Atlântica. Essa espécie costuma ser abundante nas matas onde ocorre e, apesar da acrodendrofilia, alguns estudos observaram altas densidades dessas espécies próximas ao solo nas florestas. Desse modo, hipotetizaram que fatores associados às mudanças antropogênicas da paisagem podem ser responsáveis pela variação na abundância e acrodendrofilia observada em *An. cruzii*. Os resultados desse trabalho sugeriram que um aumento na proporção da cobertura florestal leva a um aumento na abundância desse mosquito, enquanto um aumento no comprimento total da borda da floresta leva a uma maior atividade desta espécie no solo. Embora os dados indiquem que as mudanças na paisagem devido às atividades humanas levam a uma redução na abundância desse vetor, tais mudanças podem aumentar a taxa de contato entre esta espécie e humanos que vivem nas bordas de fragmentos florestais onde *An. cruzii* é encontrado. Trabalhos com NDVI têm sido usados para ajudar a monitorar e prever ocorrências de várias doenças zoonóticas, transmitidas por vetores, incluindo a Malária e a Leishmaniose Visceral (Wayant et al. 2010; Bhunia et al. 2012). Wayant et al. (2010) fizeram uma análise espacial em duas áreas localizadas no Bioma Mata Atlântica no leste do Paraguai e mostraram que as áreas onde a cobertura do solo mudou, particularmente de floresta para não-floresta, estão mais bem correlacionadas com as taxas de casos de malária.

Conhecimento integrado entre as dinâmicas que envolvem parasitas (*T. cruzi* e *Leishmania* spp.), hospedeiros e suas relações com a ecologia da paisagem pode ser uma ferramenta poderosa para melhor compreender os ciclos de transmissão em que estão inseridos.

1.7 Justificativa

O presente estudo foi realizado na região do Limoeiro, sudeste de Goiás, uma área inserida em um ecótono entre Mata Atlântica e Cerrado, onde canídeos silvestres (cachorros do mato, raposas do campo e lobos guará) vêm sendo monitorados desde 2008 e diagnosticados sorologicamente positivos frente à infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., com isolamento de *T. cruzi* DTU TcIII em raposas.

Canídeos silvestres circulam nas fazendas do entorno com presença de cães domésticos, alguns dos quais acidentalmente capturados nas armadilhas para silvestres, incluindo relatos de encontros agonísticos entre eles. Além disso, canídeos também utilizam fragmentos florestais como refúgio, com presença de pequenos mamíferos, mostrando que esses animais provavelmente compartilham as mesmas áreas. Assim, analisar os encontros e as taxas de infecção em pequenos mamíferos, canídeos silvestres e domésticos, bem como suas interações sob uma ótica espaço-temporal, pode ajudar a entender o processo de dispersão desses parasitas na área. A hipótese dessa tese é de que a sobreposição espacial das espécies favorece o intercâmbio de parasitas entre esses animais, resultando em áreas mais intensas de transmissão. Os resultados foram publicados em dois artigos científicos publicados (Capítulos 1 e 2) e em um terceiro capítulo, com dados não publicados, e divididos em metodologia, resultados e perspectivas.

O primeiro capítulo, *Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in central Brazil: another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape* descreve a diversidade de tripanossomatídeos em pequenos mamíferos e discute sua associação com canídeos silvestres infectados que, possivelmente, compartilham as mesmas áreas;

O segundo capítulo, *Wild and domestic canids and their interactions in the transmission cycles of Trypanosoma cruzi and Leishmania spp. in an area of the Brazilian Cerrado*, é um estudo longitudinal que avalia as taxas de infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em canídeos silvestres e domésticos que co-

habitam o mesmo agroecossistema e as consequências da sobreposição espacial desses animais nos ciclos de transmissão e;

O terceiro capítulo, *Landscape Ecology Model in the Trypanosoma cruzi transmission cycle in wild canids and small mammals in Limoeiro region, Goiás state, Brazil*, avalia a infecção por *T. cruzi* em canídeos silvestres e pequenos mamíferos sob uma abordagem geoespacial, no intuito de inferir áreas mais intensas de transmissão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar, em um recorte espaço-temporal (2013-2017), os encontros e as interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos como fator de dispersão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do Cerrado brasileiro.

2.2 Objetivos Específicos

- (i) Caracterizar as espécies de tripanossomatídeos em amostras de pequenos mamíferos anteriormente diagnosticadas como positivas na área;
- (ii) Avaliar a taxa e o perfil da infecção por estes tripanossomatídeos em canídeos silvestres e domésticos;
- (iii) Discutir o papel dos canídeos silvestres e domésticos e suas interações nos ciclos de transmissão desses parasitas na área;
- (iv) Correlacionar métricas da paisagem e NDVI com a infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos silvestres da área de estudo;
- (v) Analisar as interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos no ciclo de transmissão de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. na área.

CAPÍTULO 1

Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in central Brazil: another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape




Elida Millena de Vasconcelos Brandão; Samanta Cristina das Chagas Xavier; Jeiel Gabrir Carvalhaes; Paulo Sérgio D'Andrea; Frederico Gemesio Lemos; Fernanda Cavalcanti Azevedo; Renata Cássia-Pires; Ana Maria Jansen and André Luiz Rodrigues Roque.

Artigo publicado na revista Pathogens (2019), 8, 1-17.

Doi: 10.3390/pathogens8040190

Article

Trypanosomatids in Small Mammals of an Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in an Anthropogenic Landscape

Elida M. V. Brandão ¹, Samanta C. C. Xavier ¹, Jeiel G. Carvalhaes ², Paulo S. D'Andrea ², Frederico G. Lemos ³ , Fernanda C. Azevedo ³ , Renata Cássia-Pires ⁴, Ana M. Jansen ¹ and André L. R. Roque ^{1,*} 

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040900, Brasil; elida_millena@hotmail.com (E.M.V.B.); samanta@ioc.fiocruz.br (S.C.C.X.); jansen@ioc.fiocruz.br (A.M.J.)

² Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040900, Brasil; jgabrir@yahoo.com.br (J.G.C.); dandrea@ioc.fiocruz.br (P.S.D.)

³ Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC)–Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás/Regional Catalão, Catalão, GO 75704020, Brasil; lemos.pcmc@gmail.com (F.G.L.); cavalcantifer@yahoo.com (F.C.A.)

⁴ Laboratório de Biologia de Parasitos, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59012570, Brasil; renatacapires@gmail.com

* Correspondence: roque@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-2562-1416; Fax: +55-21-2562-1609

Received: 25 September 2019; Accepted: 11 October 2019; Published: 14 October 2019



Abstract: We surveyed infection by *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* spp. in small wild mammals from Cumari, Goiás State aiming to investigate the diversity of trypanosomatid in a modified landscape of the Brazilian Cerrado (and possible infection overlapping with canids from the same area). Blood, skin, spleen, and liver samples were collected for parasitological, serological, and molecular assays. *Gracilinanus agilis* was the most abundant species ($N = 70$; 48.6%) and it was the only one with patent parasitemia. Characterization by mini-exon and 18SrDNA targets were achieved in 7/10 hemocultures with positive fresh blood examination, which confirmed the *T. cruzi* infection by Discrete Typing Units (DTU) TcI in single ($N = 2$) and mixed infections with other DTUs ($N = 5$). *T. rangeli* and *T. dionisii* were detected in skin fragments from *Didelphis albiventris* and *Oecomys cleberi*, respectively. *G. agilis* were found to be infected by *L. braziliensis* and *L. guyanensis*, while *Leishmania* sp. DNA was detected in the liver of *Oligoryzomys nigripes* and *Calomys expulsus*. Subpatent infection by *T. cruzi* and *Leishmania* sp. was serologically detected in 15% and 9% of the small mammal fauna, respectively. Small mammals from Cumari are included in *T. cruzi* and *Leishmania* spp. transmission cycles, showing a higher diversity of trypanosomatid species and/or genotypes than that observed in canids of the same agroecosystem.

Keywords: agroecosystems; Brazilian Cerrado; marsupials; rodents; canids; neotropical mammals; *Leishmania* sp.; *Trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Trypanosoma cruzi and *Leishmania* spp. (Trypanosomatida; Trypanosomatidae) are enzootic parasites that are maintained in the Americas by dozens of species of mammals and transmitted by hematophagous vector insects, triatomines from the Reduviidae family, and female sandflies from

Lutzomyia genus, respectively [1,2]. In humans, *T. cruzi* is the etiological agent of Chagas disease and six Discrete Typing Units (DTU) are currently recognized in this parasite: TcI to TcVI, besides Tcbat, a seventh DTU described in bats [3,4]. Despite proposed attempts to correlate *T. cruzi* subpopulations with host species, geographic distribution, and/or human disease, it has not yet been possible to detect any unequal association [5].

Leishmania spp. currently comprises more than 30 species, some of which are responsible for distinct clinical forms of human leishmaniasis as zoonotic diseases with high public health impact [6,7]. *Leishmania* species from mammals are divided into two subgenera: *L. (Leishmania)* and *L. (Viannia)*, which are grouped into eight monophyletic groups that correspond to so-called species complexes [8]. Seven of them: *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg*, and *L. guyanensis* contain species already described as infecting humans in Brazil [9–12]. Although knowledge of leishmaniasis has improved in recent decades, little is known regarding the spectrum of host species (mammals and vectors) of this parasite in nature [13].

The Cerrado is the second largest Brazilian ecosystem and the second richest savannah biome of the world, containing several endemic species [14,15]; however, it has been suffering human interventions as a result of increasing deforestation for agricultural and livestock occupation [16–18]. The destruction of ecosystems leads to habitat decline, food restriction, and, in some cases, species extinction, leading populations of wild mammals to areas that bring them into contact with humans and domestic animals [19]. It is known that canids may make long displacements, through different types of habitats, such as open areas, forests, and remnants, where small mammals are present and can serve as a food source for them [20,21]. Canids may also act as bio-accumulators of parasites, since they are top chain predators [5], and these factors favor the spread of parasites in the environment.

It is in this scenario that the Limoeiro region (Cumari Municipality, Goiás, Brazil) is located, an area of Cerrado quite anthropically altered, where the Mammals from Cerrado Conservation Program (PCMC) develops conservation actions that are focused on endangered species of mammals. In this area, wild canids, such as the hoary fox (*Lycalopex vetulus*), crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), and maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*), share the same areas with domestic species (e.g., dogs *Canis lupus familiaris* and cattle *Bos indicus*) and humans. Thus, PCMC has been joining multidisciplinary efforts to study aspects, such as ecology, genetics, and health of these animals. As a result of this work, infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp. in these wild canids has been diagnosed through serological assays, besides the isolation of *T. cruzi* DTU TcIII in hoary foxes [22,23]. Aiming to investigate the diversity of trypanosomatid species in the area (and possible infection overlaps among hosts from distinct taxa, as small mammals and canids), we surveyed the infection by *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* sp. in the small mammal fauna and discuss its association with wild canids that are infected in the same area. We demonstrated a higher diversity of trypanosomatid species and/or genotypes of *T. cruzi* in small mammals than that observed in canids. We concluded that small mammals from Cumari are immersed in the transmission cycles of *T. cruzi* and *Leishmania* spp. and share, at least, one *T. cruzi* DTU (TcIII) with canids from the same area, showing overlapping transmission cycle among wild canids and small mammals.

2. Results

2.1. Small Mammal Fauna Composition

One hundred and forty-four small mammals were captured during the four expeditions between 2013 and 2015, totaling a capture success of 2.8% per trap/night. The number of captured specimens was higher in the dry season ($n = 106$; 73.6%) than in the wet season ($n = 38$; 26.4%) ($p = 0.0001$). The abundance of species of marsupials and rodents was similar ($p > 0.05$), with 74 marsupials (51.4%) and 70 rodents (48.6%) being captured. A greater richness of rodents than marsupials was registered for dry seasons ($p = 0.016$), whereas no difference was detected for wet seasons. The marsupial *Gracilinanus agilis* was the most abundant species to be captured ($n = 70$; 48.6%) (Table 1).

Table 1. Small mammals captured at Limoeiro Region, Municipality of Cumari, Goiás, Brazil, between 2013 and 2015.

| Order | Species | Expedition | | | |
|--|----------------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | 1st Dry and Cold | 2nd Wet and Hot | 3rd Dry and Cold | 4th Wet and Hot |
| Rodentia | <i>Calomys tener</i> | 6 | - | 2 | - |
| | <i>Calomys expulsus</i> | 6 | - | 24 | - |
| | <i>Rhipidomys macrurus</i> | 2 | 2 | 3 | 2 |
| | <i>Hylaeamys megacephalus</i> | 1 | 1 | 2 | - |
| | <i>Oligoryzomys mattogrossae</i> | 1 | - | - | - |
| | <i>Oecomys cleberi</i> | 1 | 1 | 7 | 6 |
| | <i>Necomys lasiurus</i> | - | - | 1 | - |
| | <i>Oligoryzomys nigripes</i> | - | - | 2 | - |
| | Total rodents | 17 | 4 | 41 | 8 |
| Didelphimorphia | <i>Gracilinanus agilis</i> | 17 | 1 | 30 | 22 |
| | <i>Didelphis albiventris</i> | - | 2 | 1 | 1 |
| | Total marsupials | 17 | 3 | 31 | 23 |
| Total of captures ($n = 144$)/expedition ($n = 4$) | | 34 | 7 | 72 | 31 |

The ratio of sampling effort in the understory and ground strata was 1600 and 3600, respectively, corresponding to 80 understory traps and 180 ground traps for five nights each excursion ($N = 4$). Capture success was 79 small mammals captured in the understory (5%) and 65 captured in the ground stratum (1.8%). Species, such as *G. agilis*, *D. albiventris*, *O. cleberi*, *R. macrurus*, and *C. tener* were also captured in the understory. Thus, out of a total of 106 animals captured of these species, 79 were collected in the understory stratum, which represented 74.5% of the captured of these species.

2.2. Trypanosomatid Infection

One hundred and forty-two specimens were examined by fresh blood examination, and 10 (7%) of them (all *G. agilis*) were positive for the presence of flagellates. Of 233 hemocultures that were obtained from 129 small mammals, only one was positive, but it was not established. This culture was derived from one *G. agilis* also positive in fresh blood examination.

We successfully characterized, by the Mini exon assay, the sediment from seven cultures of the positive samples in fresh blood examination. These were characterized as single infection by *T. cruzi* TCI ($N = 3$) or mixed infection TCI/Z3 (Zymodeme 3) ($N = 4$). The four-mixed infection samples TCI/Z3 were submitted to PCR-RFLP of H3/AluI and two of them were characterized as DTU TcIV (Table 2).

The 18SrDNA nested PCR in all seven samples confirmed *Trypanosoma cruzi* infection. Of three samples that were characterized as TcI by the mini-exon assay, two confirmed the same DTU and one was identified as TcII, which suggested a mixed infection. Two samples that were suggestive of *T. cruzi* TcIV were previously characterized as mixed infection by DTUs TcI/TcIV in PCR/RFLP assay. Of the two samples that were characterized as TcI/Z3 in the Mini exon and they were not further characterized by PCR-RFLP of H3/AluI, one was suggestive of infection by TcIII or TcV and another was shown to be infected by *T. cruzi* TcII, also suggesting a mixed infection (Table 3).

From 363 skin, spleen, and liver cultures, two skin cultures from a *D. albiventris* and an *O. cleberi* were positive. Similarity analysis of PCR products for the 18S rDNA gene confirmed the infection by, respectively, *T. rangeli* (MN381027-100% identity and 99% coverage) and *T. dionisii* (99.5% identity and 100% coverage), although, in the latter case, it was not possible to make a consensus sequence and parasite identification was based on only one sequence (Table 2).

Molecular diagnosis by kDNA-PCR resulted in four positive samples, all of them in liver fragments that were derived from *Calomys expulsus* ($N = 1$), *Oligoryzomys nigripes* ($N = 1$), and *G. agilis* ($N = 2$). These samples were submitted to PCR targeting HSP70 (234 base pairs) and only the two *G. agilis* samples were amplified, being identified as *L. (V.) braziliensis* (MN395479-99.6% identity and 96% coverage) e *L. (V.) guyanensis* (97.7% identity and 98% coverage). In this latter case, it was not possible to make a consensus sequence and parasite identification was based on only one sequence (Table 2).

Table 2. Parasitological and molecular diagnosis of captured small mammals at Cumari, Goiás, Brazil.

| Expeditions/Captured Animals | 1st Expedition/34 | 2nd Expedition/7 | 3rd Expedition/72 | | | 4th Expedition/31 |
|--|--|--------------------------|---|--|------------------------------|--|
| Fresh blood examination | 3 | 1 * | 3 | | | 3 |
| Hemoculture | - | 1 * | - | | | - |
| Skin, spleen or liver culture | - | - | 2 SKINS | | | - |
| Positive parasitological/molecular diagnosis | - | - | - | | | 4 LIVERS |
| Parasite identification | TcI (n = 2) and TcI/Z3 (Discrete Typing Unit - DTU TcIII/IV) (n = 1) | TcI (n = 1) | Blood: TcI/TcIV (n = 2) TcI/Z3 (DTU TcIII/IV) (n = 1) | Skin: <i>T. rangeli</i> (n = 1) <i>T. dionisii</i> (n = 1) ** | Blood: Not amplified (n = 3) | Liver: <i>Leishmania</i> spp. (n = 2) <i>L. braziliensis</i> (n = 1) <i>L. guyanensis</i> (n = 1) ** |
| Mammal species | <i>G. agilis</i> (n = 3) | <i>G. agilis</i> (n = 1) | <i>G. agilis</i> (n = 3) | <i>Didelphis albiventris</i> (<i>T. rangeli</i>) <i>Oecomys cleberi</i> (<i>T. dionisii</i>) | <i>G. agilis</i> (n = 3) | <i>C. expulsus</i> and <i>O. nigripes</i> (n = 2) <i>Leishmania</i> spp.) <i>G. agilis</i> (<i>L. braziliensis</i> and <i>L. guyanensis</i>) |

* Same mammal host. ** It was not possible to make a consensus and the identification of parasite was based only on the reverse sequence.

Table 3. Comparison of results between mini-exon and 18S rDNA molecular targets, for characterization of *Trypanosoma cruzi* infection from hemoculture sediments whose fresh blood examination was positive.

| ID of Sample | Mini Exon/Restriction Fragment Length Polymorphism Results | Similarity to genBank Sequences by the 18S rDNA Target (Coverage/Identity—%) * |
|---------------|--|--|
| LBCE 15978 | DTU TcI | <i>T. cruzi</i> TcI-Reverse Stranded: 96/78.86% |
| LBCE 15979 | DTU TcI/Z3 | <i>T. cruzi</i> TcIII/TcV-Reverse Stranded: 100/83.65% |
| LBCE 15980 | DTU TcI | <i>T. cruzi</i> TcI-Forward Stranded: 95/86.11% |
| LBCE 18574 | DTU TcI | <i>T. cruzi</i> TcI-Reverse Stranded: 99/95.64% |
| LBCE 18583 ** | DTU TcI/TcIV | <i>T. cruzi</i> TcII-Foward Stranded: 97/76.38% |
| LBCE 18584 ** | DTUTcI/TcIV | <i>T. cruzi</i> TcIV-Forward Stranded: 100/68.03% |
| LBCE 18586 ** | DTU TcI/Z3 | <i>T. cruzi</i> TcIV-Reverse Stranded: 98/73.19% |
| | | <i>T. cruzi</i> TcIV-Forward Stranded: 99/72.20% |
| | | <i>T. cruzi</i> TcIV-Reverse Stranded: 93/74.26% |
| | | <i>T. cruzi</i> TcII-Reverse Stranded: 100/100% |

* Note: The sequences were analyzed in the BioEdit (Atlanta, GA, USA) and SeqMan (Madison, WI, USA) programs and compared to GenBank sequences only through the Somewhat Similar Sequences (Blastn) tool (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), except for LBCE 15979 and LBCE 15980 samples, that it was possible to obtain results from the Megablast (Highly similar sequences). ** These animals were also positive for *Trypanosoma lainsoni* in blood clot samples [24].

2.3. Serological Diagnosis

Serology was performed in serum samples of 55 rodents (78.5% of the captured rodents), with 5.4% ($N = 3$) infected by *T. cruzi* and 3.6% ($N = 2$) for *Leishmania* spp. From the 74 captured marsupials, serology was performed on 68 of them (91.9%), presenting an infection rate of 14.7% ($N = 10$) and 2.9% ($N = 2$) for *T. cruzi* and *Leishmania* spp., respectively. Mixed infection was observed in 5.4% ($N = 3$) between rodents and 8.8% ($N = 6$) among marsupials, as shown in Table 4. Serological diagnosis provides information on a later infection when compared to molecular tests, which indicates that the host had become infected at some point in his life with the parasite, producing IgG class antibodies. This occurs despite the current presence of parasite's DNA, which is unequivocally demonstrated by the molecular tests, indicating the presence of the parasite in that host.

Table 4. Percentage of positivity in the Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) test for *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. and mixed infection in small mammals (rodents and marsupials) per expedition.

| Infection by | 1st Expedition | | 2nd Expedition | | 3rd Expedition | | 4th Expedition | |
|-----------------------------------|----------------|--------------|----------------|-------------|----------------|--------------|----------------|------------|
| | Rodents | Marsupials | Rodents | Marsupials | Rodents | Marsupials | Rodents | Marsupials |
| <i>T. cruzi</i> (Positive) | 1/7 (14.3%) | 4/14 (28.6%) | 1/4 (25%) | 2/3 (66.7%) | 1/37 (2.7%) | 4/30 (13.3%) | 0/7 (0%) | 0/20 (0%) |
| <i>Leishmania</i> spp. (Positive) | 0/7 (0%) | 1/14 (7.1%) | 0/4 (0%) | 0/3 (0%) | 2/37 (5.4%) | 1/30 (3.3%) | 0/7 (0%) | 0/20 (0%) |
| Mixed infection | 2/7 (28.6%) | 3/14 (21.4%) | 0/4 (0%) | 1/3 (33.3%) | 1/37 (2.7%) | 2/30 (6.6%) | 0/7 (0%) | 0/20 (0%) |

3. Discussion

We demonstrated the small mammal fauna of the Limoeiro region and the most abundant species were *Gracilinanus agilis*, *Calomys expulsus*, *Oecomys cleberi*, and *Rhipidomys macrurus*. We observed *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis albiventris*, *Oecomys cleberi*, *Rhipidomys macrurus*, and *G. agilis*, with the latter being the only species that displayed patent parasitemia and in which a distinguished diversity of DTUs was detected. We found other trypanosomatid species (*T. rangeli*, *T. dionisii*, *Leishmania braziliensis*, and *L. guyanensis*) in *D. albiventris*, *O. cleberi*, *C. expulsus*, and *G. agilis* showing a higher diversity of trypanosomatids in small mammals ($n = 9$) than that observed in wild canids ($n = 2$) of the same area [23,24].

On the ecology of the fauna studied, the higher number of small mammals captured in the dry seasons is probably due to greater availability of food in the rainy season, decreasing the effectiveness of baits and, consequently, capture probability [25,26]. Additionally, in the rainy season, most rodent and marsupial populations have few adults and many young, an age class generally less captured in bait traps [27,28]. Previous studies in the Cerrado, have detected a high density of rodents during the dry season [29,30], as registered at Limoeiro region, Cumari, most probably because some rodent species present breeding peaks in the rainy season, which leads to an increase in populations during the dry season [26,31]. The fourth expedition (wet and hot season) was marked by a capture rate that is similar to the first, probably because the environment could still be influenced by the end of the previous rainy season, which was prolonged in that year (2015). The significant increase in capture rate in the third expedition (dry and cold season) can also be explained by an atypical pluviometric index in the middle of 2014, which might have altered the natural reproductive dynamics of the extant small fauna.

Patent parasitemia by *T. cruzi* (flagellates in the fresh blood examination and DNA of parasite in hemocultures) were only observed in *G. agilis* (7/70 = 10%), which indicates their competence to infect vectors or other mammals, the last through predation [32]. DNA amplification was not possible for other three samples with flagellates in fresh blood examination. This can be explained, because it is a DNA-poor material (hemoculture sediment), which makes it difficult to recover.

G. agilis was infected by DTU TcI in both single and mixed infections with DTUs TcII, TcIII/TcIV, TcIV, and TcIII/TcV, corroborating that DTU TcI is the genotype most widely dispersed in nature [33,34]. Herein, we provided the first record of DTU TcII in *G. agilis* in the Cerrado biome, as well as of DTUs

TcIII and TcIV in this species, showing that DTUs are more widespread both geographically and concerning their host ranges.

DTU TcII is also a widely distributed genotype and it has been found to infect several mammalian taxa in distinct habitats and biomes [35–37]. Although DTUs TcIII and TcIV are widely distributed and may infect a wide variety of mammals, they appear to occur at significantly lower rates, most likely because they are maintained in very low parasitemia in nature, which hampers their detection [23,32]. Although classically associated to armadillos [38,39], *T. cruzi* TcIII has also proved to be able to infect wild rodents, marsupials, carnivores, and artiodactyls, as well domestic dogs [5,23]. Previous long-term carnivore monitoring studies in the same area (Limoeiro Region, Cumari) registered two hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) that were infected by *T. cruzi* DTU TcIII [22,23], which indicate the putative share of these DTUs between small mammals and canids of the same area. Finally, it is important to clarify that the finding of TcIII/TcV does not necessarily indicate mixed infection, once 18SrDNA sequences are not useful to separate hybrid genotypes, as is the case of TcV.

We used 18SrDNA target to confirm the results that were obtained by the mini-exon and this approach was useful to: (i) confirm four of the seven results observed in the mini-exon assay; (ii) clarify the DTU of one of the samples infected by Z3 genotype; and, (iii) demonstrate two mixed infections not detected in the mini-exon assay. Thus, 18S rDNA confirmed the infection by *T. cruzi* in all samples positive in the mini-exon assay, although it was not possible to obtain sufficient good quality sequences to make consensus in any of the samples, because it is a DNA-poor material (hemoculture sediment), resulting in sequences presenting not high coverage and identity values. Even if the mini-exon is no more considered as a reliable method for characterizing *T. cruzi* genotypes, it was useful in this case where the material investigated was poor in DNA, probably due to the higher number of copies in the DNA when compared to 18S rDNA target. We confirmed the majority of the DTUs for both targets, except for two samples: one positive for TCI/Z3 and another positive for TCI in the mini-exon, both being characterized as *T. cruzi* DTU TcII by 18S rDNA. This result might indicate a mixed infection by distinct *T. cruzi* genotypes. Moreover, a study using blood clots from these same samples detected *T. lainsoni* DNA (a parasite not detectable in the culture medium used) in the *G. agilis* that were infected by DTU TcI/Z3 [24] demonstrated a polyparasitism by *Trypanosoma* spp. in this specimen.

Our work also contributed to the first finding of *Trypanosoma rangeli* in skin cultures. However, the finding of *Trypanosoma dionisii* must be cautiously analyzed because identification was based on only one sequence of 360 nucleotides. However, once confirmed, this finding also represents the first encounter of this parasite in skin culture, reporting a broader spectrum of tissues that these parasites can be detected in mammals. In fact, in addition to *Trypanosoma caninum* detected in dog's skin samples, the ability of other trypanosomatid species, such as *T. cruzi* and *T. brucei*, to infect the skin has already been demonstrated [40–42]. This is a factor that can explain the transmission of these parasites to vectors, even in the absence of detectable parasitemias. The findings of these two trypanosomatids in the skin suggest that they are: (i) most probably derived from skin microvessels; or, (ii) could be colonizing skin cells, since it is known that *T. dionisii* can invade mammalian cells [43,44]. About *T. rangeli*, little is known of its life cycle in mammal hosts, but it has already been found colonizing an unorthodox site (bone marrow) [45,46], so that the colonization of both parasites in the skin cannot be ruled out. These findings may partially explain the transmission mechanism in the absence of high parasitemias. In addition to our findings, [24] evaluated infection by trypanosomatids in blood clots of 33 out of 70 *G. agilis* captured in the same area, identifying the infection by several species of *Trypanosoma*, including *T. dionisii* and *T. rangeli*, showing a larger spectrum of *Trypanosoma* species circulating in the area that were not found in canids [23,24].

Regarding *Leishmania* spp. infection in small mammals, there is only one previous record of infection by *L. (V.) braziliensis* in *G. agilis*, also in the Brazilian Cerrado (at Minas Gerais state) [47]. However, this is the first report of infection by this parasite in liver samples of this marsupial. Moreover, our work contributes to the finding of *L. (V.) guyanensis* in *G. agilis*, although other marsupial species have already been found to be infected by this parasite [48,49], which suggests that, in addition

to other marsupials, *G. agilis* is also able to maintain a richness of trypanosomatids. Our register also represents a new geographical area for the distribution of *L. (V.) guyanensis*, never before registered to the Brazilian Cerrado.

In the Americas, more than 40 species of mammals were already described as hosts of *Leishmania* parasites [50]; however, only a minority of them act as reservoirs, being a source of infection to phlebotomine sand fly vectors; and, thereby, contributing to the dispersion of *Leishmania* [13,47]. On the other hand, regarding *Leishmania* infection through the predation of infected mammals, although the oral route has not yet been demonstrated, it is known that amastigotes are capable of infecting mammals, and this is a route that cannot yet be ruled out to occur in nature [51,52].

In addition to *G. agilis*, the Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) detected infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp. in a broader range of local hosts than detected by the other methods, which complements the enzootic scenario by identifying infected individuals that were probably not infective to vectors at that moment (undetectable parasitemia) [32].

It is worth mentioning that most of the *G. agilis* that were infected by *T. cruzi* were captured in the understory stratum; however, these marsupials also circulate in the soil, which might favor contact with possible predators. A positive correlation was already demonstrated between *T. cruzi* infection rates and the proportion of mammals and insects in the diet of wild Carnivores [22], oral transmission being consistently suggested as the main mechanism of dispersion of the parasite among wild mammals [5,53]. In the specific case of *G. agilis*, this marsupial species represents less than 5% of the diet of wild canids (*C. thous*, *C. brachyurus*, and *L. vetulus*). This indicates that canids in the Limoeiro region do not frequently consume this marsupial [21], especially in the case of hoary fox, which was the species with the highest *T. cruzi* infection rates in the area. On the other hand, it is worth mentioning that one-time consumption of an infected animal is enough for the canid to become infected during its whole life, especially when considering that the lifetime of canids is about four or five times longer than that of small mammals, which increases the chances of being infected. On the other hand, rodents are consumed at much higher frequencies by the three canine species and they are constantly seen on pastures, areas widely used by these canids [21]. However, the intense heating that could favor death of small mammals inside the traps and the abundance of cattle were factors that impaired our sampling in this environment. For this reason, and knowing that wild canids rarely enter forested habitats, preferring edges of forest fragments and/or open areas of Cerrado [21], transects to capture small mammals were installed at the edges of fragments, or near fragments, and this might have increased the chance of capturing arboreal species, such as *G. agilis*.

G. agilis has biological and ecological characteristics that favor its exposure to the different transmission cycles of these parasites. This marsupial species presents an omnivorous diet that includes insects [54]; share refuges (such as tree or rocky holes) with triatomines or other insect vectors, besides exploring different forest strata. *G. agilis* is a representative of the Didelphidae family whose species are considered some of the oldest and most important trypanosomatid reservoirs, already considered as *T. cruzi* bioaccumulators, due to their ability to host an expressive diversity of trypanosome species [55]. Except for the rare cases of coprophagism and cleptophagism, triatomines become infected while feeding on an infected mammal, for example, an infected *G. agilis*. Besides the contaminative (*T. cruzi*) or inoculative (*Leishmania* spp.) route, the predation of infected small mammals or infected triatomines that acquired the infection by blood-sucking of infected small mammals seems to be the most likely route of *T. cruzi* infection for canids, revealing that small mammals and canids in that area are participating from the same transmission cycle of *T. cruzi*. Thus, the small mammals from Cumari are immersed in the transmission cycles of *T. cruzi* and *Leishmania* spp. and they share, at least, one *T. cruzi* DTU (TcIII) with wild canids from the same area. In addition, small mammals showed a higher diversity of *Trypanosoma* spp., as well as of *T. cruzi* genotypes, than observed in canids.

The complexity of the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in nature involves different components that change over time and space. Therefore, being able to study, in the same area, different elements of wildlife that maintain these parasites in nature provide us with

complementary information that helps to have a broader understanding. Multidisciplinary work such as this has as its primary objective to contribute to the conservation of mammal species in anthropized areas, and their impacts on human and/or animal health

4. Materials and Methods

4.1. Study Area

The study area (Figure 1) comprises private cattle farms of the Limoeiro region, in the municipality of Cumari (18°22.02' S, 48°5.48' W), southeast of Goiás State, Brazil. Most of the area (75%) has been altered by human activities and it is mostly covered by exotic pasture (*Urochloa* sp.). Patches of original vegetation (Atlantic Forest and Cerrado), such as gallery and semi-deciduous forests, represent the remaining 25% [56]. The climate in the region has two well-marked seasons, one hot and wet and another cold and dry [57]. We focused on the end of the seasons, also considering rainy periods when they exceed the wet season, to define the collection period. Captures were performed in: (i) August 2013; (ii) April 2014; (iii) September 2014; and, (iv) June 2015. Mean annual temperature and rainfall vary between 22–25 °C and 1600–1800 mm, respectively (data from Center for Weather Forecast and Climate Studies (CPTEC), National Institute for Space Research (INPE)).

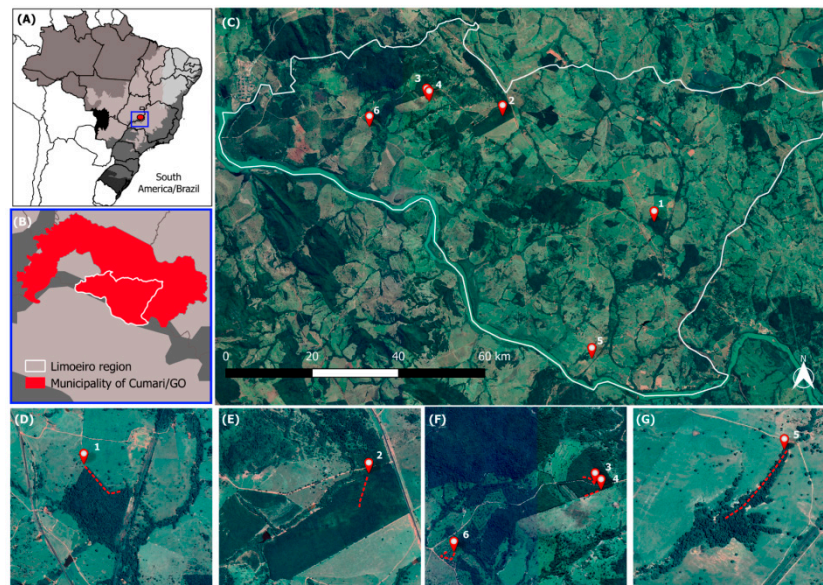


Figure 1. Study area located in the Limoeiro region, municipality of Cumari, southeast of Goiás State, Brazil (A–C), formed by private cattle farms with forest remnants where small mammals were captured. Figures (D–G) show the arrangement of the six transects (1 to 6) at the edges of forest remnants.

4.2. Small Wild Mammal Capture and Identification

Small mammals were captured in six transects of 20–40 trap points each, while using live traps (Tomahawk Live Traps, Tomahawk, WI, USA and Sherman-H. B. Sherman Traps, Tallahassee, FL, USA). The traps were disposed at 10 m intervals during five consecutive nights, alternately distributed both in the ground and understory strata, and baited with a mixture of banana, peanut butter, oat, and bacon or sardines [44]. The transects were placed in areas of riparian and semi-deciduous forests known to be partially used by wild canids (Figure 1). The points of capture of the small mammals were georeferenced through the Global Positioning System receiver (GPS-Montana 650 Garmin®), with World Geodetic System 84 (WGS 84) as the geodetic reference. The total capture effort was 1300 trap-nights/expedition (totaling 5200 trap-nights during four expeditions). The ratio between sampling effort in the understory and ground strata was 1600/3600 traps, respectively, corresponding

to 80 traps in the understory and 180 traps on the ground. Whenever a small mammal was captured, the trap was identified, placed in a plastic bag, and then transported to the field laboratory.

The identification of specimens was based on external and cranial morphological characters and on karyological analyses [58]. Euthanized mammals were deposited as vouchers specimens in the Mammal Collection of the National Museum from Rio de Janeiro Federal University (UFRJ), Brazil.

Field Procedures

The captured small mammals were anesthetized with an intramuscular injection of Ketamine (10–30 mg/kg) associated with: (i) acepromazine (5–10mg/kg) for rodents (9:1); or, (ii) xylazine (2 mg/kg) for marsupials (1:1). Blood samples were collected by cardiac puncture for parasitological and serological analysis, as follows: fresh blood examination, hemoculture, and centrifugation to obtain serum.

The fresh blood examination was carried out with a drop of approximately 5 µL of blood between slide and coverslip. For hemoculture, it was inoculated 0.6–0.8 mL of blood from each animal in two tubes (0.3–0.4 mL each) containing Novy-Neal-Nicolle (NNN) medium with Liver Infusion Tryptose (LIT) overlay [22]. Serum was stocked at –20 °C for serology assay after blood centrifugation. Priority was given to hemoculture when insufficient blood volume was obtained.

All of the animals were euthanized while using Potassium Chloride 19.1% by intracardiac route. Samples of skin, spleen, and liver were collected in tubes containing absolute ethanol for Polymerase Chain Reaction (PCR) or sterile saline (sodium chloride-NaCl at 58.44 g/mol) with antibiotics and antifungals (10 mg streptomycin, 25 µL amphotericin B, and 10,000 IU penicillin per mL, Sigma® commercial solution) for culture. After being stored at 4 °C for 24 h in this solution, tissue fragments were transferred to culture tubes containing NNN medium and Schneider liquid medium [59].

4.3. Infection Diagnosis Procedures

Fresh blood examinations were analyzed in the field laboratory while using an optical microscope at 400× magnification. Hemocultures were examined every 15 days up to five months [22], while tissue cultures were examined every four days up to two months. Positive tissue cultures and/or hemocultures that were derived from mammals positive in the fresh blood examination (even when negative during the hemoculture examination) were centrifuged for sediment formation and then incubated with proteinase K and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). In this case, the genomic DNA was extracted with the standard phenol-chloroform method [60].

A serological survey for the detection of anti-*T.cruzi* and anti-*Leishmania* IgG antibodies was performed while using an Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) [61]. Antigens used in the reaction to *T. cruzi* were an equal mixture of parasites that were derived from the strains M000/BR/1974/F90 (TcI) and MHOM/BR/1950/Y (TcII), obtained from the Collection of Trypanosoma from Wild and Domestic Mammals and Vectors (COLTRYP) of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ - Rio de Janeiro-RJ/Brazil). Antigens used in *Leishmania* surveys were an equal mixture from the stains MHOM/BR/1975/M2903 (*L. braziliensis*-IOC/L566) and MHOM/BR/1974/PP75 (*L. infantum*-IOC/L579) obtained from the Leishmania Collection from Oswaldo Cruz Institute (CLIOC-FIOCRUZ/RJ).

Serum of Cricetidae rodents were tested with a commercial anti-hamster IgG conjugate (FITC, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), whereas marsupials' sera were tested while using intermediary anti-IgG antibodies for *Didelphis aurita* in rabbits [62]. The reaction was revealed while using an anti-rabbit IgG antibody that was conjugated with fluorescein (Sigma, St Louis, MO, USA). Cutoff values adopted were 1:40 for marsupials and 1:10 for rodents [63].

4.4. Molecular Diagnosis and Characterization

Two techniques were used for the molecular characterization of flagellates that were derived from hemocultures. The first one was the Multiplex PCR to amplify the non-transcribed spacer of the mini-exon gene [64]. When positive, the samples were then submitted to the Nested PCR of the

variable region of the trypanosome 18S rDNA gene [65,66]. Only the last technique was applied to positive skin cultures.

Multiplex PCR were employed, aiming to amplify the non-transcribed spacer of mini-exon gene for the identification of subtypes TCI (Discrete Typing Units-DTU TcI-200 pb), TCII (DTUs TcII/TcIV/TcV-250 pb), Z3 (DTUs TcIII/TcIV-150 pb), and *Trypanosoma rangeli* (100 pb) [67], as well as mixed infections. Positive samples for Z3 were further amplified by PCR for the histone 3 (H3) gene [68], followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis after digestion by the AluI enzyme for discrimination of TcIII and TcIV [44].

The nested PCR of the variable region of the trypanosome's 18S rDNA gene consists of two rounds: one that amplifies a larger region of the target, using 16 pmol/μL of the primers: TRY927F5' GAAACAAGAAACACGGGAG' and TRY927R-5'CTACTGGGCAGCTTGGA3', and another where the amplified product of this first round is diluted 1:5 in sterile deionized water and employed in the second round with 16 pmol/μL of the internal primers: SSU561F 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3' and SSU561R 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3' [65,66].

Electrophoresis of PCR products were carried out in a 2% agarose gel, stained with GelRed-Biotium, and then visualized under UV light. Each reaction included sterile distilled water instead of DNA as a negative control and positive control samples from *T. cruzi* strains that represent the DTUs [22,69].

Tissue fragments that were collected in absolute ethanol were re-hydrated with Nuclease-free water and the DNA extraction was carried out while using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's recommendations. PCR were performed using the pureTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), and primers directed to the conserved region of the *Leishmania*-kDNA mini circle were: forward: 5'-GGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' and reverse: 5'-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3' [70,71]. The positive and negative controls were derived from spleen and liver fragments from infected (*Leishmania braziliensis*-IOC-L2483) and non-infected hamsters that were provided by the animal facilities of the FIOCRUZ/RJ. The PCR products were visualized after electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and silver stained while using a specific kit (DNA Silver Staining, GE Healthcare). Positive samples were submitted to another PCR directed to the variable region of the gene coding for the Heat Shock 70 protein (HSP70), a fragment of 234 base pairs, using the following primers (5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3') and (5'-TCCTTCGACGCCTCTGGTTG-3') [70,72]. Samples from this latter target were submitted to purification using DNA purification kit (GE HealthCare Life Sciences, UK) and following the manufacturer's instructions.

The sequencing reaction was performed while using the BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, USA) and then applied to the ABI3730 DNA analyzer automatic sequencer (Applied) in the Sequencing Platform (RPT01A) of the FIOCRUZ/RJ. The editing and construction of the sequences were performed with the SeqMan-DNA Star Program and the consensus sequences were aligned and edited with the BioEdit Version v7.1.11. Sequence analysis for species identification was performed by similarity that was obtained through Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm against sequences available on GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

4.5. Statistical Analysis

Statistical comparisons between the richness and abundance of small mammal species, richness and abundance of species per season, and capture success per seasons were performed using binomial tests on BioEstat 5.0 software (Mamirauá Institute/ Manaus, Amazonas state, Brazil), and a significance level of 5% was adopted.

4.6. Ethics Statement

The handling of the animals was performed according to the biosafety standards established by the Biosafety Commission of the Oswaldo Cruz Institute, IOC/FIOCRUZ following protocols that were

approved by the Oswaldo Cruz Foundation's Ethics Committee on Animal Use (LW81/12). Capture and euthanasia of wild animals was licensed under SISBIO (13373-1).

4.7. Map Construction

For the map construction, the study area and the trailing points of the captured small mammals were visualized in a Geographic Information System (GIS) in the Quantum GIS software version 2.18, using the continental, national, and municipal boundaries of the study area, extracted from the open access cartographic base of Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). Google Earth Satellite images (QGIS QuickMapServices plugin) were also used.

Author Contributions: Conceptualization, E.M.V.B., F.G.L., F.C.A., A.M.J. and A.L.R.R.; formal analysis, E.M.V.B. and S.C.C.X.; funding acquisition, P.S.D., A.M.J. and A.L.R.R.; investigation, E.M.V.B., S.C.C.X., J.G.C., F.G.L., F.C.A., R.C.-P., A.M.J. and A.L.R.R.; methodology, P.S.D., F.G.L., F.C.A., A.M.J. and A.L.R.R.; project administration, A.L.R.R.; Resources, P.S.D., F.G.L., F.C.A., A.M.J. and A.L.R.R., supervision, A.L.R.R.; visualization, E.M.V.B.; writing—original draft, E.M.V.B.; writing—review & editing, E.M.V.B., S.C.C.X., J.G.C., F.G.L., F.C.A., R.C.-P., A.M.J. and A.L.R.R.

Funding: The study was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (PAPES VII-401764/2015-0) to ALRR and fellowship to EMVB. AMJ and ALRR are “Cientista” and “Jovem Cientista” do Nosso Estado”, respectively, provided by Faperj and are financially supported by CNPq (“Bolsista de Produtividade”). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We want to thank all drivers (FIOCRUZ) and personnel (PCMC) involved in field logistics. The authors also thank Mozart Caetano de Freitas-Junior (PCMC), Camila Lúcio (LABPMSR-IOC), Vitor Araújo, Bruno Alves (LABTRIP/FIOCRUZ/IOC) and Artur Augusto Neto (LAOCLIN DERMZOO/INI/FIOCRUZ) for their invaluable help during fieldwork and collection of animals. We would also like to thank Carlos Ruiz Ardé and Marcos Antônio dos Santos Lima for their technical support in the cultures. Marlon Silva for image editing, as well as André Pereira, Viviane Xavier and Ana Kamilla da Cruz for technical support in the serological exams. We thank Daniele Bilac, Camila Lopes, Maria Augusta Dario, Cristiane Varella, Alice Berbigier, Suellen Sanches and Fernanda Alves for their support in the techniques of mini-exon and 18S rDNA PCR. We are also grateful to Juliana Barros and Marina Rodrigues for the support with their analysis of the sequences and to PDTIS/Fiocruz sequencing platform.

Conflicts of Interest: The authors declare they have no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *Leishmaniasis: Background Information. A Brief History of the Diseases*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2009.
2. Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Domestic and wild mammalian reservoir. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease—100 Years of Research*, 2nd ed.; Telleria, J., Tibayrenc, M., Eds.; Elsevier: London, UK, 2010; pp. 249–276.
3. Zingales, B.; Andrade, S.G.; Briones, M.R.; Campbell, D.A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A.M.; Machado, C.R.; et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2009**, *104*, 1051–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marcili, A.; Lima, L.; Cavazzana, M.; Junqueira, A.C.; Veludo, H.H.; Maia Da, S.F.; Campaner, M.; Paiva, F.; Nunes, V.L.; Teixeira, M.M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* **2009**, *136*, 641–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jansen, A.M.; Xavier, S.C.D.C.; Roque, A.L.R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors.* **2018**, *6*, 502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brasil. Ministério da Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde*; Editora do Ministério da Saúde: Brasília, Federal District, Brazil, 2006; 120p.
7. Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; Kuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Asp. Med.* **2017**, *57*, 1–29. [[CrossRef](#)]
8. Fraga, J.; Montalvo, A.M.; de Doncker, S.; Dujardin, J.C.; Van der Auwera, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* **2010**, *10*, 238–245. [[CrossRef](#)]

9. Silveira, F.T.; Souza, A.A.A.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Braga, R.R.; Ishikawa, E.A.Y. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region: Natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania lainsoni* in Pará State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1991**, *86*, 127–130. [[CrossRef](#)]
10. Rangel, E.; Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*; Editora da Fiocruz: Rio de Janeiro, Brasil, 2006; p. 360.
11. Lainson, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: Uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev. Pan-Amaz. Saúde.* **2010**, *2*, 13–32.
12. Cantanhêde, L.M.; Mattos, C.B.; Ronconi, C.S.; Filgueira, C.P.B.; Silva Júnior, C.F.S.; Limeira, C.; Silva, H.P.J.; Ferreira, G.E.M.; Porrozzi, R.; Ferreira, R.G.M.; et al. First report of *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region. *Parasite* **2019**, *26*, 1–5. [[CrossRef](#)]
13. Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2014**, *3*, 251–262. [[CrossRef](#)]
14. Oliveira-Filho, A.T.; Ratter, J.T. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of Neotropical Savanna*; Oliveira, P.S., Marquis, R.J., Eds.; Columbia University Press: New York, NY, USA, 2002; pp. 91–120.
15. Mittermeier, R.A.; Gil, R.P.; Hoffman, M.; Pilgrim, J.; Brooks, T.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B. *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*, 2nd ed.; University of Chicago Press: Boston, MA, USA, 2005; p. 200.
16. Klink, C.A.; Machado, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv. Biol.* **2005**, *19*, 707–713. [[CrossRef](#)]
17. Carvalho, F.M.V.; Marco-Júnior, P.; Ferreira, L.G. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. *Biol. Cons.* **2009**, *142*, 1329–1403. [[CrossRef](#)]
18. Paglia, A.P.; Fonseca, G.A.B.; Rylands, A.B.; Herrmann, G.; Aguiar, L.M.S.; Chiarello, A.G.; Leite, Y.L.R.; Costa, L.P.; Siciliano, S.; Kierulff, M.C.M.; et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. In *Occasional Papers in Conservation Biology*, 2nd ed.; Conservação Internacional: Belo Horizonte, Brasil, 2012; p. 88.
19. Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 191–193.
20. Facure, K.G.; Giaretta, A.A.; Monteiro-Filho, E.L.A. Food habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous*, in an altitudinal forest of the Mantiqueira Range, southeastern Brazil. *Mammalia* **2003**, *67*, 503–511. [[CrossRef](#)]
21. Kotviski, B.M.; Giaretta, K.G.F.; Azevedo, F.C.; Freitas-Junior, M.C.; Lemos, F.G. Trophic niche overlap and resource partitioning among wild canids in an anthropized neotropical ecotone. *J. Neotrop. Mamm.* **2019**, in press.
22. Rocha, F.L.; Roque, A.L.R.; de Lima, J.S.; Cheida, C.C.; Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Arrais, R.C.; Bilac, D.; Herrera, H.M.; Mourão, G.; et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67463. [[CrossRef](#)]
23. Barros, J.H.S.; Xavier, S.C.C.; Bilac, D.; Lima, V.S.; Dario, M.A.; Jansen, A.M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Trop.* **2017**, *172*, 173–179. [[CrossRef](#)]
24. Rodrigues, M.S.; Lima, L.; Xavier, S.C.C.; Herrera, H.M.; Rocha, F.L.; Roque, A.L.R.; Teixeira, M.M.G.; Jansen, A.M. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2019**, *8*, 171–181. [[CrossRef](#)]
25. Maclearn, D.; Kohler, J.; McGowan, K.J.; Cedeño, E.; Carbone, L.G.; Miller, D. Arboreal and Terrestrial Mammal Trapping on Gigante Peninsula, Barro Colorado Nature Monument, Panama. *Biotropica.* **1994**, *26*, 208–213. [[CrossRef](#)]
26. Santos-Filho, M.; Silva, D.J.; Sanaiotti, T.M. Variação sazonal na riqueza e na abundância de pequenos mamíferos, na estrutura da floresta e na disponibilidade de artrópodes em fragmentos florestais no Mato Grosso, Brasil. *Biota Neotrop.* **2008**, *8*, 115–121. [[CrossRef](#)]
27. Vieira, M.V. Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of Southeast Brazil. *Rev. Bras. Biol.* **1996**, *57*, 99–107.
28. Quental, T.B.; Fernandez, F.A.S.; Dias, A.T.C.; Rocha, F.S. Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *J. Trop. Ecol.* **2001**, *17*, 339–352. [[CrossRef](#)]
29. Mello, D.A. Estudo populacional de algumas espécies de roedores do Cerrado (Norte do Município de Formosa, Goiás). *Rev. Bras. Biol.* **1980**, *40*, 843–860.

30. Alho, C.J.R.; Strüssmann, C.; Volpe, M.; Sonoda, F.; Marques, A.A.B.; Schneider, M.; Santos Junior, T.S.; Marque, S.R. *Conservação da Biodiversidade da Bacia do Alto Paraguai—Monitoramento da Fauna Sob Impacto Ambiental*; Editora UNIDERP: Campo Grande, Brasil, 2003; p. 449.
31. Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. *Mamíferos do Brasil*; Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina: Paraná, Brasil, 2006; p. 439.
32. Jansen, A.M.; Xavier, S.C.D.C.; Roque, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* **2015**, *151*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Miles, M.A.; Llewellyn, M.S.; Lewis, M.D.; Yeo, M.; Baleela, R.; Fitzpatrick, S.; Gaunt, M.W.; Mauricio, I.L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitology* **2009**, *136*, 1509–1528. [[CrossRef](#)]
34. Zingales, B.; Miles, M.A.; Campbell, D.A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A.M.; Teixeira, M.M.; Schijman, A.G.; Llewellyn, M.S.; Lages-Silva, E.; Machado, C.R.; et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12*, 240–253. [[CrossRef](#)]
35. Shikanai-Yasuda, M.A.; Carvalho, N.B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 845–852. [[CrossRef](#)]
36. Lima, V.S.; Xavier, S.C.C.; Maldonado, I.F.R.; Roque, A.L.R.; Vicente, A.C.P.; Jansen, A.M. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE.* **2014**, *9*, e116137. [[CrossRef](#)]
37. Herrera, C.P.; Licon, M.H.; Nation, C.S.; Jameson, S.B.; Wesson, D.M. Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. *Parasit Vectors* **2015**, *8*, 123. [[CrossRef](#)]
38. Miles, M.A.; Povia, M.M.; de Souza, A.A.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ketteridge, D.S. Chagas's disease in the Amazon Basin: Ii. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para' State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *75*, 667–674. [[CrossRef](#)]
39. Lisboa, C.V.; Xavier, S.C.; Herrera, H.M.; Jansen, A.M. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet. Parasitol.* **2009**, *165*, 19–24. [[CrossRef](#)]
40. Madeira, M.F.; Almeida, A.B.; Barros, J.H.; Oliveira, T.S.; Sousa, V.R.; Alves, A.S.; Miranda, L.F.; Schubach, A.O.; Marzochi, M.C. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: Aspects of natural infection. *J. Parasitol.* **2014**, *100*, 231–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Capewell, P.; Cren-Travaillé, C.; Marchesi, F.; Johnston, P.; Clucas, C.; Benson, R.A.; Gorman, T.A.; Calvo-Alvarez, E.; Crouzols, A.; Jouvion, G.; et al. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *eLife* **2016**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lewis, M.D.; Francisco, A.F.; Jayawardhana, S.; Langston, H.; Taylor, M.C.; Kelly, J.M. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. *Sci Rep.* **2018**, *1*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Oliveira, M.P.; Cortez, M.; Maeda, F.Y.; Fernandes, M.C.; Haapalainen, E.F.; Yoshida, N.; Mortara, R.A. Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: Invasion, intracellular growth and nuclear localization. *Acta Trop.* **2009**, *110*, 65–74. [[CrossRef](#)]
44. Dario, M.A.; Rodrigues, M.S.; Barros, J.H.; Xavier, S.C.; D'Andrea, P.S.; Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 477. [[CrossRef](#)]
45. De Araújo, V.A.; Boité, M.C.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology* **2013**, *140*, 455–460. [[CrossRef](#)]
46. Stoco, P.H.; Talavera-López, C.W.G.; Gerber, A.; Zaha, A.; Thompson, C.E. Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–17. [[CrossRef](#)]
47. Quaresma, P.F.; Rego, F.D.; Botelho, H.A.; da Silva, S.R.; Moura Junior, A.J.; Neto, R.G.T.; Madeira, F.M.; Carvalho, M.B.; Paglia, A.P.; Melo, M.N.; et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *105*, 579–585. [[CrossRef](#)]

48. Arias, J.R.; Naiff, R.D.; Miles, M.A.; de Souza, A.A. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *75*, 537–541. [[CrossRef](#)]
49. Dedet, J.P.; Gay, F.; Chatenay, G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989**, *83*, 613–615. [[CrossRef](#)]
50. Oliveira, F.S.; Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P.; Pacheco, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* **2005**, *129*, 219–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Spotin, A.; Parvizi, P. Comparative study of viscerotropic pathogenicity of *Leishmania major* amastigotes and promastigotes based on identification of mitochondrial and nucleus sequences. *Parasitol. Res.* **2015**, *115*, 1221–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lainson, R.; Ishikawa, E.A.Y.; Silveira, F.T. American visceral leishmaniasis: Wild animal hosts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 630–663. [[CrossRef](#)]
53. Roque, A.L.R.; Xavier, S.C.; da Rocha, M.G.; Duarte, A.C.; D’Andrea, P.S. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 742–749. [[CrossRef](#)]
54. Lessa, L.G.; Costa, F.N. Diet and seed dispersal by five marsupials (Didelphimorphia, Didelphidae) in a Brazilian cerrado reserve. *Mamm. Biol.* **2010**, *75*, 10–16. [[CrossRef](#)]
55. Roman, F.; Iñiguez, A.M.; Yeo, M.; Jansen, A.M. Multilocus sequence typing: Genetic diversity in *Trypanosoma cruzi* I (TcI) isolates from Brazilian didelphids. *Parasit Vectors* **2018**, *11*, 107. [[CrossRef](#)]
56. Lemos, F.G. Ecologia e Conservação da Raposa-do-Campo (*Lycalopex vetulus*) e Suas Interações com Canídeos Simpátricos em Áreas Antropizadas de Cerrado do Brasil Central. Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil, 2016.
57. Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Moraes Gonçalves, J.L.; Sparovek, G. Koppen’s climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* **2013**, *22*, 711–728. [[CrossRef](#)]
58. Bonvicino, C.R.; Otazu, I.B.; D’andrea, P.S. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenet Genome Res.* **2002**, *97*, 200–204. [[CrossRef](#)]
59. Campos, M.P.; Silva, D.A.; Madeira, M.F.; Júnior, A.A.M.V.; Figueiredo, F.B. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* **2013**, *3*, 424–426. [[CrossRef](#)]
60. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 1989; p. 1626.
61. Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **1966**, *8*, 227–235.
62. Jansen, A.M.; Moriearty, P.L.; Castro, B.G.; Deane, M.P. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: An indirect fluorescent antibody test for the diagnosis and follow-up of natural and experimental infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1985**, *79*, 474–477. [[CrossRef](#)]
63. Roque, A.L.; Xavier, S.C.; Gerhardt, M.; Silva, M.F.; Lima, V.S.; D’Andrea, P.S.; Jansen, A.M. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Vet. Parasitol.* **2013**, *193*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fernandes, O.; Santos, S.S.; Cupolillo, E.; Mendonca, B.; Derre, R.; Junqueira, A.C.V.; Santos, L.C.; Sturm, N.R.; Naiff, R.D.; Barret, T.V.; et al. A Mini exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *95*, 97–99. [[CrossRef](#)]
65. Noyes, H.A.; Stevens, J.R.; Teixeira, M.; Phelan, J.; Holz, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binney* in the platypus and *Trypanosoma sp.* in wombats and kangaroos in Australia. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 331–339. [[CrossRef](#)]
66. Smith, A.; Clark, P.; Averis, S.; Lymbery, A.J.; Wayne, A.F.; Morris, K.D.; Tompson, R.C. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitology* **2008**, *135*, 1329–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Aliaga, C.; Breniere, S.F.; Barnabe, C. Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, 1155–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Westenberger, S.J.; Barnabe, C.; Campbell, D.A.; Sturm, N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* **2005**, *171*, 527–543. [[CrossRef](#)]
69. Dario, M.A.; Moratelli, R.; Schwabl, P.; Jansen, A.M.; Llewellyn, M.S. Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 1–15. [[CrossRef](#)]
70. Degrave, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1994**, *89*, 463–469. [[CrossRef](#)]
71. Cássia-Pires, R.; Boité, M.C.; D’Andrea, P.S.; Herrera, H.M.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)]
72. Graça, G.C.; Volpini, A.C.; Romero, G.A.S.; Neto, M.P.O.; Hueb, M.; Porrozi, R.; Boité, M.C.; Cupolillo, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2012**, *107*, 664–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO 2

Wild and domestic canids and their interactions in the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian Cerrado


Elida Millena de Vasconcelos Brandão; Samanta Cristina das Chagas Xavier; Fabiana Lopes Rocha; Caio Felipe Motta Lima; Ízis Zanini Candeias; Fernanda Cavalcanti Azevedo; Frederico Gemesio Lemos; Ana Maria Jansen and André Luiz Rodrigues Roque.

Artigo publicado na revista *Pathogens* (2020), 9, 818.

Doi: 10.3390/pathogens9100818

Article

Wild and Domestic Canids and Their Interactions in the Transmission Cycles of *Trypanosoma Cruzi* and *Leishmania* spp. in an Area of the Brazilian Cerrado

Elida M. V. Brandão¹, Samanta C. C. Xavier¹, Fabiana L. Rocha^{2,3}, Caio F. M. Lima^{3,4}, Ísis Z. Candeias^{3,5}, Frederico G. Lemos^{3,6}, Fernanda C. Azevedo^{3,6}, Ana M. Jansen¹ and André L. R. Roque^{1,*} 

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil; elida_millena@hotmail.com (E.M.V.B.); samanta@ioc.fiocruz.br (S.C.C.X.); jansen@ioc.fiocruz.br (A.M.J.)

² Centro de Ciências Aplicadas e Educação, Campus IV Litoral Norte, Universidade Federal da Paraíba, Rio Tinto, PB 58297-000, Brazil; lopesrocha.fabiana@gmail.com

³ Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, Catalão, GO 75704-020, Brazil; mvcaiomotta@gmail.com (C.F.M.L.); izdc@hotmail.com (Í.Z.C.); lemos.pcmc@gmail.com (F.G.L.); cavalcantifer@yahoo.com (F.C.A.)

⁴ Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

⁵ Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

⁶ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Catalão, Catalão, GO 75704-020, Brazil

* Correspondence: roque@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-2562-1416

Received: 17 September 2020; Accepted: 3 October 2020; Published: 6 October 2020



Abstract: *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. are parasites that infect multiple hosts including canids, considered bioaccumulators of parasites. Deforestation in the Cerrado biome has resulted in the exposure of wild canids to anthropized areas, where they may establish ecological and epidemiological relationships with domestic dogs. We evaluated the infection by trypanosomatids in canids from a Cerrado agroecosystem between 2013 and 2017. Samples of wild canids (blood, bone marrow and skin) and dogs (blood) were collected for parasitological, serological and molecular diagnosis. A total of 414 samples from wild ($n = 131$) and domestic ($n = 283$) canids were collected, including recaptures. We obtained five positive hemocultures from *Lycalopex vetulus* ($n = 2$), *Cerdocyon thous* ($n = 1$) and dogs ($n = 2$), all characterized as *T. cruzi* TcIII/V (18S rDNA) and TcIII/V/VI (gGAPDH); one positive skin fragment for *Leishmania* sp. (*C. thous*), one positive skin culture (*Chrysocyon brachyurus*) and one positive fresh blood examination from a dog. Infection by *T. cruzi* and *Leishmania* spp. was serologically confirmed in 18% and 4% of the canids, respectively. Active transmission was attested by seroconversion events and occurred despite the low rate of positive parasitological assays. Wild and domestic canids infected by both parasites were detected sharing the same areas, pointing to a possible spillover of parasites among them.

Keywords: agroecosystems; Brazilian Cerrado; *Cerdocyon thous*; *Lycalopex vetulus*; *Chrysocyon brachyurus*; *Canis lupus familiaris*; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania* spp.; Neotropical mammals

1. Introduction

Vertebrate trypanosomatid parasites are transmitted by hematophagous invertebrates, and among the different genera included in the Trypanosomatidae family, *Trypanosoma* and *Leishmania* are the most studied due to their public health importance [1]. Most of these species are described as mandatory heteroxenic; presenting enzootic or zoonotic life cycles and being transmitted, respectively, by insect

vectors from orders Hemiptera (Reduviidae, Triatominae) and Diptera (Psychodidae, Phebotominae). *Trypanosoma* and *Leishmania* are parasites characterized by high genetic, biochemical and molecular diversity, which partly explains their expressive biological plasticity, which until now represents an open question. *Trypanosoma cruzi* and at least the most prevalent *Leishmania* species from Brazil (*Leishmania infantum*, *L. braziliensis* and *L. amazonensis*) are defined as multi-host parasites due to their ability to infect hundreds of mammalian species in the wild [2,3]. They have complex life cycles, often modulated by the trophic relationships of the associated taxa.

Neotropical wild canids comprise poorly studied taxa in terms of their possible role in the transmission cycle of *T. cruzi* and *Leishmania* spp. in nature. Six canid species occur in different Brazilian biomes: the short-eared dog *Atelocynus microtis*, the bush dog *Speothos venaticus*, the maned-wolf *Chrysocyon brachyurus*, the crab-eating fox *Cerdocyon thous*, the pampas fox *Lycalopex gymnocercus* and the hoary fox *Lycalopex vetulus* [4]. Except for *A. microtis* and *L. gymnocercus*, the other species are widely observed in the Brazilian savannah biome, the Cerrado, with *L. vetulus* being an endemic species of this ecosystem [5,6]. Most of them are omnivorous, including in their diet a wide variety of items of animal origins and fruits, both vertebrate and invertebrate [5,7–9]. Occupying high levels in the trophic net, for preying on mammals, lizards, snakes, frogs and insects, wild canids can be considered bioaccumulators of parasites, especially those that may be orally transmitted such as *T. cruzi*. Members of the Canidae family may be long-lived and may maintain the infection by trypanosomatid parasites during their whole life, being considered excellent study models for following up natural infections [10].

Despite the great richness and wide distribution of wild canids in the Americas, there are few studies on Trypanosomatid infection in these animals. Canids are hosts of at least two genera of trypanosomatids in the Americas: *Trypanosoma* and *Leishmania* [2,3]. Wild canids infected by *T. cruzi* were observed by serological tests [10], and parasite isolation has already been registered for hoary foxes [10,11]. The possible vector-borne transmission of *T. cruzi* among maned wolves and *Leishmania* sp. infection of several mammal taxa maintained in a Brazilian zoo were recently reported [12]. Still concerning infection by *Leishmania* spp., four wild canid species have already been found serologically infected, and *L. infantum* isolation was obtained in one bush dog and *L. infantum* and *L. amazonensis* in crab-eating foxes [13–15]. Domestic dogs *Canis lupus familiaris* are recognized as the main reservoir of *L. infantum*, although they have also been found infected by at least six other *Leishmania* species [16]. Its role as a *T. cruzi* reservoir varies in different regions: may be important reservoirs in the Argentine Chaco, Venezuela and the southern United States [17–19] or present itself infected (serologically positive), but rarely being infectious to the vector, as occurs in Brazil. In this case, dogs have been important as sentinels of the parasitosis [20].

In general, wild canid species are known to explore large areas and different habitats [4], important aspects for the dispersion of multi-host parasites. These traits, together with the growing reduction of natural habitats, have been pressing wildlife to increasingly use human-altered landscapes, where animals may cohabit more intimately with domestic dogs, favoring ecological and epidemiological relations, including parasite's spillover [21,22]. This is a common scenario in the Brazilian Cerrado, an ecosystem that has been suffering high negative anthropic impact, leading, in some cases, to the establishment of agroecosystems [23,24]. Agroecosystems consist of three intermingled and strongly interacting sub-systems: the managed fields, referred to as the productive sub-system; the semi-natural or natural habitats surrounding them and the human sub-system composed of settlements and infrastructures [24]. In some areas of Central Brazil, as in the municipality of Cumari, Goiás, a region such as Limoeiro has about 75% or more of the original vegetation already transformed by any sort of human activity for production, especially exotic pastures (*Urochloa* sp.) for cattle. However, it is not known to what extent this modification and closer contact between wild and domestic canids impact parasite transmission.

Since 2008, wild canids in this area have been captured and monitored as part of a long-term research and conservation program [25]. Individuals of hoary foxes, crab-eating foxes and maned

wolves have been diagnosed positive for trypanosomatid infection [10]. Serological tests demonstrated that the three canid species present in Limoeiro region were infected by *T. cruzi* and/or *Leishmania* spp., and *T. cruzi* DTU (Discrete Typing Unit) TcIII was also isolated from two *L. vetulus* [10,11]. In this region, domestic dogs are owned by the cowboys who live on the farms and these animals stay loose and use the area in a manner usually unknown by their owners [26]. Thus, domestic dogs and wild canids share the same areas and reports of agonistic encounters are not exceptional [27,28]. In this paper, we conducted a longitudinal study to evaluate the rate and pattern of infection by trypanosomatids in wild and domestic canids that co-inhabit the same agroecosystem, discussing the consequences of the spatial overlapping for transmission cycles.

2. Results

One hundred and eleven wild canids of the species *C. thous* ($N = 72$), *L. vetulus* ($N = 29$) and *C. brachyurus* ($N = 10$) were captured between 2013 and 2017. During the same period, there were 20 recaptures (15%), including four animals that were recaptured more than once, totaling 131 sampling events (Table 1).

Table 1. Wild canids captured (2013–2017) and domestic canids sampled (2014–2016) at Limoeiro Region, municipality of Cumari, Goiás, Brazil.

| Canids | Scientific Names | Sampling Events | Number of Individuals | Total of Recaptures | Recaptured Individuals | Individuals Recaptured More Than Once |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Domestics | <i>Canis lupus familiaris</i> | 283 | 187 | 94 | 66 | 28 |
| | <i>Cerdocyon thous</i> | 78 | 72 | 6 | 5 | 1 |
| Wild | <i>Lycalopex vetulus</i> | 42 | 29 | 13 | 10 | 3 |
| | <i>Chrysocyon brachyurus</i> | 11 | 10 | 1 | 1 | 0 |
| Total wild canids | | 131 | 111 | 20 | 16 | 4 |

Samples from 187 different domestic dogs were collected between 2014 and 2016. A total of 96 dogs were evaluated in 2014, 88 in 2015 and 99 in 2016, totaling 283 sampling events. From those, 94 sampling events (33%) were performed in 66 dogs that were previously evaluated, including 28 of them that were sampled in the three study-years (Table 1). There was a replacement rate of 59% from 2014 to 2015 and 36% for the following period.

2.1. Trypanosomatid Infection

We obtained five positive hemocultures, all of them characterized as *T. cruzi*, derived from *L. vetulus* ($N = 2$), *C. thous* ($N = 1$) and *C. l. familiaris* ($N = 2$), as shown in Table 2. One skin culture from a *C. brachyurus* (LBT 11484), captured in 2014, was positive for flagellates, but the culture was not established, and the parasite characterization was not possible. Other skin fragment preserved in ethanol from a *C. thous* (LBT 11465), captured in 2013, was positive for *Leishmania* spp. kDNA (kinetoplast deoxyribonucleic acid), but negative in all the reactions performed targeting HSP70 (Heat Shock 70 protein) and ITS1 (Internal transcribed spacer region 1) primers. No bone marrow culture or fresh blood examination from wild canids was positive. Only one fresh blood examination from a domestic dog (LBT 7163), captured in 2014, was positive for flagellates, but the hemoculture was negative.

Table 2. Parasitological and molecular diagnosis of positive hemocultures derived from wild and domestic canids from Cumari, Goiás, Brazil.

| Species | Year of Capture | LBT Number | COLTRYP Number | Molecular Target and <i>T. cruzi</i> Genotypes | | GenBank Sequences Access Number |
|-------------------------------|-----------------|------------|----------------|--|------------|---------------------------------|
| | | | | 18S rDNA | gGAPDH | |
| <i>Lycalopex vetulus</i> | 2013 | LBT 11477 | 00537 | TcIII/V | TcIII/V/VI | MT705719 MT892929 |
| <i>Lycalopex vetulus</i> | 2014 | LBT 6948 | CP | TcIII/V | N.I. | MT678509 |
| <i>Cerdocyon thous</i> | 2016 | LBT 7984 | CP | TcIII/V | N.A. | MT678510 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | 2016 | LBT 7202 | 00723 | TcIII/V | TcIII/V/VI | MT705720 MT892930 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | 2016 | LBT 8600 | CP | TcIII/V | N.A. | MT678511 |

COLTRYP, Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores; COLTRYP/Fiocruz (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ/Brazil); 18S rDNA, Small subunit ribosomal DNA; gGAPDH, Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; C.P., Culture Pellet; N.I., Not identified; N.A., Not amplified.

All samples that were positive in hemocultures were identified as *T. cruzi* DTU TcIII/TcV by the 18S rDNA gene. Of these samples, amplification by the gGAPDH target was possible for only two of them, corresponding to cultures with parasite isolation (PP) and were characterized as *T. cruzi* DTUs TcIII/V/VI (Table 2). This may be because gGAPDH is present in a lower number of copies in the genome than the 18S target, which would decrease the chances of amplification. Because these molecular targets are not able to separate hybrid genotypes from their parental ones, the DTUs involved are grouped in the same branch of the phylogenetic tree (Figure 1). We did not observe double peaks on the electropherogram of our sequences, indicative of co-infection, and after all alignment procedures, no significant differences in nucleotides that could clarify the genotype(s) involved were observed. However, as cellular cloning or Whole Genome Sequence was not performed, we cannot rule out the possibility of hybridization event in these samples, or even co-infection with different *T. cruzi* DTUs.

The tree was inferred by maximum likelihood using the Kimura 2-parameter model with a gamma-distributed rate of variation among sites (K2P + G) for 18S rDNA (= K80 + G, nomenclature used by the phyML program) and the General Time Reversible model of substitution with invariant sites (GTR + I) for gGAPDH, with bootstrapping at 1000 replicates.

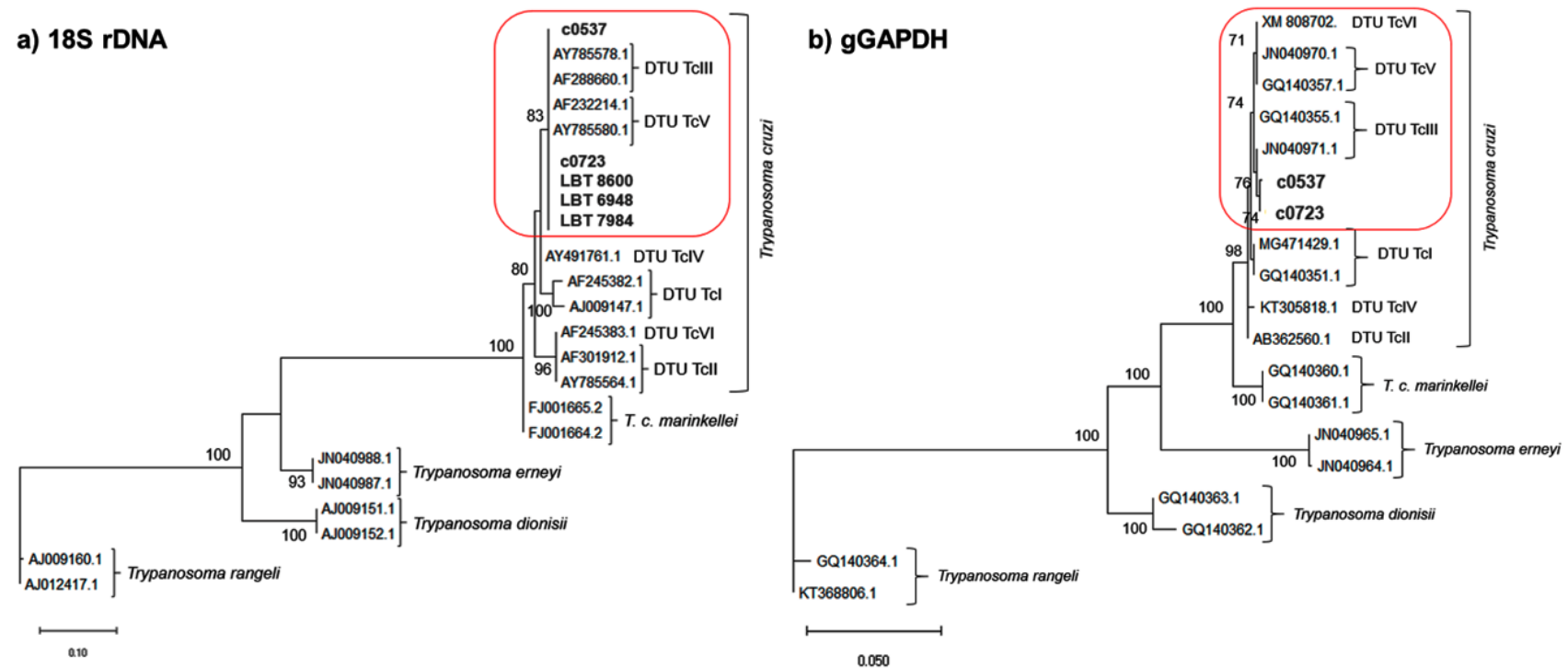


Figure 1. Phylogenetic analysis of (a) 18S rDNA (small subunit ribosomal gene) and (b) gGAPDH (glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene) sequences from positive hemocultures from wild and domestic canids captured in the Limoeiro region, Cumari, Goiás, Brazil. Red boxes were used to highlight our sequences grouped with the reference sequences identified as TcIII/V DTUs for 18S and TcIII/V/VI for gGAPDH, reinforcing that it is not possible to separate the hybrid genotypes through the molecular targets used. Three of them are sequences from culture sediment (parasite DNA from cultures that were positive at some point, but that did not establish: LBTs 8600; 6948 and 7984) and 2 (c0537 → LBT 11,477 and c0723 → LBT 7202) are pure cultures, available at Coltryp (Coleção de Trypanosoma de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores). The culture sediments did not amplify in the gGAPDH Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.2. Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.

Twenty-five (32%) *C. thous* and twenty (47.6%) *L. vetulus* were positive for *T. cruzi* and/or *Leishmania* spp., either in simple or mixed infections. Two (18.2%) *C. brachyurus* were positive only for *T. cruzi* (Table 3). One of the maned wolves (LBT 11484), which had positive skin culture, was serologically positive for *T. cruzi*, with a serological titer (Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT)) of 1/160. *L. vetulus* was the species that presented largest number of positive individuals (especially for *T. cruzi*), and *C. thous* was the species with higher serological infection rates for *Leishmania* sp. infection. Forty-two (14.8%) domestic dogs were also positive for *T. cruzi* and/or *Leishmania* spp. in simple or mixed infections (Table 3).

All canids (wild and domestic) positive on parasitological and/or molecular assays were also positive on serological tests, except by one *C. thous* that was positive in the *Leishmania* kDNA-PCR in skin sample, but negative on serological tests. Most *T. cruzi*-positive canids had serological titers at the cut-off point, whereas most *Leishmania* spp. infections presented a titer of 1/80. Among them, domestic dogs presented higher titers for *T. cruzi*, ranging from 1/40 to 1/2560, while *C. thous* presented higher for *Leishmania* spp., ranging from 1/40 to 1/320 (Table 3). Of the total of canids infected with *Leishmania* spp., four of them were diagnosed as *L. infantum*, due to the positivity in the TR DPP® (Rapid Test for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis, BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) test: one *C. thous* and three domestic dogs.

The year 2014 was the only in which seropositivity was not observed for *Leishmania* spp. infection in wild canids (Table 4). Considering the expeditions to collect samples from domestic dogs, 2015 was the year in which the highest number of dogs seropositivity for *Leishmania* spp. infection ($N = 6$) was observed, although the majority was mixed infection with *T. cruzi* ($N = 5$) (Table 4).

Of the 10 recaptured *L. vetulus*, five remained positive (*Leishmania* spp. ($N = 1$) and *T. cruzi* ($N = 4$)), three seroconverted for *T. cruzi* infection, and two remained negative. Of the four hoary foxes that remained seropositive for *T. cruzi* throughout recaptures, one had been diagnosed as a mixed infection (1/160 and 1/80 for *T. cruzi* and *Leishmania* spp., respectively), but the following year maintained seropositivity only for *T. cruzi*, with the same serological titer.

Of five *C. thous* recaptured, two remained positive for *T. cruzi* (one of them presented as a mixed infection, with a titer of 1/40 for both parasites, and the following year remained positive only for *T. cruzi* (1/80)), one individual seroconverted for *Leishmania* spp. infection and two remained negatives. The only maned wolf recaptured remained seronegative (Table 4).

Of 66 resampled domestic dogs, serum samples were obtained from 61. From these, seven remained positive for *T. cruzi* since first collection (among them, one that presented as a mixed infection with a 1/40 serological titer for both parasites in 2015, in the following year it maintained only *T. cruzi* infection with an equal titer), two seroconverted for *T. cruzi* infection, and 52 remained negative for both parasites (Table 4).

Table 3. Seropositivity (absolute numbers and percentage) and serological titers (Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT)) for *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. and mixed infection in wild and domestic canids of Cumari, Goiás, Brazil.

| Species | Sampling Events | Seropositivity | | | Serological Titers (IFAT) | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------------|-----------------|---------------------------|------|-------|-------|------------------------|------|------|-------|-------|
| | | <i>Trypanosoma cruzi</i> | <i>Leishmania</i> spp. | Mixed Infection | <i>Trypanosoma cruzi</i> | | | | <i>Leishmania</i> spp. | | | | |
| | | | | | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/2560 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | 283 | 31 (11%) | 2 * (0.7%) | 5 * (1.7%) | 20 | 7 | 6 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| <i>Cerdocyon thous</i> | 78 | 17 (21.8%) | 3 ** (3.8%) | 5 (6.4%) | 10 | 8 | 3 | 1 | 0 | 3 | 4 | 0 | 1 |
| <i>Lycalopex vetulus</i> | 42 | 17 (40.5%) | 2 (4.7%) | 1 (2.4%) | 2 | 4 | 6 | 5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Chrysocyon brachyurus</i> | 11 | 2 (18.2%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 | 0 | 1 *** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* *Leishmania infantum* (N = 1) and mixed *T. cruzi/Leishmania infantum* (N = 2). ** *Leishmania infantum* (N = 1). Positive samples also in TR DPP® *** Maned wolf positive in skin culture that it was not possible to recover DNA.

Table 4. Temporal serological pattern of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in wild and domestic canids throughout captures and recaptures conducted in Cumari, Goiás, Brazil, between 2013 and 2017.

| | Year of Expeditions Capture (C) Recapture (R) | 2013 | | | 2014 | | | 2015 | | | 2016 | | | 2017 | | | Total Captured and Recaptured | | |
|-------------------------------|---|------|---|-------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|----|-------|-------------------------------|----|-------|
| | | C | R | P (%) | C | R | P (%) | C | R | P (%) | C | R | P (%) | C | R | P (%) | C | R | P (%) |
| <i>Cerdocyon thous</i> | N | 32 | 0 | | 6 | 0 | | 10 | 2 | | 15 | 3 | | 9 | 1 | | 72 | 6 | |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> | 10 | | 31% | 2 | | 33% | 0 | 1 | 8% | 1 | 1 | 11% | 2 | 0 | 20% | 15 | 2 | 22% |
| | <i>Leishmania</i> spp. | 1 | | 3% | 0 | | 0% | 0 | 1* | 8% | 1 | 0 | 5.5% | 0 | 0 | 0% | 2 | 1 | 4% |
| | Mixed infection | 2 | | 6% | 0 | | 0% | 1 | 0 | 8% | 1 | 0 | 5.5% | 1 | 0 | 10% | 5 | 0 | 6.5% |
| <i>Lycalopex vetulus</i> | N | 11 | 0 | | 9 | 6 | | 2 | 2 | | 5 | 3 | | 2 | 2 | | 29 | 13 | |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> | 5 | | 45% | 3 | 4 (2)* | 47% | 0 | 2 | 50% | 0 | 2 | 25% | 0 | 1* | 25% | 8 | 9 | 40% |
| | <i>Leishmania</i> spp. | 1 | | 9% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 1 | 0 | 2% |
| | Mixed infection | 1 | | 9% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% | 1 | 0 | 2% |
| <i>Chrysocyon brachyurus</i> | N | 3 | 0 | | 4 | 0 | | 1 | 1 | | 2 | 0 | | 0 | 0 | | 10 | 1 | |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> | 1 | | 33% | 1 | | 25% | 0 | 0 | 0% | 0 | | 0% | | | | 2 | 0 | 18% |
| | <i>Leishmania</i> spp. | 0 | | 0% | 0 | | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | | 0% | | | | 0 | 0 | 0% |
| | Mixed infection | 0 | | 0% | 0 | | 0% | 0 | 0 | 0% | 0 | | 0% | | | | 0 | 0 | 0% |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | N | 0 | 0 | | 96 | 0 | | 54 | 34 | | 37 | 62 | | 0 | 0 | | 187 | 96 | |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> | | | | 14 | | 14.5% | 6 | 6 (1)* | 14% | 2 | 7 (1)* | 9% | | | | 22 | 13 | 12% |
| | <i>Leishmania</i> spp. | | | | 1 | | 1% | 1 | 0 | 1% | 0 | 0 | 0% | | | | 2 | 0 | 0.7% |
| | Mixed infection | | | | 0 | | 0% | 4 | 1 | 6% | 0 | 0 | 0% | | | | 4 | 1 | 1.8% |

N = total number of captured canids; P (%) = percentage of infected animals per year. The asterisk (*) refers to seroconversion events.

Overall, 414 capture events (including recaptures) of wild and domestic canids succeeded. It eight positive parasitological exams were obtained, representing 1.9% of parasitological prevalence (5 wild canids and 3 domestic dogs). Seroprevalence was 21.5% ($N = 89$), including seven of the eight canids positive in the parasitological tests. Thus, the total infection rate was 21.7% ($n = 90$). The spatial distribution of infected wild and domestic canids is shown in Figure 2.

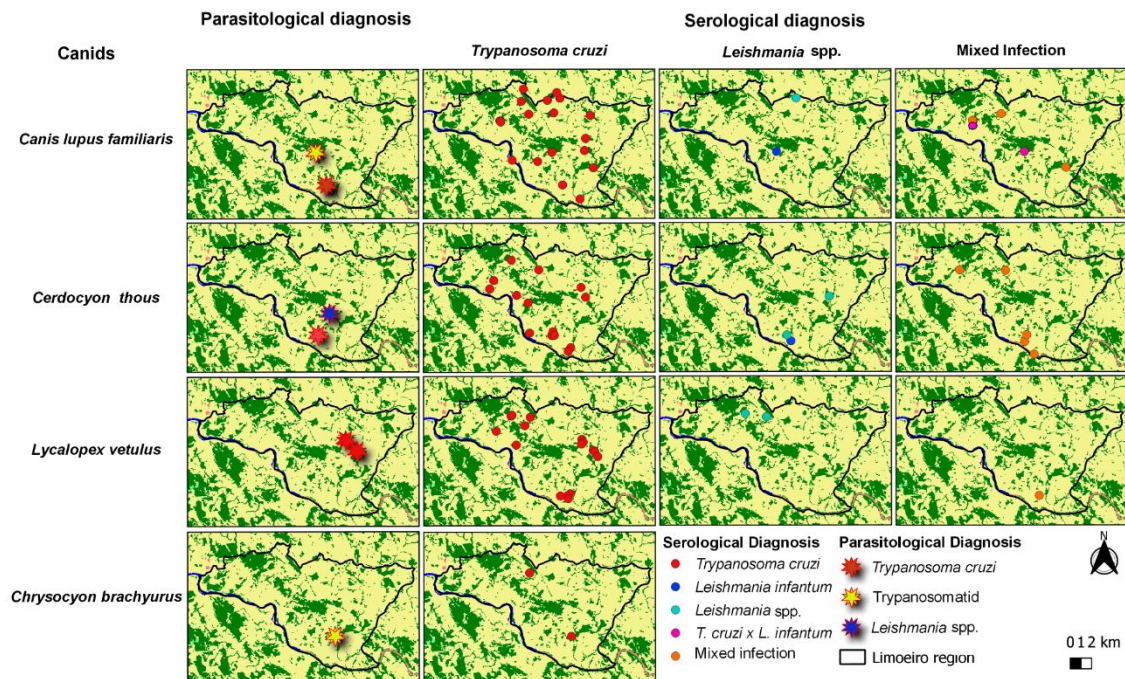


Figure 2. Spatial distribution of wild and domestic canids infected by *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. and mixed infections, highlighting the positive parasitological diagnosis. Maps were separated by canids species (wild and domestic) captured from 2013 to 2017 in the Limoeiro region, Cumari, Goiás, Brazil. The Google Terra.cn Normal background was obtained through the QuickMapServices Plugin in Quantum GIS version 3.12.

3. Discussion

Canids have a combination of ecological characteristics that favor opportunities to become infected with *T. cruzi* and *Leishmania* spp.: They have a diverse diet, including insects and small mammals (which may be infected by these parasites) [4] and are able to maintain different *T. cruzi* genotypes and infection by different *Leishmania* species [11,29,30]. Moreover, their wide home ranges and the use of diverse habitats [4] turn them into potential hubs of parasite dispersion. Both *T. cruzi* and *Leishmania* spp. infect wild and domestic canids at Limoeiro region, besides small mammals [31], and maintenance of these parasites by canids occurs despite the low rate of positive parasitological assays. Canids probably become infected through their exposure and consumption of infected vectors and prey. Positive hemocultures were observed in only 1.7% ($N = 5/298$) of the examined canids, and only one dog was positive for fresh blood examination, demonstrating low parasitemia and, consequently, low potential to these hosts to be source of *T. cruzi* infection vectors.

Concerning *Leishmania* sp. infection, only one *C. thous* was positive in the skin PCR, but this infection could not be further confirmed when other molecular targets (HSP70 and ITS1) were employed. This was probably because there are many more copies of the kDNA in the genome in comparison to the other targets, increasing the chances of amplification. Thus, most of the diagnosis was based on serological diagnosis. These results demonstrate that the *Leishmania* spp. infection in canids in the area, although occurring (as observed in the seropositive individuals, including an event of seroconversion)

is probably associated with short periods of higher parasitism, which was not detected in any of the investigated canids during the five-year follow-up.

One skin culture of *C. brachyurus* was also positive for flagellates, but the culture was not established (and the parasite not characterized). This was one of the two maned-wolves serologically positive for *T. cruzi* infection, presenting a high serological title (1/160). This result leads us to hypothesize that the animal could be infected with *T. cruzi*, and that the detected parasites could have come from microvessels when collecting the skin, although a mixed infection with other trypanosomatid species detected in the culture cannot be rejected.

The infection by both parasites was detected in all canid species from the study area (except *Leishmania* sp. in *C. brachyurus*) and parasitemia, essential for *T. cruzi* transmission (and attested by positive hemocultures), was observed in domestic dogs, *C. thous* and *L. vetulus*. The seroconversion events observed for both parasitosis attest that the transmission was occurring in the area during the study. The overall seroprevalence of *T. cruzi* was about four times higher than the observed for *Leishmania* infection; moreover, the majority of canids infected by *Leishmania* was mixed infected with *T. cruzi*.

C. thous, *L. vetulus* and *C. brachyurus* occur sympatrically in the Cerrado [32,33] and, at Limoeiro region, these wild canids are also syntopic to domestic dogs, a factor that may influence the transmission of these parasites. Our study area fits into the concept of agroecosystem, where the relationships between wild, domestic and human animals occur with greater proximity [26]. Therefore, wild and domestic species interact more closely with each other, establishing a network of interconnections, through range overlap and interspecific contact [25], and/or participating in the food chain (i.e., consumption of small mammals and invertebrates) [9].

Animals infected with *T. cruzi* and *Leishmania* spp. were captured in the same points in the study area, which demonstrates the overlapping of these parasites' infection. The overlap of infections at these points can lead to putative spillover of parasites between wild and domestic canids. Both *T. cruzi* and *Leishmania* spp. infect wildlife and domestic canids from Limoeiro region, and infection rates were higher in wild canids and small mammals than in dogs [31]. The wider spatial distribution of *T. cruzi* is probably a consequence of the higher infection rate by this parasite in all studied mammals.

Due to the elevated population replacement rate, it was extremely difficult to monitor the infection rate of domestic dogs over the years; only 28 of the 187 examined dogs (15%) remained and were evaluated in the three years. High replacement rates were previously described for rural dog populations in Chile, Indonesia, and South Africa [34,35].

In the studied region, dogs were present in all the households and are frequently related to house and poultry protection, besides cattle herding [26]. Sampled dogs were classified as "rural free-ranging dogs" following Vanak and Gompper [36], and there were no feral dogs in the study area. It means that they were owned or peripherally associated with human habitations but were not confined to a proscribed outdoor area or kennel. Therefore, they can move freely through the landscape, favoring possible contact with wild canids and vectors, which may trigger spillover events. However, although free-ranging dogs can cover large areas, they usually spend most of their time around their residence [37,38], which could explain why dogs' infection rates were lower than those of wild canids.

The *T. cruzi* infection pattern displayed by wild and domestic canids dogs from Limoeiro region were similar to that observed in other areas of Brazil: positive serology, indicating their exposure to the parasite's transmission cycle, and undetectable parasitemia, demonstrated by the rarity of positive hemocultures or fresh blood examination [20]. Positive hemocultures were detected in dogs, *L. vetulus* and *C. thous*, and it has been shown that these animals share at least one DTU of *T. cruzi* (TcIII) [10]. Although we were not able to distinguish the genotype/s involved (TcIII/TcV), previous studies using RFLP-PCR in samples from this two hoary foxes confirmed the infection by DTU TcIII [11], a genotype also found in marsupials (*Gracilinanus agilis*) from the same area [31]. Considering the pattern observed for experimentally infected domestic dogs, someone can expect that both wild and domestic canids

from the area present a short period of patent parasitemia during the initial phase of infection (rarely demonstrated by positive hemocultures in this study), followed by a later phase with undetectable parasitemia, even in reinfections [39].

In agreement with the study of Rocha et al. [10], we demonstrated that the transmission of *T. cruzi* is well-established in the area, with 19% of infected canids (32% considering only wild canids). In addition, for the first time we detected *T. cruzi* infection in maned wolves in this area. Infection rates were higher in wild canids, followed by wild small mammals and domestic dogs [31]. The rate of infection by *T. cruzi* in a specific host is driven by contact processes vector–parasite–environment–host; thus, we might expect that these ecological dissimilarities lead to different infection ratios [10].

Among wild canids, the infection rates observed for *L. vetulus* were about two times higher than observed for the other species, and three seroconversion events were observed. This canid was the one in which *T. cruzi* was isolated for the first time in the area [10] and represents two of the five positive hemocultures in the present study. The hoary fox seems to be most likely exposed to triatomine bugs due its habit of regularly using armadillo burrows [5,6,40], a recognized ecotope for triatomine vectors, such as species of the genus *Panstrongylus* [41]. Besides, the insectivorous diet of hoary foxes may also contribute to this higher infection rate, and the consumption of triatomine bug was already reported in the area [9].

In contrast, despite the plasticity of *C. thous* regarding habitat use, this species explores less microhabitats suitable for triatomines than hoary foxes [25]. However, *C. thous* present a diet rich on animal origin items, such as vertebrates and invertebrates [9], which could explain the infection by both *T. cruzi* and *Leishmania* spp. *T. cruzi* is recognized as a parasite that can be orally transmitted (prey-predator) [10], but amastigotes of *Leishmania* species are also capable of infecting mammalian cells (experimentally) and oral transmission cannot be ruled out in nature [42]. Maned wolves were found infected only by *T. cruzi* and was the species with lowest infection rate among studied canids. Although generalists, consuming both mammals, birds and insects [8], maned wolves are the most herbivorous among the three wild canids in Limoeiro [9] consuming high rates of fruits, and this could explain their low infection rates.

Surprisingly, considering the already described importance of dogs and wild canids (specially *C. thous*) as reservoirs of *L. infantum* [13,16,43], less than 5% of the canids were infected by *Leishmania* spp. (8.4% considering only wild canids). We demonstrated infection by *L. infantum* (confirmed by TR DPP® test) in *C. thous* and domestic dogs, representing less than 1% of the examined animals. In fact, *C. thous* populations were already reported as dependent to the contact with domestic dogs to maintain the transmission cycle [44]. Even though the rate of *Leishmania* species infection among the dogs in the area was low, still *C. thous* and dogs were the most infected canid species. The high density and the absence of movement restraint of dogs are factors that would increase the chance of encounter between them, pointing to the importance of overlapping transmission to sustain the *Leishmania* transmission [44]. Even so, *Leishmania* transmission was observed in the area since the first evaluation (as observed in the positive kDNA-PCR in *C. thous*) and later confirmed by the seropositive mammals, including seroconversion. Two aspects should be considered: (i) all reactions were performed using an anti-dog IgG (not species-specific for wild canids) and, because of that, are less sensitive for antibody detection, which can result in the sub-estimation of real infection rates in these canid species; and (ii) despite the cautious criteria adopted for serological diagnosis, the overlapping of transmission cycles favors the natural co-infection of wild and domestic canids with different species of trypanosomatids and cross-diagnosis are always prone to occur.

Canids appear to behave as selective filters of parasite species/genotypes (controlling and maintaining infection at low parasitism levels) when compared to small mammals, where greater richness of trypanosomatids was detected [31]. Interactions and competitive exclusion between tripanosomatid species and/or *T. cruzi* subpopulations certainly take a role in modulating infection ratios [10].

Knowing that wild and domestic canids in the Limoeiro region share trypanosomatid infections, this enzootic scenario has to be analyzed from a space-time perspective, in order to understand the displacements and contact rates between canids in the area, as well as possible landscape factors that may be correlated. This may provide a better understanding of parasite's spillover processes and dispersion in agroecosystems and, ultimately, of the potential risk of infection for local human communities.

4. Materials and Methods

4.1. Study Area

The study area comprises private cattle farms of Limoeiro region, municipality of Cumari (18°22.02' S, 48°5.48' W), southeast of Goiás State, Brazil. Although inserted on an ecotone area between two ecosystems, the Atlantic Forest and the Cerrado, the vast majority of the area (75%) has been altered by human activities and is mostly covered by exotic pasture (*Urochloa* sp.). The remaining is represented by fragments of original vegetation, such as gallery and semideciduous forests [25]. Climate in the region has two well-marked seasons, one hot and wet and another cold and dry [45].

4.2. Canids Capture and Sample Collection

Canids were captured in annual campaigns of 30 to 60 days each, from 2013 to 2017 for wild canids, and from 2014 to 2016 for domestic canids. Wild canids were captured using box traps made with galvanized wire mesh baited with sardines (for the capture of *C. thous* and *L. vetulus*) or with a mixture of sardines and cooked chicken (for the capture of *C. brachyurus*). Traps were distributed and inspected every morning on each expedition at locations where animals were viewed through night-time focusing (adapted from [46]) and registered through camera-traps and/or tracks and signs (Figure 3).

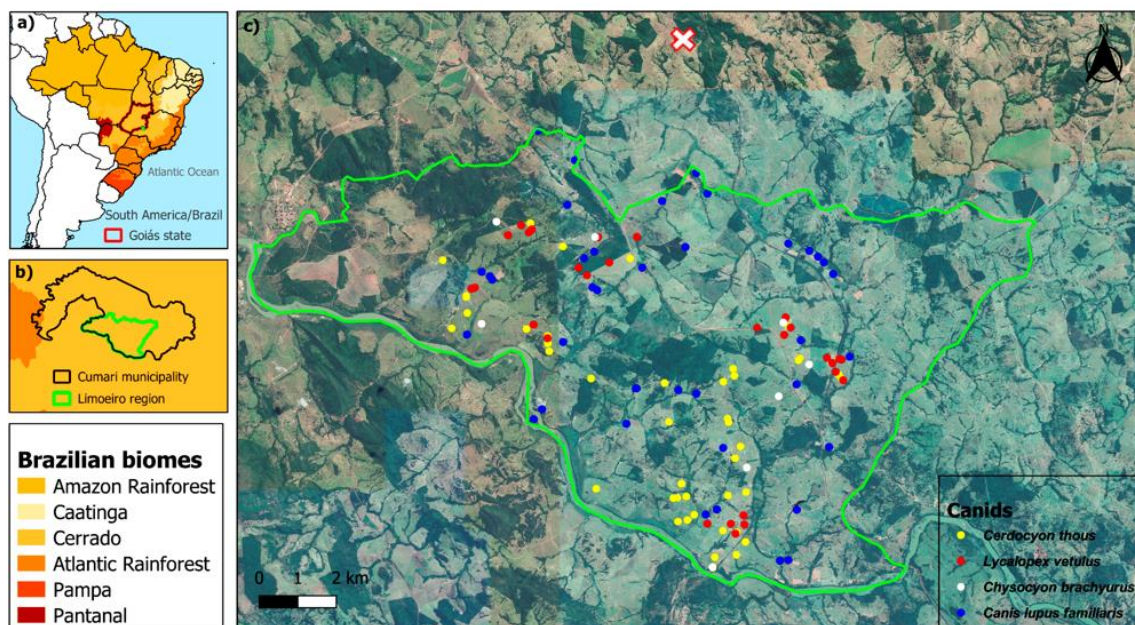


Figure 3. Geographical location of the study area: (a) Southeast of the Goiás state, Brazil; (b) municipality of Cumari, Limoeiro region, and (c) spatial distribution of capture points of wild and domestic canids, between 2013 and 2017. An individual of *Lycalopex vetulus* was captured 3,7km from Limoeiro region, shown by the symbol “✕”.

Wild canids were anesthetized with an association of 15 mg/kg of ketamine (Cetamin 10 mg/mL, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brazil), 0.5 mg/kg of midazolam (Dormire 5mg/mL, Cristália Chemical and Pharmaceutical Products, São Paulo, SP, Brazil) and 0.2 mg/kg butorphanol (Torbugesic 10 mg/mL,

Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, IA, USA.) administered intramuscularly in a single injection into the gluteal muscle.

All captured wild canids were marked with ear-tags and subcutaneous microchip for individual identification. We collected blood samples by puncture of the brachial cephalic vein using Vacutainer® tubes with anticoagulant (Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA)) for fresh blood examination and hemoculture and EDTA-free tubes that were centrifugated for serum separation and then stocked at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until serology assay. Aspiration of bone marrow by puncture of the iliac crest using $40 \times 12\text{ mm}$ needles and 10 mL syringe was also performed, then transferred to Vacutainer® tubes with anticoagulant for subsequent inoculation in culture medium. In addition, intact skin biopsies were obtained from two sites in the iliac crest region, using a 3-mm punch. We transferred these fragments to tubes containing: (i) sterile saline (sodium chloride (NaCl) at 58.44 g/mol) with antibiotic and antifungal (10 mg streptomycin, 25 μL amphotericin B and 10,000 IU penicillin per mL, Sigma® commercial solution, San Luis, MO, USA) to later inoculation in culture tubes and (ii) absolute ethanol for molecular diagnosis (Figure 4). After total recovery from anesthesia, animals were released at the site of the capture.

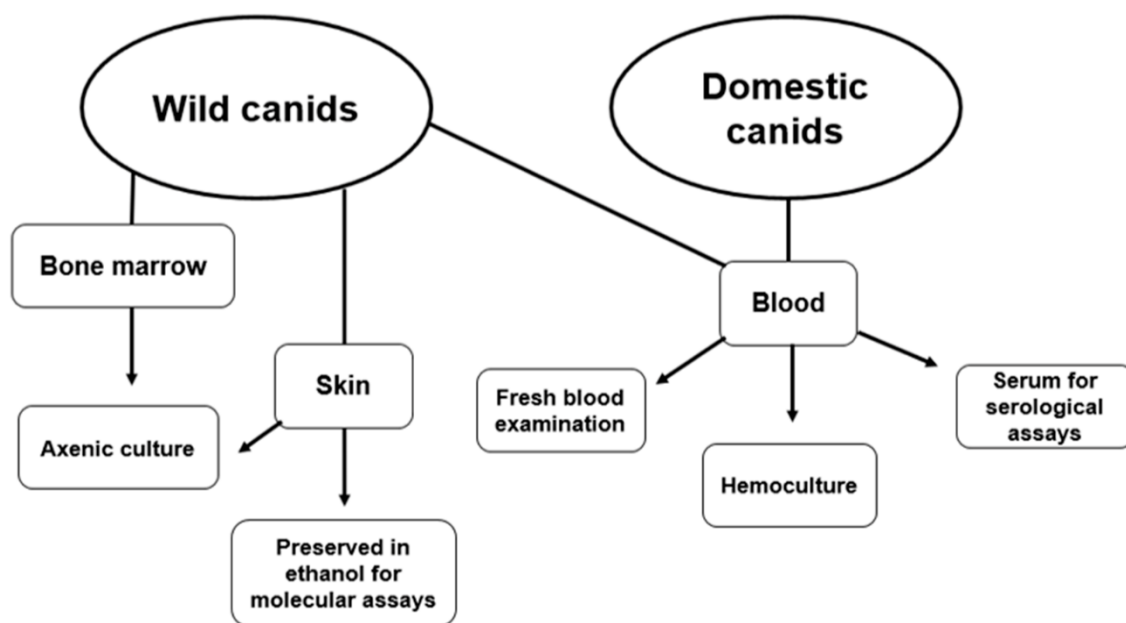


Figure 4. Scheme showing the biological materials collected for respective parasitological, serological and molecular assays from wild and domestic canids in the Limoeiro region, Cumari, Goiás, Brazil.

Domestic dogs were actively searched on all farms in the study area (Figure 3), and an individual questionnaire was also applied after formal authorization and concordance of the owner. They were individually identified by microchips and were physically restrained with help of owners. From these animals, only blood samples were collected, following the same procedures above described for wild canids (Figure 4).

4.3. Parasitological and Molecular Diagnosis

The fresh blood examination was carried out with a drop of approximately 5 μL of blood between slide and coverslip in an optical microscope at $400\times$ magnification to visualize flagellates. Hemocultures were performed by the inoculation of 0.6–0.8 mL of blood divided into two tubes containing biphasic NNN (Novy-Mc Neal-Nicole) medium with LIT (Liver Infusion Tryptose) and examined every two weeks up to five months [10].

Bone marrow was transferred from Vacutainer® tubes (Franklin Lakes, NJ, USA) with EDTA to one or two tubes containing NNN culture medium and Schneider's medium supplemented with 10%

fetal bovine serum as liquid phase. Skin fragments collected in saline tubes were stored for 24h at 4 °C and then transferred to culture tubes containing NNN medium and Schneider liquid medium [47]. In both cases, the cultures were examined every four days up to two months.

Isolated parasites were amplified, cryopreserved, and deposited in the Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores, COLTRYP/Fiocruz (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). For molecular characterization, isolated parasites were washed with 1 mL of PBS, pH 7.2, (Phosphate Buffer Solution) and centrifuged at 448 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was stored at −20 °C until DNA extraction. The PP (Parasite Pellet) was incubated with Proteinase K, and DNA extraction was performed using QIAamp DNA Blood minikit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions.

Positive cultures that did not result in parasite amplification for isolation (cultures not established) were directly centrifuged, and the sediments were stored at −20 °C until DNA extraction. The CP (Culture Pellet) was incubated with proteinase K and SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), and genomic DNA was extracted with the standard phenol-chloroform method [48].

Skin fragments collected in absolute ethanol were re-hydrated with Nuclease-free water, and the DNA extraction was carried out using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. Aiming to detect *Leishmania* sp. infection, kDNA-PCR were performed using the pureTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and primers directed to the conserved region of the *Leishmania*-kDNA mini circle: forward: 5'-GGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' and reverse: 5'-GGCCCACTATATTACACCAACCCC-3' [49,50].

Positive and negative controls were derived from spleen and liver fragments from infected (*Leishmania braziliensis*—IOC-L2483) and non-infected hamsters provided by the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation. The PCR products were visualized after electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and silver stained using a specific kit (DNA Silver Staining, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). We considered positive for *Leishmania* sp. infection the presence of DNA amplified products of 120 to 140bp. One skin sample that reacted positive in kDNA-PCR was submitted to other molecular targets aiming the *Leishmania* species characterization.

Molecular Characterization of Positive Samples

Molecular characterization was performed for positive hemocultures and one positive skin sample in *Leishmania* sp. kDNA-PCR. Two distinct molecular reactions were employed in positive hemocultures (PP and CP): 18S SSU (~650 base pairs) [51,52], and gGAPDH (~800 bp) [53,54]. Electrophoresis of PCR products were visualized using a 2% agarose gel, stained with GelRed–Biotium and visualized under UV (ultraviolet) light. All reactions included distilled water as a negative control and *T. cruzi* strain SylvioX/10c11 as a positive control [55].

The positive *Leishmania* sp. kDNA-PCR skin sample was submitted to additional PCR reactions: HSP70 (234 bp) [49,56] and ITS-1 (350bp) [57]. Those reactions were performed according to the original protocols, with few modifications. Protocols were tested with 7 µL of DNA sample employing the Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and, alternatively, GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA); besides increasing MgCl₂ (Magnesium Chloride) concentrations aiming to favor the sensitivity of the reaction. The product of the first reaction (7µl) was also used as a template for a second reaction under the same conditions. Electrophoresis was performed on 8% polyacrylamide gel and silver stained using a proper kit (DNA Silver Staining, GE Healthcare).

We submitted all positive PCR products (except those derived from CP) to purification using DNA purification kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) following the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and applied to the ABI3730 DNA analyzer automatic sequencer (Applied) in the Sequencing Platform (RPT01A) of the Oswaldo Cruz

Foundation, RJ. The sequences were assembled and edited using SeqMan (DNASTAR Lasergene, Gac, Konstanz, Germany) to obtain consensus sequences, which were then aligned and corrected using BioEdit Version 7.0.5.3. The sequences were compared to nucleotide sequences deposited in GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm.

4.4. Phylogenetic Analysis

The analyzed sequences were merged and aligned in Clustal W (with manual refinement of erroneous readings), by the Mega X program [58]. Phylogenetic tree construction was performed using the online PhyML 3.0 program [59]. We used the ML (Maximum Likelihood) method, employing the best DNA model. The best substitution model was identified as having the lowest BIC score (Bayesian Information Criterion): K80 + G (Kimura, 1980 with G: Gamma distributed rate variation among sites = K2P + G) for the 18S rDNA gene, and GTR + I (General Time Reversible [60], with the fraction of locations that is evolutionarily invariable (+ I)) for the gGAPDH gene, and a bootstrap value of 1000 replicates. We used *T. cruzi* (TcI to TcVI), *T. c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. dionisii* and *T. rangeli* sequences from GenBank as references. All sequences analyzed were deposited in the GenBank database, and the accession numbers are represented in Table 2.

4.5. Serological Diagnosis

For IgG antibody detection in the sera of wild and domestic canids, an IFAT assay was performed as previously described [61]. Antigens used were the reference strains I00/BR/00F (TcI) and MHOM/BR/1957/Y (TcII) for *T. cruzi* and *L. infantum* (IOC/L579) and *L. braziliensis* (IOC/L566) for *Leishmania* spp. from axenic cultures, mixed in equal (1:1) proportion. Sera from all canids were tested with anti-dog IgG (Immunoglobulin G) conjugated with fluorescein isothiocyanate (Sigma, St. Louis, MO, USA), and the cut-off point adopted was 1/40 [55].

In addition to IFAT, the sera were submitted to ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to examine the infection by *T. cruzi* [62] and *Leishmania* sp. (ELISA, Biomanguinhos, Rio de Janeiro (RJ), Brazil) using commercial peroxidase-conjugated antibodies (Sigma, St. Louis, MO, USA). The cut-off point was established by the mean OD (Optical Density) of the negative control \pm three standard deviation and the gray range adopted was 20% above the cut-off value. For each serological reaction, two positive and three negative controls for *T. cruzi* and *Leishmania* spp. were added. For the diagnosis of *L. infantum* infection was also performed the TR DPP[®].

We adopted as seropositivity criteria the positive reaction in two serological tests. We considered mixed infection when there was positivity in two serological tests for both *T. cruzi* and *Leishmania* spp. and the difference between them was less than two serological titers in IFAT assays. We considered *L. infantum* infection when the TR DPP[®] (BioManguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was positive, added to another positive serological test for *Leishmania* spp. (IFAT and/or ELISA).

4.6. Statistical Analysis

We determined infection rate by the number of mammals that had at least one positive parasitological test and/or two serological tests divided by the total of mammals examined. To define the infected animals, we considered positive results in either parasitological or serological assays in any sampling event, and counted the individual only once, even those recaptured. No animal was examined more than once in the same year; that is, each recapture event occurred in different years (campaigns).

4.7. Ethics Statement

The study was approved by the CEUA LW81-12 (Ethics Committee of Foundation Oswaldo Cruz/FIOCRUZ) and CEUA 086/2014 (Ethics Committee of Federal University of Goiás). Captures and samples collection of wild canids were granted by the ICMBio/SISBIO (Brazilian Government Chico

Mendes Institute for Conservation of Biodiversity—under license: 14576). All handling procedures with animals followed the American Society of Mastrozoology [63].

4.8. Construction of the Maps

Traps for capturing wild canids, as well as the headquarters of the farms where samples of the dogs were collected, were georeferenced using GPS (Global Positioning System). These points were visualized in a GIS (Geographic Information System) in the WGS 84 (World Geodetic System). Map construction was performed in QGIS (Quantum GIS software version 3.12), using the continental, national, state, and municipal boundaries of the study area, extracted from the open access cartographic base of IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Google Earth Satellite images (QGIS QuickMapServices plugin) and Collection 4.1—2017 images (QGIS MapbiomasCollection plugin) were also used.

Author Contributions: Conceptualization, E.M.V.B., S.C.C.X., F.L.R., C.F.M.L., F.C.A., F.G.L., Í.Z.C., A.M.J. and A.L.R.R.; formal analysis, E.M.V.B., S.C.C.X. and A.L.R.R.; funding acquisition, F.L.R., C.F.M.L., F.C.A., F.G.L., A.M.J. and A.L.R.R.; investigation, E.M.V.B., S.C.C.X., F.L.R., C.F.M.L., Í.Z.C., F.C.A., F.G.L.; methodology, E.M.V.B., S.C.C.X., F.L.R., C.F.M.L., Í.Z.C., F.C.A., F.G.L.; project administration, E.M.V.B., F.L.R., C.F.M.L., F.C.A., F.G.L. and A.L.R.R.; resources, C.F.M.L., F.G.L., A.M.J. and A.L.R.R.; supervision, C.F.M.L., F.G.L. and A.L.R.R.; visualization, E.M.V.B., A.M.J. and A.L.R.R.; writing—original draft, E.M.V.B., S.C.C.X., A.M.J. and A.L.R.R.; writing—review and editing, E.M.V.B., S.C.C.X., C.F.M.L., Í.Z.C., F.C.A., F.G.L., A.M.J. and A.L.R.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Universal—425293-2018-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (JCNE-26/202.794/2019) to ALRR and a fellowship from CNPq to EMVB. AMJ and ALRR are “Cientista” and “Jovem Cientista” do Nosso Estado”, respectively, provided by FAPERJ, and are financially supported by CNPq (“Bolsista de Produtividade”). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We want to thank LABTRIP, Fundação Parque Zoológico de São Paulo and PCMC, Brazil; the PDTIS/Fiocruz sequencing platform, besides all personnel involved in field work, especially Bruno Alves and Mozart C. Freitas-Junior. We would also like to thank Carlos Ruiz Ardé and Marcos Antônio dos Santos Lima for technical support in the cultures; Marlon Silva for image editing; Cristiane Varella and Felipe de Oliveira for the COLTRYP isolates’ characterization; Diana Rangel for her contribution in HSP70 and ITS1 techniques; and Maria Augusta Dario, Marina Rodrigues and Juliana Barros for the support on the sequences and phylogeny analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lukeš, J.; Butenko, A.; Hashimi, H.; Maslov, D.A.; Votýpka, J.; Yurchenko, V. Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 466–480. [[CrossRef](#)]
2. Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2014**, *3*, 251–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jansen, A.M.; Xavier, S.C.C.; Roque, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* **2015**, *151*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sillero-Zubiri, C. Family *Canidae* (dogs). In *Handbook of Mammals of the World*; Wilson, D.E., Mittermeier, R.A., Eds.; Carnivores: Barcelona, Spain, 2009; Volume 1, pp. 352–447.
5. Dalponte, J.C. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: Canidae). *Mamm. Species* **2009**, *847*, 1–7. [[CrossRef](#)]
6. Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Paula, R.C.; Dalponte, J. *Lycalopex vetulus*, hoary fox. *IUCN Red List Threat. Species* **2020**, *8235*, 1–7.
7. Facure, K.G.; Giaretta, A.A.; Monteiro-Filho, E.L.A. Food habits of the crab-eating-fox, *Cerdocyon thous*, in an altitudinal forest of the Mantiqueira Range, southeastern Brazil. *Mammalia* **2003**, *67*, 503–511. [[CrossRef](#)]
8. Jácomo, A.T.A.; Silveira, L.; Diniz-Filho, J.A.F. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. *J. Zool.* **2004**, *262*, 99–106. [[CrossRef](#)]

9. Kotviski, B.M.; Facure, K.G.; de Azevedo, F.C.; Freitas-Junior, M.C.; Lemos, F.G. Trophic niche overlap and resource partitioning among wild canids in an anthropized neotropical ecotone. *Mastozool. Neotrop.* **2019**, *26*, 368–376. [[CrossRef](#)]
10. Rocha, F.L.; Roque, A.L.R.; de Lima, J.S.; Cheida, C.C.; Lemos, F.G.; de Azevedo, F.C.; Arrais, R.C.; Bilac, D.; Herrera, H.M.; Mourão, G.; et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67463. [[CrossRef](#)]
11. Barros, J.H.S.; Xavier, S.C.C.; Bilac, D.; Lima, V.S.; Dario, M.A.; Jansen, A.M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Trop.* **2017**, *172*, 173–179. [[CrossRef](#)]
12. Reis, F.C.; Minuzzi-Souza, T.T.C.; Neiva, M.; Timbó, R.V.; Morais, I.O.B.; Lima, T.M.; Hecht, M.; Nitz, N.; Gurgel-Gonçalves, R. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 248–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Courtenay, O.; Santana, E.W.; Johnson, P.J.; Vasconcelos, I.A.B.; Vasconcelos, A.W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: A case of mistaken identity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *90*, 498–502. [[CrossRef](#)]
14. Deane, L.M.; Deane, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em áreas endêmicas de Calazar, no Ceará. *Hospital* **1955**, *48*, 79–98.
15. Figueiredo, F.B.; Gremião, I.D.F.; Pereira, S.A.; Fedulo, L.P.; Menezes, R.C.; Balthazar, D.A.; Schubach, T.M.P.; Madeira, M.F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 200–201. [[CrossRef](#)]
16. Dantas-Torres, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites Vectors* **2009**, *2*, 1–8. [[CrossRef](#)]
17. Crisante, G.; Rojas, A.; Teixeira, M.M.G.; Añez, N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* **2006**, *98*, 247–254. [[CrossRef](#)]
18. Gürtler, R.E.; Cecere, M.C.; Lauricella, M.A.; Cardinal, M.V.; Kitron, U.; Cohen, J.E. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* **2007**, *134*, 69–82. [[CrossRef](#)]
19. Kjos, S.A.; Snowden, K.F.; Craig, T.M.; Lewis, B.; Ronald, N.; Olson, J.K. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet. Parasitol.* **2008**, *152*, 249–256. [[CrossRef](#)]
20. Das Xavier, S.C.C.; Roque, A.L.R.; dos Lima, V.S.; Monteiro, K.J.L.; Otaviano, J.C.R.; da Silva, L.F.C.F.; Jansen, A.M. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*. [[CrossRef](#)]
21. Butler, J.R.A.; du Toit, J.T.; Bingham, J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: Threats of competition and disease to large wild carnivores. *Biol. Conserv.* **2004**, *115*, 369–378. [[CrossRef](#)]
22. Daszak, P.; Cunningham, A.A.; Hyatt, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* **2001**, *78*, 1–14. [[CrossRef](#)]
23. Kazemi, H.; Klug, H.; Kamkar, B. New services and roles of biodiversity in modern agroecosystems: A review. *Ecol. Indic.* **2018**, *93*, 1126–1135. [[CrossRef](#)]
24. Moonen, A.C.; Bàrberi, P. Functional biodiversity: An agroecosystem approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2008**, *127*, 7–21. [[CrossRef](#)]
25. Lemos, F.G. *Ecologia e Conservação Da Raposa-Do-Campo (Lycalopex vetulus) e Interações com Canídeos Simpátricos em Áreas Antropizadas do Brasil Central*; Universidade Federal de Uberlândia: Uberlândia, Brasil, 2016.
26. Bickley, S.M.; Lemos, F.G.; Gilmore, M.P.; Azevedo, F.C.; Freeman, E.W.; Songsasen, N. Human perceptions of and interactions with wild canids on cattle ranches in central Brazil. *Oryx* **2019**, 1–8. [[CrossRef](#)]
27. Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Costa, H.C.M.; Joares, A. Human threats to hoary and crab-eating foxes in central Brazil. *Canid News* **2011**, 1–6.
28. Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Beisiegel, B.M.; Jorge, R.P.S.; Paula, R.C.; Rodrigues, F.H.G.; Rodrigues, L.A. Avaliação do risco de extinção da Raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil. *Biodiversidade Bras.* **2013**, *3*, 160–171. [[CrossRef](#)]
29. Correa, J.P.; Bacigalupo, A.; Yefi-Quinteros, E.; Rojo, G.; Solari, A.; Cattan, P.E.; Botto-Mahan, C. Trypanosomatid infections among vertebrates of Chile: A systematic review. *Pathogens* **2020**, *9*, 661. [[CrossRef](#)]

30. Otranto, D.; Cantacessi, C.; Pfeffer, M.; Dantas-Torres, F.; Brianti, E.; Deplazes, P.; Genchi, C.; Guberti, V.; Capelli, G. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Vet. Parasitol.* **2015**, *213*, 12–23. [[CrossRef](#)]
31. Brandão, E.M.V.; Xavier, S.C.C.; Carvalhaes, J.G.; D'andrea, P.S.; Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Cássia-Pires, R.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Trypanosomatids in small mammals of an agroecosystem in central Brazil: Another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape. *Pathogens* **2019**, *8*, 190. [[CrossRef](#)]
32. Marinho-Filho, J.; Rodrigues, F.H.G.; Juarez, K.M. The cerrado mammals: Diversity, ecology, and natural history. In *The Cerrados of Brazil*; Oliveira, P., Marquis, R., Eds.; Columbia University Press: New York, NY, USA, 2002; pp. 266–284.
33. Paglia, A.P.; Fonseca, G.A.B.; Rylands, A.B.; Herrmann, G.; Aguiar, L.M.S.; Chiarello, A.G.; Leite, Y.L.R.; Costa, L.P.; Siciliano, S.; Kierulff, M.C.M.; et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil/annotated checklist of Brazilian mammals, 2ª Edição. *Occas. Pap. Conserv. Biol.* **2012**, *6*, 76.
34. Morters, M.K.; McKinley, T.J.; Restif, O.; Conlan, A.J.K.; Cleaveland, S.; Hampson, K.; Whay, H.R.; Damriyasa, I.M.; Wood, J.L.N. The demography of free-roaming dog populations and applications to disease and population control. *J. Appl. Ecol.* **2014**, *51*, 1096–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sepúlveda, M.A.; Singer, R.S.; Silva-Rodríguez, E.; Stowhas, P.; Pelican, K. Domestic dogs in rural communities around protected areas: Conservation problem or conflict solution? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Vanak, A.T.; Gompper, M.E. Dogs *Canis familiaris* as carnivores: Their role and function in intraguild competition. *Mamm. Rev.* **2009**, *39*, 265–283. [[CrossRef](#)]
37. Dürr, S.; Ward, M.P. Roaming behaviour and home range estimation of domestic dogs in Aboriginal and Torres Strait Islander communities in northern Australia using four different methods. *Prev. Vet. Med.* **2014**, *117*, 340–357. [[CrossRef](#)]
38. Sepúlveda, M.A.; Pelican, K.; Cross, P.; Eguren, A.; Singer, R.S. Fine-scale movements of rural free-ranging dogs in conservation areas in the temperate rainforest of the coastal range of southern Chile. *Mamm. Biol.* **2015**, *80*, 290–297. [[CrossRef](#)]
39. Machado, E.M.M.; Fernandes, A.J.; Murta, S.M.F.; Vitor, R.W.A.; Camilo Júnior, D.J.; Pinheiro, S.W.; Lopes, E.R.; Adad, S.J.; Romanha, A.J.; Dias, J.C.P.; et al. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *65*, 958–965. [[CrossRef](#)]
40. Lemos, F.G.; Facure, K.G.; Azevedo, F.C. A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado Biome at Central Brazil. In *Middle-Sized Carnivores in Agricultural Landscapes*; Rosalino, L.M., Gheler Costa, C.E., Eds.; Nova Sciences Publishers: New York, NY, USA, 2011; pp. 143–160.
41. Mendes, P.C.; Beatriz, M.; de Paula, C.; Limongi, J.E. Chagas disease and the space distribution of captured triatomines in Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. *Hygeia* **2008**, *3*, 176–204.
42. Spotin, A.; Parvizi, P. Comparative study of viscerotropic pathogenicity of *Leishmania major* amastigotes and promastigotes based on identification of mitochondrial and nucleus sequences. *Parasitol. Res.* **2015**, *115*, 1221–1228. [[CrossRef](#)]
43. Lainson, R.; Shaw, J.J.; Silveira, F.T.; Braga, R.R. American visceral leishmaniasis: On the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, *2*, 123–125. [[CrossRef](#)]
44. Courtenay, O.; Quinnell, R.J.; Garcez, L.M.; Dye, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: The crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* **2002**, *125*, 407–414. [[CrossRef](#)]
45. Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; de Moraes Gonçalves, J.L.; Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* **2013**, *22*, 711–728. [[CrossRef](#)]
46. Brady, C.A. Observations on the behavior and ecology of the crab-eating-fox (*Cercopithecus thous*). In *Vertebrate Ecology in the Northern Neotropics*; Eisenberg, J.F., Ed.; Smithsonian Institution Press: Washington, DC, USA, 1979.
47. De Campos, M.P.; da Silva, D.A.; de Madeira, M.F.; Velho, A.A.M.V., Jr.; Figueiredo, F.B. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2013**, *22*, 424–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 1989.

49. Cássia-Pires, R.; Boité, M.C.; D'Andrea, P.S.; Herrera, H.M.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Degraeve, W.; Fernandes, O.; Campbell, D.; Bozza, M.; Lopes, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, *89*, 463–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Noyes, H.A.; Stevens, J.R.; Teixeira, M.; Phelan, J.; Holz, P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 331–339. [[CrossRef](#)]
52. Smith, A.; Clark, P.; Averis, S.; Lymbery, A.J.; Wayne, A.F.; Morris, K.D.; Thompson, R.A. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitology* **2008**, *135*, 1329–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Borghesan, T.C.; Ferreira, R.C.; Takata, C.S.A.; Campaner, M.; Borda, C.C.; Paiva, F.; Milder, R.V.; Teixeira, M.M.G.; Camargo, E.P. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* **2013**, *164*, 129–152. [[CrossRef](#)]
54. Hamilton, P.B.; Adams, E.R.; Njiokou, F.; Gibson, W.C.; Cuny, G.; Herder, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 81–86. [[CrossRef](#)]
55. Dario, M.A.; Lisboa, C.V.; Costa, L.M.; Moratelli, R.; Nascimento, M.P.; Costa, L.P.; Reis Leite, Y.L.; Llewellyn, M.S.; das Chagas Xavier, S.C.; Rodrigues Roque, A.L.; et al. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e188412. [[CrossRef](#)]
56. Graça, G.C.; Volpini, A.C.; Romero, G.A.S.; Neto, M.P.; de Hueb, M.O.; Porrozzi, R.; Boité, M.C.; Cupolillo, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 664–674. [[CrossRef](#)]
57. Schönian, G.; Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig, H.D.F.H.; Presber, W.; Jaffe, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *47*, 349–358. [[CrossRef](#)]
58. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tavaré, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Am. Math. Soc. Lect. Math. Life Sci.* **1986**, *17*, 57–86.
61. Camargo, E.M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **1966**, *8*, 1–8.
62. Dario, M.A.; Rodrigues, M.S.; Barros, J.H.D.S.; Xavier, S.C.D.C.; D'Andrea, P.S.; Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 477. [[CrossRef](#)]
63. Sikes, R.S.; Gannon, W.L. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* **2011**. [[CrossRef](#)]



CAPÍTULO 3

Landscape Ecology Model in the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in wild canids and small mammals in Limoeiro region, Goiás state, Brazil

Elida Millena de Vasconcelos Brandão; Frederico Gemesio Lemos; Caio Felipe Motta Lima; Ízis Zanini Candeias; Fernanda Cavalcanti Azevedo; Fabiana Lopes Rocha; Ana Maria Jansen; André Luiz Rodrigues Roque and Samanta Cristina das Chagas Xavier.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e período das coletas

A área de estudo é composta por fazendas de gado, localizada na região do Limoeiro, no município de Cumari (18°22.02´S, 48°5.48´W), no sudeste do estado de Goiás, Brasil. Embora inserida em uma área de ecótono entre dois ecossistemas - a Mata Atlântica e o Cerrado -, a maior parte da área (75%) foi alterada por atividades antrópicas e é, em sua maioria, coberta por pastagens exóticas (*Urochloa* sp.). O restante é representado por fragmentos de vegetação de pequeno e médio porte (1 a 500ha), como matas de galerias e florestas semidecíduais (Lemos 2016). O clima da região possui duas estações bem definidas, uma quente e úmida e outra fria e seca (Alvares et al. 2013).

Para a coleta das amostras de pequenos mamíferos foram realizadas quatro expedições entre 2013 e 2015, com duração de cinco noites cada, utilizando armadilhas do tipo Sherman e Tomahawk. Os canídeos silvestres foram capturados em armadilhas do tipo box durante cinco expedições anuais entre 2013 e 2017. Todos os pontos de captura dos mamíferos foram georreferenciados através do receptor GPS (*Global Positioning System*) e Datum WGS-84 (*World Geodetic System*).

Ecologia da Paisagem

Com o objetivo de correlacionar a Ecologia da Paisagem com a taxa de infecção por *T. cruzi* nos pequenos mamíferos e canídeos silvestres da região do Limoeiro foram calculadas as Métricas da Paisagem e o Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (*NDVI - Normalized Difference Vegetation Index*).

Métricas da Paisagem

As cinco imagens do município de Cumari, correspondentes ao período de estudo (2013 a 2017), foram obtidas da classificação de uso e cobertura do solo da coleção 4.0 do Mapbiomas (<https://mapbiomas.org/>), no formato raster (GeoTIFF) e resolução espacial de 30 metros. No software QGIS (*Quantum Geographic Information System*) versão 3.10 foi realizado o recorte da área de estudo – pelo limite da região do Limoeiro, através da função camada de máscara. Após, foi realizado o

isolamento da classe Floresta, a mesma foi convertida para o formato vetorial, que permite calcular a área dos fragmentos florestais, sendo a unidade adotada em hectare.

A descrição da área foi calculada em três níveis:

- 1) Por classes → Agrupando os fragmentos florestais em quatro classes de tamanho, medidos em hectare. A primeira classe de 0 a 1 hectare, com a próxima classe iniciando no final da anterior e seus limites sendo 10 vezes superior (Tabela 1);

Tabela 1 – Classificação da área dos fragmentos florestais (medida em hectares), agrupados em cinco classes de tamanho diferentes

| Classes | Tamanho dos fragmentos (Área em hectare) | Classificação qualitativa do tamanho dos fragmentos |
|---------|--|---|
| 1 | $> 0 \text{ e } < 1$ | Pequeno |
| 2 | $\geq 1 \text{ e } < 10$ | Médio |
| 3 | $\geq 10 \text{ e } < 100$ | Grande |
| 4 | $\geq 100 \text{ e } < 1000$ | Muito grande |

- 2) Por fragmentos → Quantidade total de fragmentos que compõem a área, e;
- 3) Por fragmentos com capturas → Somente os fragmentos com capturas dos animais estudados (pequenos mamíferos e canídeos silvestres). Para isso, foram selecionados os fragmentos que estiveram dentro do valor de um *buffer* gerado a partir do cálculo da matriz de distância dos pontos de capturas [médias das distâncias ± 1 desvio padrão]. Em seguida, foram selecionados somente os fragmentos com capturas de pequenos mamíferos e canídeos silvestres, e para esse último, foram também selecionados os fragmentos por aproximação.

Foram calculadas 19 métricas da paisagem para todos os fragmentos florestais e a análise estatística foi aplicada somente nos dados dos fragmentos com capturas (Tabela 2). O cálculo das métricas foi realizado utilizando o complemento *Landscape Ecology Statistics (LecoS)* no software QGIS versão 3.10.

Tabela 2 - Descrição das métricas da paisagem disponíveis no *plugin* LecoS (*Landscape Ecology Statistics*) do *software* QGIS (*Quantum Geographic Information System*)

| ID | Métrica | Unidade | Descrição |
|----|----------------------|-------------------------|--|
| 1 | Land cover | m ² | Área total; soma de todos os fragmentos de uma determinada classe de uso da terra. |
| 2 | Landscape proportion | % | Proporção de área; soma das áreas (m ²) de todos os fragmentos de uma determinada classe, dividida pela área total da paisagem (m ²), multiplicada por 100. |
| 3 | Edge length | M | Total de borda; soma de todos os perímetros de borda contidos em uma determinada classe |
| 4 | Edge density | m/há | Densidade de borda; soma dos comprimentos (m) de todos os segmentos de borda correspondente a uma determinada classe, dividido pela área total da paisagem (m ²), multiplicado por 10.000 (para converter para hectares). |
| 5 | Number of patches | Adimensional | Número de fragmentos; representa o número total de fragmentos de uma classe, quanto maior o número de manchas maior será a fragmentação do local. |
| 6 | Patch density | Número por 100 hectares | Densidade dos fragmentos; É igual ao número de fragmentos de classe correspondente, dividido pela área total da paisagem (m ²), multiplicado por 10.000 e 100 (para converter para 100 hectares). Observe que a área total da paisagem (A) inclui qualquer fundo interno presente. |
| 7 | Greatest patch área | m ² | Área do maior e do menor fragmento; área ocupada pela maior/menor fragmento, permite observar se a paisagem é dominada por um só fragmento e assim avaliar a sua homogeneidade (MCGARIGAL & MARKS, 1995). |
| 8 | Smallest patch área | | |
| 9 | Mean patch área | m ² | Tamanho médio das manchas; é a soma das áreas dos fragmentos de uma determinada classe dividida pela quantidade de fragmentos dessa mesma classe. |
| 10 | Median patch área | m ² | Mediana das áreas; é o valor que separa a metade maior e a metade menor das áreas dos fragmentos de uma determinada classe. |

| | | | |
|----|-------------------------|--------------|--|
| 11 | Largest patch index | % | Índice de área do maior fragmento; é igual à área (m ²) do maior fragmento de uma determinada classe, dividida pela área total da paisagem (m ²), multiplicada por 100 |
| 12 | Fractal Dimension Index | Adimensional | Índice de Dimensão Fractal; é igual a 2 vezes o logaritmo do perímetro do fragmento (m) dividido pelo logaritmo da área do fragmento (m ²); o perímetro é ajustado para corrigir o viés do <i>raster</i> no perímetro. |
| 13 | Mean patch shape ratio | Adimensional | Razão média da forma do fragmento; mede a complexidade média da forma do fragmento, mas sem padronização para uma forma euclidiana simples (por exemplo, quadrado). Os valores são iguais a 1 quando o fragmento é compactado ao máximo, e aumenta sem limite conforme a forma do fragmento se torna mais irregular. |
| 14 | Overall core área | Hectare | Área central total dos fragmentos; é a soma das áreas centrais de cada fragmento (m ²) de uma determinada classe, dividido por 10.000 (para converter em hectares). |
| 15 | Like adjacencies | % | Percentual do grau de conectividade de células da mesma classe. |
| 16 | Patch cohesion index | % | Índice de coesão do fragmento; é igual a 1 menos a soma do perímetro do fragmento (em termos de número de superfícies de células) dividido pela soma do perímetro do fragmento vezes a raiz quadrada da área do fragmento (em termos de número de células) para fragmentos de uma mesma classe, dividido por 1 menos 1 sobre a raiz quadrada do número total de células na paisagem, multiplicado por 100. |
| 17 | Landscape Division | Proporção | Índice de divisão da paisagem; é igual a 1 menos a soma da área do patch (m ²) dividido pela área total da paisagem (m ²), quantidade ao quadrado, somada em todos os fragmentos na paisagem. Observe que a área total da paisagem (A) inclui qualquer fundo interno presente. |
| 18 | Effective meshsize | Hectares | Tamanho efetivo da malha; é igual à soma da área do fragmento ao quadrado, de acordo com determinada classe, dividida pela área total da paisagem (m ²), dividida por 10.000 (para converter em hectares). |
| 19 | Splitting index | Adimensional | Índice de Divisão; é igual à área total da paisagem (m ²) ao quadrado dividido pela soma da área do fragmento (m ²) ao quadrado, de uma determinada classe. |

Para obter a taxa de desmatamento ocorrida durante os cinco anos de estudo foram quantificadas as áreas de florestas (*Land cover* foi a métrica utilizada) referentes ao primeiro ano (2013) e ao último ano de capturas (2017). Em seguida, foi realizado o cálculo da diferença entre o tamanho das áreas para avaliar as perdas e/ou ganhos de áreas durante o período de estudo.

Índice de Vegetação por Diferença Normalizada - NDVI

Para calcular o NDVI foram utilizadas imagens do satélite Landsat-8 nas bandas 4 e 5, referentes à órbita 221, ponto 73, fornecidas através do *download* gratuito no catálogo de imagens do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). As imagens datam de 20/08/2015 e foram escolhidas levando em consideração a ausência de cobertura de nuvens e a temporalidade (mesmo ano utilizado para calcular as métricas da paisagem). Para o Landsat-8, as bandas B4 e B5 correspondem ao Vermelho e Infravermelho Próximo, respectivamente. O cálculo do NDVI foi realizado através da calculadora de campo no *software* QGIS versão 3.10. Sendo assim, Rouse et al., (1974) descreveram para o cálculo do NDVI a seguinte equação:

$$\text{NDVI} = (\text{NIR} - \text{R}) / (\text{NIR} + \text{R})$$

Em que:

- ➔ NDVI é o índice de Vegetação por Diferença Normalizada;
- ➔ NIR (*Near Infra-red band*) é a refletância no comprimento de onda correspondente ao Infra-Vermelho Próximo;
- ➔ R (*Red band*) é a refletância no comprimento de onda correspondente ao Vermelho;
- ➔ Refletância é o comportamento característico de reflexão e espalhamento da energia incidente.

A vegetação é caracterizada, assim, por uma intensa absorção devido à clorofila na região do vermelho (0,63 – 0,69 μm) e por uma intensa energia refletida na região do infravermelho próximo (0,76 – 0,90 μm) causada pela estrutura celular das folhas (Melo et al., 2011). Os valores de NDVI variam de -1 a +1 com valores ≤ 0 representando água e terra vazia, enquanto valores ≥ 0 significam vegetação variando de esparsa à cobertura (Krishnaswamy et al., 2009).

Análise espacial da Ecologia da Paisagem

Para a análise espacial buscou-se relacionar a distribuição das espécies e da infecção por *T. cruzi* nos mamíferos capturados com as seguintes métricas: tamanho dos fragmentos (medido em hectare), índice de forma e grau de proximidade, estimado um raio de 500 metros. Para o índice de forma os fragmentos foram classificados em duas classes (até 2 e > 2). Índice de forma até 2 indica que os fragmentos apresentam formas relativamente regulares e acima de 2, são os fragmentos irregulares e, portanto, mais vulneráveis ao efeito de borda. O grau de proximidade é inversamente proporcional ao grau de isolamento e tem relação com o tamanho da área dos fragmentos vizinhos, dentro do raio de 500 metros, isto é, quanto maior a área dos fragmentos, maior o grau de proximidade e, portanto, o fragmento será menos isolado; quanto menor a área dos fragmentos, menor será o grau de proximidade e, portanto, mais isolado.

Análise estatística

Para a análise da hipótese proposta (a infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos está associada às métricas da paisagem), usamos o modelo de regressão múltipla. Para avaliar a correlação entre as 19 métricas da paisagem, NDVI, riqueza e abundância de mamíferos (variáveis explicativas) com a infecção por *T. cruzi* (variável resposta) em pequenos mamíferos e canídeos silvestres foi aplicado o modelo de regressão múltipla e o critério de comparação entre os modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC). Cada modelo é especificado como uma combinação de covariáveis que podem influenciar as probabilidades de os canídeos e pequenos mamíferos serem infectados por *T. cruzi*. Todas as análises foram realizadas no Programa RStudio versão R 3.6.1, sendo adotado o nível de significância ($p < 0.05$).

RESULTADOS

A análise da taxa de desmatamento, durante o período de estudo, indicou uma variação inferior a 6% entre os anos (Tabela 3), sendo considerada pouco expressiva. Por esse motivo, a imagem do ano de 2015 foi usada como base para calcular as métricas da paisagem, tempo médio do período considerado representativo e ano em que houve capturas tanto de pequenos mamíferos quanto de canídeos silvestres. Apesar de, no geral, ter havido perda de área dos fragmentos ao longo dos cinco anos de estudo, houve um ganho de aproximadamente 2% de área nos fragmentos da classe 2 (tamanho médio) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores (absoluto e qualitativo) e porcentagem de perda e ganho de área dos fragmentos por classe em um período de cinco anos (2013 a 2017) na região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil.

| Classe do fragmento | Métrica/Ano Land cover/2013 | Métrica/Ano Land cover/2017 | Diferença: Valor numérico | Diferença: Valor qualitativo | % |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------|
| 1 | 3836700 | 3591900 | 244800 | Perda | 6.38 |
| 2 | 18461700 | 18819000 | 357300 | Ganho | 1.94 |
| 3 | 51246000 | 48390300 | 2855700 | Perda | 5.57 |
| 4 | 55851300 | 51077700 | 4773600 | Perda | 8.55 |
| Total | 129395700 | 121878900 | 7516800 | Perda | 5.81 |

A região do Limoeiro é composta por 425 fragmentos representantes das quatro classes mapeadas, ou seja, de tamanhos que variam de ≥ 0.1 a 1000ha. Não houve fragmentos de tamanhos ≥ 1000 . A maior parte da área de estudo é composta por fragmentos da classe 1 (52% de até 1ha), seguidas da classe 2 (36% de 1 a 10ha), classe 3 (10% de 10 a 100ha) e da classe 4 (1% de 100 a 1000ha).

O cálculo da matriz de distância dos fragmentos com base nas distâncias dos pontos de captura entre pequenos mamíferos e canídeos silvestres foi de 1km. Assim, foi aplicado um *buffer* de 1km com a seleção dos fragmentos dentro desse raio. Obtivemos cinco fragmentos com capturas para pequenos mamíferos e 34 para canídeos silvestres, totalizando 39 fragmentos para análise, dentre os quais foi aplicado o modelo estatístico de regressão múltipla.

Análise espacial da Ecologia da Paisagem

A análise espacial mostrou uma variação no tamanho de fragmentos com capturas de pequenos mamíferos e canídeos silvestres entre 0.2 hectares e 630 ha, sendo que 46% (18/39) desses fragmentos foram da ordem de tamanho de 10 a 630ha, ou seja, fragmentos grandes e/ou muito grandes, 46% (18/39) de fragmentos de tamanho médio e 8% (3/39) de fragmentos pequenos. A distribuição espacial dos animais capturados foi diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos, isto significa que a maioria dos animais foram capturados dentro ou próximo de fragmentos das classes 3 e 4 (Figura 1).

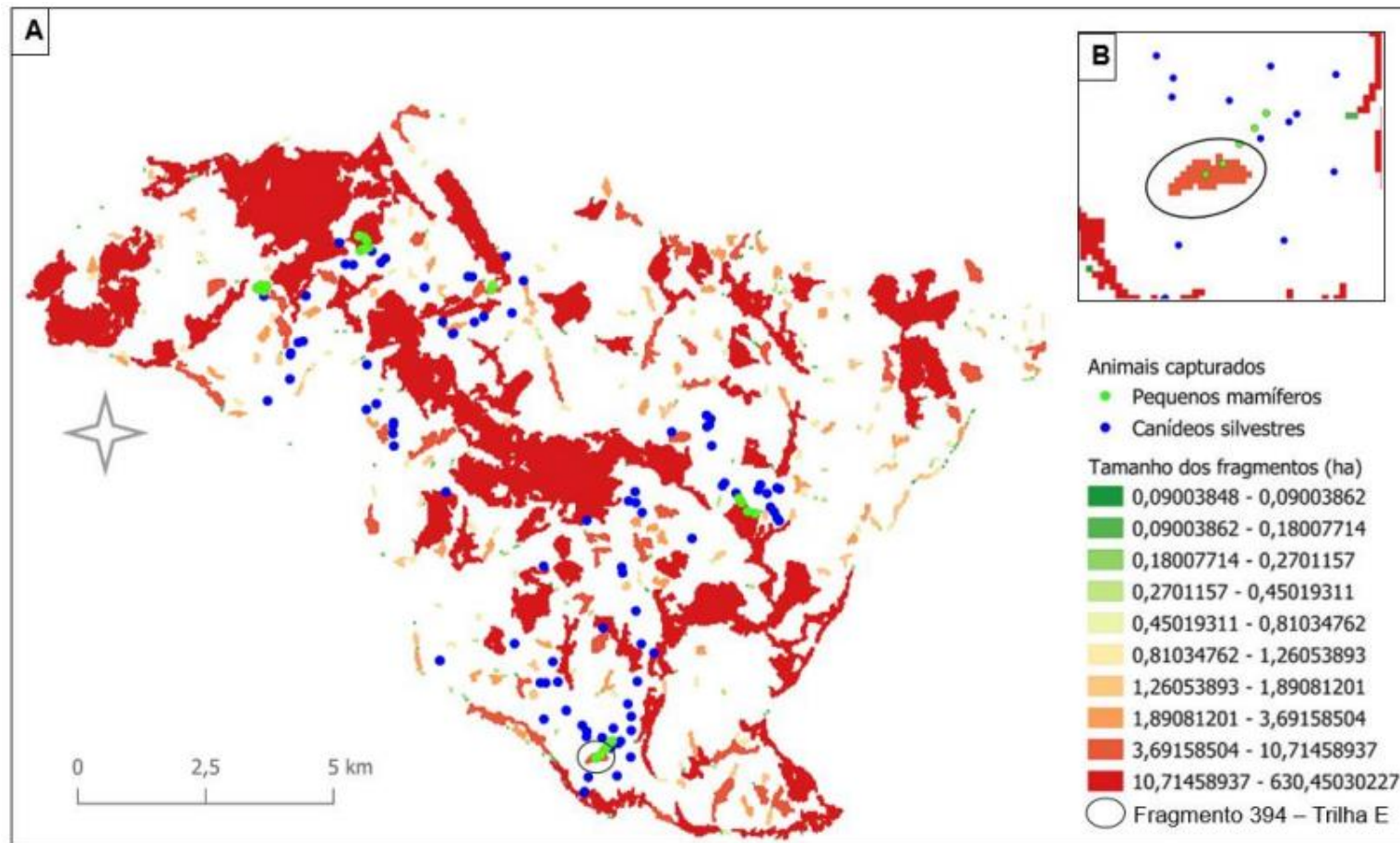


Figura 1 – Relação entre a distribuição espacial das espécies de pequenos mamíferos e canídeos silvestres capturadas com o tamanho da área dos fragmentos (A) que compõem a região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil, destacando o fragmento 394 – Trilha E (B), classificado com tamanho médio e que apresentou percentuais significativos de riqueza, abundância e infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos.

No geral, as variáveis riqueza e abundância das espécies e infecção por *T. cruzi* foram diretamente proporcionais ao tamanho do fragmento. No entanto, analisando os resultados dos animais, em separado, a riqueza das espécies de canídeos silvestres não foi influenciada pelo tamanho do fragmento e, no caso dos pequenos mamíferos não foram amostrados fragmentos de tamanho pequeno para efeitos de comparação. Ainda assim, a riqueza e abundância das espécies de pequenos mamíferos foram maiores quanto maior o tamanho dos fragmentos (Tabela 4). Muito embora, o fragmento 394 - Trilha E (Figura 1), classificado como tamanho médio (3 a 10ha - classe 2), concentrou 60% da riqueza (6/10), 37% da abundância (53/144) e 52% da infecção por *T. cruzi* (13/25) em pequenos mamíferos, sendo que os demais percentuais foram distribuídos nos outros quatro fragmentos.

Tabela 4 – Relação entre a riqueza, abundância das espécies e a infecção por *Trypanosoma cruzi* com o tamanho e o índice de forma dos fragmentos com capturas de pequenos mamíferos e canídeos silvestres

| | Tamanho dos fragmentos (ha) | | | | | | Índice de forma | | |
|------------------------|-----------------------------|----------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------------|---------|-----------|
| | Grande e/ou Muito grande | Médio | | | Pequeno | | <2 (RR)* | >2 (I)* | |
| | | 10 a 630 | 3 a 10 | 1.8 a 3.6 | 1.2 a 1.8 | 0.8 a 1.2 | | | 0.2 a 0.4 |
| Canídeos silvestres | Riqueza | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| | Abundância | 73 | 27 | 10 | 13 | 3 | 4 | 44 | 86 |
| | Infecção | 21 | 7 | 0 | 2 | 2 | 1 | 7 | 26 |
| Pequenos mamíferos | Riqueza | 10 | 6 | - | - | - | - | 6 | 10 |
| | Abundância | 87 | 57 | - | - | - | - | 53 | 91 |
| | Infecção | 12 | 13 | - | - | - | - | 13 | 12 |
| Total* | Riqueza | 13 | 9 | 2 | 3 | 1 | 2 | 9 | 13 |
| | Abundância | 160 | 84 | 10 | 13 | 3 | 4 | 97 | 177 |
| | Infecção | 33 | 20 | 0 | 2 | 2 | 1 | 20 | 38 |

*Total = Soma dos valores de riqueza, abundância e infecção por *T. cruzi* tanto dos canídeos silvestres quanto dos pequenos mamíferos. RR* → Fragmentos com forma relativamente regular (menos vulneráveis ao efeito de borda) e I* → Fragmentos com formas irregulares (mais vulneráveis ao efeito de borda).

Os valores absolutos da infecção por *T. cruzi* nos mamíferos estudados foram diretamente proporcionais à abundância dos animais capturados, que também foi diretamente proporcional ao tamanho do fragmento (Tabela 4). No entanto, quando avaliada a taxa de infecção, a maior porcentagem foi observada nos fragmentos de tamanho pequeno (43% → Pequeno; 20,5% → Médio; 21% → Grande), muito embora

fragmentos desse tamanho não foram amostrados para a captura de pequenos mamíferos, podendo representar um viés do estudo. Na análise espacial, foi observada pelo menos uma área focal onde pequenos mamíferos e canídeos silvestres foram detectados infectados com a mesma DTU TcIII (Figura 2), sendo a distância entre os fragmentos de um pouco mais de 1km (distância esperada para o deslocamento dos canídeos).

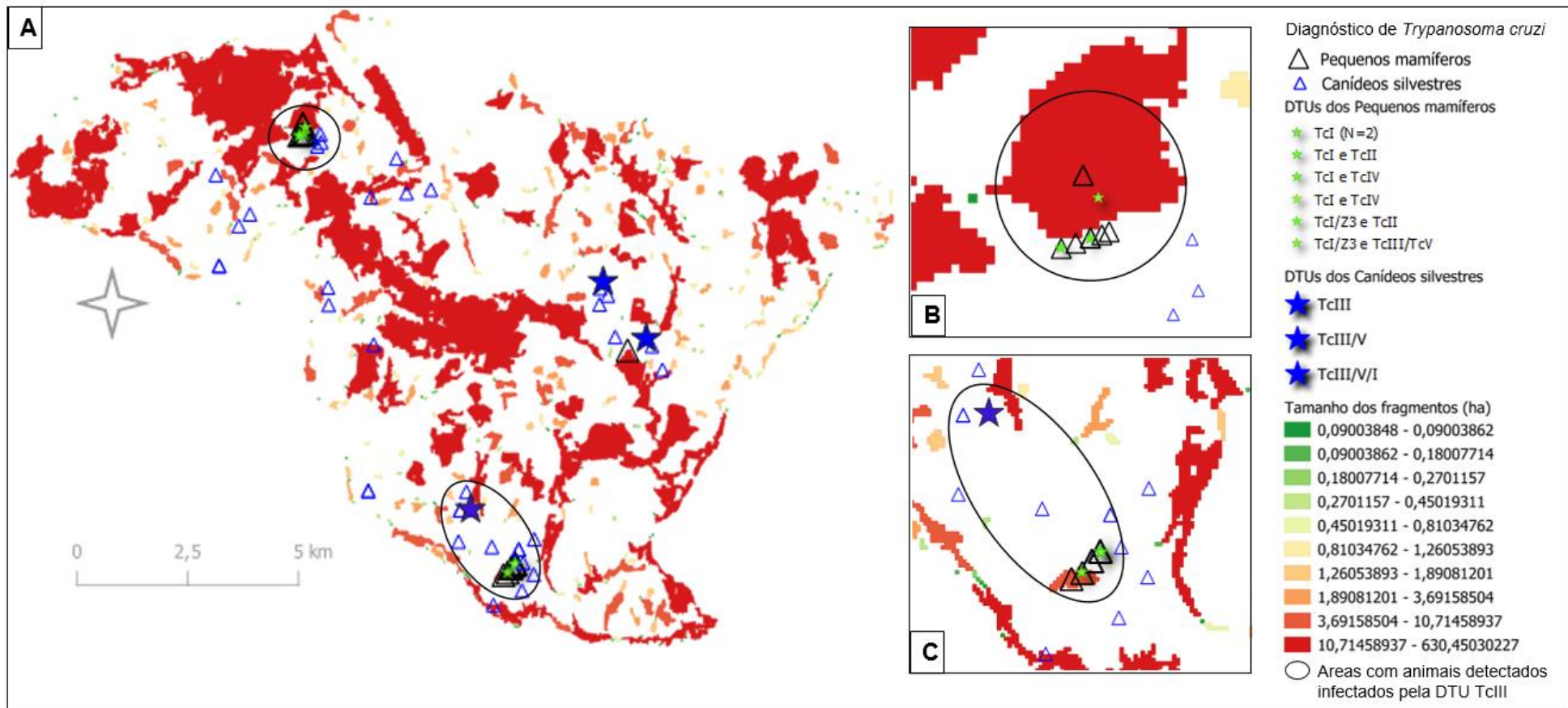


Figura 2 – **(A)** Distribuição espacial da infecção por *Trypanosoma cruzi* nos pequenos mamíferos e canídeos silvestres capturados na região do Limoeiro, Cumari, Goiás, Brasil, mostrando a relação da infecção com o tamanho dos fragmentos e a distribuição das DTUs (Unidades de Tipagem Discretas) encontradas nos animais estudados. Em **(B)** uma área com detecção da DTU TcIII em pequenos mamíferos e em **(C)** uma área focal com presença de pequenos mamíferos e canídeos silvestres detectados infectados com a mesma DTU TcIII.

A maioria (59%; N=23/39) dos fragmentos com capturas de animais apresentou formas irregulares. Não foi observado efeito da forma do fragmento sobre a riqueza de canídeos silvestres, no entanto nos fragmentos com índice de forma irregular foi observado o efeito sobre a abundância e a infecção por *T. cruzi* nos canídeos silvestres e pequenos mamíferos estudados (Tabela 4 e Figura 3). Embora a riqueza e a abundância de pequenos mamíferos tenham sido maiores nos fragmentos com formas irregulares; foi observado que o único fragmento com forma relativamente regular (Índice de forma de 1,13-2 → Fragmento 394/Trilha E) concentrou 60% (N=6/10) da riqueza, 37% da abundância (N=53/144) e 52% da infecção por *T. cruzi* (N=13/25) nesses animais.

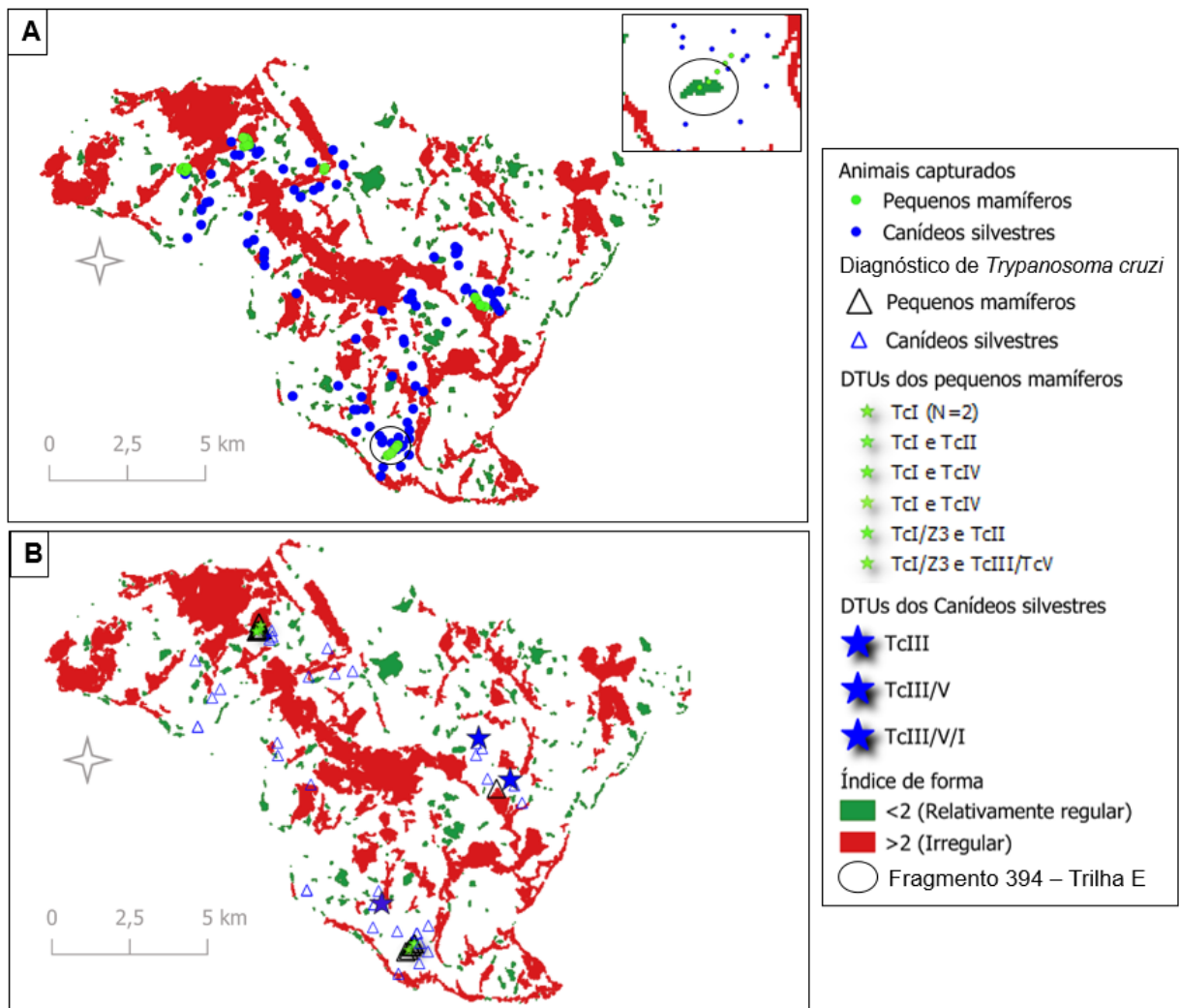


Figura 3 – Relação da distribuição espacial dos animais capturados e da infecção por *Trypanosoma cruzi* com o Índice de forma dos fragmentos com capturas. **(A)**: distribuição de pequenos mamíferos e canídeos silvestres mais capturados dentro ou próximo de fragmentos com formas irregulares (índice de forma >2), destacando o único fragmento com forma relativamente irregular (Fragmento 394 – Trilha E), no canto superior direito. **(B)**: distribuição espacial da infecção por *T. cruzi* (diagnóstico sorológico, parasitológico e caracterização das DTUs) em pequenos mamíferos e canídeos silvestres com os fragmentos com formas irregulares (índice de forma >2).

Foi observado um alto grau de proximidade entre os fragmentos (PXfg= 506 a 7077; N=14) com capturas de pequenos mamíferos e canídeos silvestres (Figura 4), indicando que estão mais conectados e, portanto, menos isolados. Nesses fragmentos foi encontrado o valor total de riqueza das espécies estudadas (100%; N=13), bem como os maiores valores das variáveis abundância das espécies (~50%; N=136/274) e infecção por *T.cruzi* (34,5%; N=21/61) (Figura 4), quando comparados com o grau de proximidade dos demais fragmentos com capturas. No entanto, o fragmento 394 (Trilha E) com baixo grau de proximidade (0,66 – 2,69) apresentou valores de riqueza (54%; N=7/13), abundância (21%; N=58/274) e infecção por *T. cruzi* (23%; N=14/61) significativos.

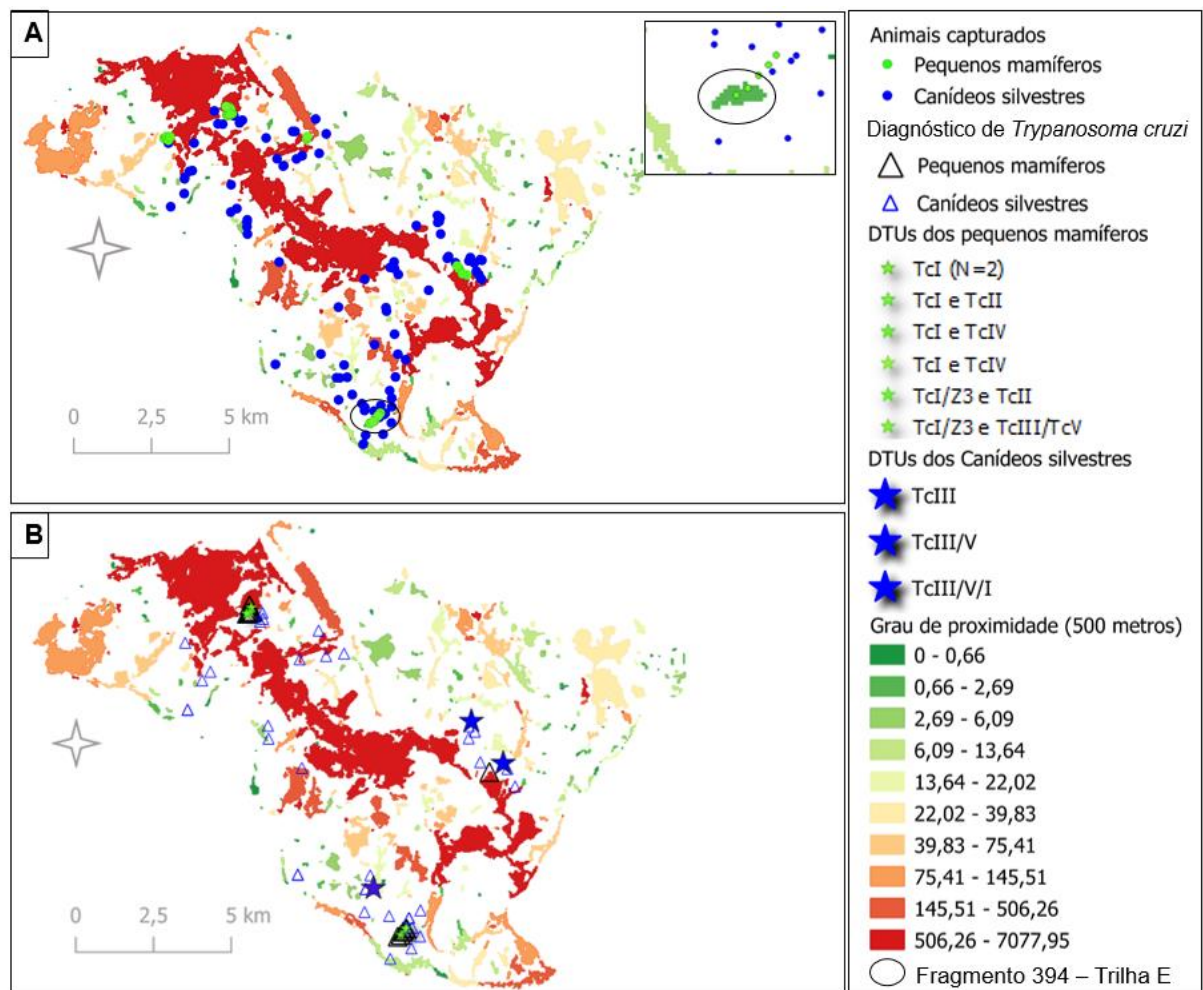


Figura 4 – Relação da distribuição espacial dos animais capturados (**A**) e da infecção por *Trypanosoma cruzi* (**B**) com o grau de proximidade dos fragmentos com capturas. Em (**A**) visualiza-se, no canto superior direito, o fragmento 394 – Trilha E, com baixo grau de proximidade em relação aos demais fragmentos com capturas. A infecção por *T. cruzi* foi realizada através dos diagnósticos parasitológicos, sorológicos e caracterização molecular das DTUs (Unidades de Tipagem Discretas).

Análise estatística

Foram gerados 10 modelos estatísticos, dentre os quais o melhor modelo foi o step, com valor de AIC=10,79, pelo teste ANOVA (Tabela 5). A análise estatística demonstrou que as covariáveis que melhor explicaram a infecção foram: abundância de espécies (p-valor 7.384e-14), *core area_50* (área do núcleo → p-valor 0.001366), *land cover* (cobertura do solo → p-valor 0.001369) e *PXfg_500* (grau funcional de proximidade → p-valor 0.046737) (Tabela 6). A área do núcleo corresponde à porção da mancha que não é afetada pelos efeitos de borda, sendo assim, no presente trabalho, essa métrica foi considerada a partir de 50 metros da borda. O grau de proximidade foi considerado dentro de um *buffer* de 500 metros. Além disso, foi gerada uma árvore de decisão, demonstrando uma relação diretamente proporcional entre a abundância de espécies e a infecção, ou seja, quanto maior a abundância de espécies maiores as taxas de infecção por *T. cruzi* nos mamíferos estudados. O NDVI foi uma variável ambiental que não teve correlação com a infecção por *T. cruzi*.

Tabela 5 – Teste ANOVA comparando os 10 modelos estatísticos gerados e seus valores de AIC (Critério de Informação Akaike)

| | Step | Df | Deviance Resid. | Df | Resid. Dev. | AIC |
|-----------|----------------------|-----------|------------------------|-----------|--------------------|------------|
| 1 | Landscape.Proportion | 0 | 0.000000000 | 22 | 31.30836 | 25.43262 |
| 2 | Edge.density | 1 | 0.002330299 | 23 | 31.31069 | 23.43553 |
| 3 | NN_Area | 1 | 0.048098527 | 24 | 31.35879 | 21.49539 |
| 4 | NNId | 1 | 0.151494330 | 25 | 31.51029 | 19.68335 |
| 5 | Area_ha | 1 | 0.185123391 | 26 | 31.69541 | 17.91180 |
| 6 | Riqueza | 1 | 0.315041647 | 27 | 32.01045 | 16.29753 |
| 7 | Shape_idx | 1 | 0.312442632 | 28 | 32.32290 | 14.67635 |
| 8 | Frac_Dim | 1 | 0.379910621 | 29 | 32.70281 | 13.13207 |
| 9 | Paratio | 1 | 0.087082448 | 30 | 32.78989 | 11.23578 |
| 10 | NDVI.2015 | 1 | 1.337040765 | 31 | 34.12693 | 10.79448 |

Tabela 6 – Modelo final completo da análise estatística, mostrando a relação das covariáveis avaliadas com a infecção por *Trypanosoma cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos silvestres da região do Limoeiro, Cumari/GO

Step: AIC=10.79

Infecção por *T.cruzi* ~ Abundancia + Land.cover + Edge.length + Core_Area.50 + Perimeter + PXfg_500 + NNDist

| | Df | Sum of Sq | RSS | AIC | F value | Pr(>F) |
|----------------|----|-----------|---------|--------|----------|-------------------|
| <none> | | | 34.127 | 10.794 | | |
| + NDVI.2015 | 1 | 1.337 | 32.790 | 11.236 | 1.2233 | 0.277509 |
| + Edge.density | 1 | 0.309 | 33.818 | 12.439 | 0.2745 | 0.604187 |
| + Riqueza | 1 | 0.287 | 33.840 | 12.465 | 0.2543 | 0.617730 |
| + NN_Area | 1 | 0.283 | 33.844 | 12.470 | 0.2510 | 0.620058 |
| + area_ha | 1 | 0.280 | 33.847 | 12.473 | 0.2483 | 0.621938 |
| + Frac_Dim | 1 | 0.248 | 33.879 | 12.510 | 0.2198 | 0.642562 |
| + Shape_idx | 1 | 0.232 | 33.895 | 12.529 | 0.2049 | 0.654042 |
| - NNDist | 1 | 3.483 | 37.610 | 12.585 | 3.1642 | 0.085077 . |
| + NNId | 1 | 0.027 | 34.100 | 12.764 | 0.0235 | 0.879083 |
| + Paratio | 1 | 0.002 | 34.124 | 12.792 | 0.0022 | 0.963006 |
| - Edge.length | 1 | 3.725 | 37.852 | 12.834 | 3.3835 | 0.075448 . |
| - Perimeter | 1 | 3.762 | 37.889 | 12.873 | 3.4173 | 0.074074 . |
| - PXfg_500 | 1 | 4.723 | 38.850 | 13.850 | 4.2905 | 0.046737 * |
| - Land.cover | 1 | 13.616 | 47.743 | 21.889 | 12.3687 | 0.001369 ** |
| - Core_Area.50 | 1 | 13.623 | 47.750 | 21.894 | 12.3744 | 0.001366 ** |
| - Abundancia | 1 | 178.654 | 212.781 | 80.171 | 162.2847 | 7.384e-14 * ** |

Signif. codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

PERSPECTIVAS

Continuando as análises, pretendemos realizar a caracterização de todas as métricas da área de estudo, bem como a caracterização ecológica das seguintes métricas: tamanho dos fragmentos (ha), índice de forma e grau de proximidade para cada espécie de animal estudado. Pretendemos também ampliar a análise estatística, usando como variável resposta a riqueza e a abundância das espécies. Por fim, avaliaremos e ampliaremos os resultados da correlação entre as métricas da paisagem com os dados dos cães domésticos e da infecção por *Leishmania* spp.

Temos também como perspectivas incluir a metodologia de teoria de redes, a fim de explorarmos a conectividade espacial entre os fragmentos e a ecologia da transmissão desses parasitas nos diferentes hospedeiros, visto que *T. cruzi* e *Leishmania* spp. são parasitas que apresentam uma diversidade de ciclos de vida e de métodos de transmissão. Também pretendemos analisar a mobilidade espacial dos canídeos silvestres, utilizando os dados dos colares (VHF - *Very High Frequency*), a fim de identificar possíveis áreas de infecção por *T. cruzi* correlacionando com a taxa de contato entre eles.

3 DISCUSSÃO

Em um ambiente de agroecossistema, como na região do Limoeiro, as espécies silvestres, domésticas e humanas interagem entre si em diferentes graus. As interações entre os três sistemas (meio ambiente, hospedeiros e humanos) permite estabelecer uma estreita rede de interconexões, através da sobreposição de áreas, contato interespecífico e/ou participação na cadeia alimentar (através da relação presa-predador), e mesmo o possível fluxo de transmissão de parasitas entre eles (Thompson 2013; Lemos 2016; Kotviski et al. 2019; Bickley et al. 2019)

Canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos da região do Limoeiro foram diagnosticados infectados por *Trypanosoma cruzi* e espécies de *Leishmania*, com exceção dos lobos-guarás em que não foi detectada infecção por *Leishmania* sp.. Esses grupos de mamíferos possuem uma combinação de características ecológicas que favorecem as oportunidades de infecção por esses parasitas, como a sua dieta, o uso de diferentes habitats e as interações com outras espécies (Sillero-Zubiri 2009; Lessa, Costa 2010; Rocha 2013; Otranto et al. 2015). Uma maior riqueza de espécies de tripanossomatídeos e/ou genótipos de *T. cruzi* foi detectada nos pequenos mamíferos em comparação aos canídeos (Brandão et al. 2019; Brandão et al. 2020), sugerindo que os canídeos possam estar atuando como filtros seletivos de espécies/genótipos de parasitas (controlando e mantendo a infecção em níveis baixos de parasitismo). Como os canídeos ocupam um nível mais elevado na cadeia alimentar quando comparados aos pequenos mamíferos, as interações e exclusão competitiva entre espécies de parasitas no seu organismo certamente desempenham um papel na modulação da proporção das infecções (Rocha et al. 2013). Além disso, a maior riqueza e abundância de espécies de pequenos mamíferos em relação a de canídeos também pode ter influenciado na maior riqueza de parasitas encontrados nos primeiros.

Estudos longitudinais em animais de vida livre são raros, devido a demanda de toda a logística de campo (Rocha 2013; Jansen, Xavier, Roque 2018). No entanto, são muito úteis porque nos permite fazer um acompanhamento do perfil da infecção nos mamíferos de uma área, demonstrando em que momento os animais estão sendo expostos aos parasitas (Silva 2004), os novos casos de infecção, os eventos de soroconversão (no caso dos animais recapturados) e uma melhor compreensão dos potenciais reservatórios desses parasitas na área de estudo, de modo a conhecer o

papel de cada hospedeiro e a sua dinâmica espaço-temporal no ciclo de transmissão silvestre.

De acordo com Roelling et al. (2010), devido às particularidades da interação parasita-hospedeiro, uma determinada espécie pode manter parasitemias maiores e mais longas que outras, o que provavelmente reflete seu potencial de infectar vetores e, portanto, de atuar como reservatório.

Na região do Limoeiro, nossos resultados indicaram que essas infecções parecem estar mais presentes na fauna silvestre. As taxas de infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. foram maiores em canídeos silvestres e em pequenos mamíferos do que nos cães domésticos, o que pode ser explicado pelo fato de que, embora sejam criados soltos e, portanto, possam circular em áreas de transição entre os ambientes domésticos e silvestres, esses cães geralmente passam a maior parte do tempo em torno da sua residência (Durr, Ward 2014; Sepúlveda et al. 2015).

A taxa de infecção por *T. cruzi* foi maior que a de *Leishmania* spp. entre todos os animais estudados, mostrando que a transmissão de *T. cruzi* está bem estabelecida na área (Rocha et al. 2013), com 19% dos canídeos infectados (32% considerando apenas canídeos silvestres) e 21% dos pequenos mamíferos.

A parasitemia, essencial para a transmissão de *T. cruzi* (e atestada por hemoculturas e exames a fresco positivos), foi observada em cães domésticos, *C. thous*, *L. vetulus* e *Gracilinanus agilis*. Apesar da parasitemia detectável nos canídeos, essa representou achados pontuais quando comparada com os achados em *G. agilis*, que parece ter um papel mais importante na manutenção do ciclo de transmissão desse parasita na área, devido a sua competência infectiva, isto é, a capacidade de infectar vetores. Além disso, foi demonstrado que essas quatro espécies de mamíferos compartilham ao menos um mesmo genótipo de *T. cruzi* - DTU TcIII (Rocha et al. 2013), apontando para a possibilidade de interconexão nos ciclos de transmissão desse parasita através da provável conectividade espacial entre eles.

O padrão de infecção por *T. cruzi* apresentado nos canídeos silvestres e domésticos da região do Limoeiro foi semelhante ao observado em outras regiões do Brasil: sorologia positiva, indicando sua exposição ao ciclo de transmissão do parasita e parasitemia pouco detectável, demonstrada pela raridade de hemoculturas ou exame a fresco positivos (Xavier et al. 2012).

A infecção por *T. cruzi* nesses animais parece apresentar um curto período de parasitemia patente durante a fase inicial da infecção, seguida por uma fase crônica com parasitemia indetectável, mesmo em reinfecções (Machado et al. 2001), caracterizando uma curta janela de transmissibilidade.

Em *G. agilis*, a parasitemia patente foi observada em 10% dos animais capturados (7/70), o que indica sua competência para infectar vetores ou outros mamíferos, nesse último caso por predação (Jansen, Xavier, Roque 2015). Isso é indicativo de que, nessa área, *G. agilis* parece ter um papel mais importante no ciclo de transmissão de *T. cruzi* comparado com outras espécies da família Didelphidae, usualmente incriminadas como reservatórios de *T. cruzi* em outras localidades (Orozco et al. 2013; Jansen, Xavier, Roque 2018). Há que se considerar também a importância da relação entre a infecção por *T. cruzi* e a abundância de espécie, uma vez que a abundância relativa de *G. agilis* foi alta (~49%; 70/144) em relação as outras espécies de pequenos mamíferos capturadas.

A taxa de infecção por *T. cruzi* em um hospedeiro é conduzida por processos de contato vetor – parasita – ambiente – mamífero; portanto, podemos esperar que essas diferenças ecológicas levem a diferentes taxas de infecção (Rocha et al. 2013). *G. agilis* possui características biológicas e ecológicas que favorecem sua exposição aos diferentes ciclos de transmissão desses parasitas: apresenta uma dieta onívora que inclui insetos; compartilha refúgios (como árvores ou buracos rochosos) com triatomíneos ou outros insetos vetores, além de explorar diferentes estratos florestais (Lessa, Costa 2010).

A respeito dos cães domésticos, o fato de também circularem em grandes áreas (Durr, Ward 2014; Sepúlveda et al. 2015) pode favorecer seu contato com insetos vetores e pequenos mamíferos infectados ou mesmo contribuir para as interações agonísticas com outras espécies de canídeos silvestres, já relatadas na área (Lemos et al. 2011; Bickley et al. 2019; Lemos et al. 2020). Essas interações apontam para o fato desses grupos de mamíferos estarem envolvidos numa rede sobreposta de transmissão, especialmente, para o caso de *T. cruzi*.

As taxas de infecção observadas para *L. vetulus* foram cerca de duas vezes maiores do que observado para as outras espécies de canídeos silvestres. Devido ao hábito de usar regularmente tocas de tatu, a raposa-do-campo parece estar provavelmente mais exposta à infecção a partir do contato com insetos triatomíneos associados a essas tocas (Dalponte 2009; Lemos, Facure, Azevedo 2011; Lemos et al. 2020), um ecótopo adequado para os triatomíneos vetores (Mendes et al. 2008); além da sua dieta insetívora, sendo o consumo de triatomíneo já relatado na área (Kotviski et al. 2019). Esses são fatores que podem ter contribuído para a maior taxa de infecção por *T. cruzi* nessa espécie de canídeo.

Apesar da plasticidade de *C. thous* quanto ao uso do habitat, esta espécie explora menos microhabitats adequados para triatomíneos do que *L. vetulus* (Lemos 2016). Porém, *C. thous* apresenta uma dieta rica em itens de origem animal, como vertebrados e invertebrados (Kotviski et al. 2019), o que poderia explicar a infecção tanto por *T. cruzi* quanto por *Leishmania* spp.

Já as baixas taxas de infecção em *C. brachyurus* pode ser explicada pelo hábito alimentar dessa espécie que, embora tenha uma dieta generalista, é o mais herbívoro entre os três canídeos silvestres, na região do Limoeiro, consumindo altas porcentagens de frutas (Lemos 2016). Vale ressaltar que o consumo de um único animal/vetor infectado é suficiente para o canídeo infectar-se durante toda a sua vida, especialmente quando se considera que a vida dos canídeos é cerca de quatro ou cinco vezes maior do que a dos pequenos mamíferos, o que aumentam as chances de se infetarem (Brandão et al. 2019).

Tendo o ambiente como um fator modulador das taxas de infecção de um determinado parasita, nossos resultados mostraram que as variáveis: abundância de espécies, área núcleo (50 metros), cobertura do solo e grau de proximidade (500 metros) foram as que melhor explicaram a infecção por *T. cruzi* nos canídeos silvestres e pequenos mamíferos. De fato, as mudanças na composição ou diversidade da fauna podem reduzir ou aumentar a probabilidade de parasitas e seus vetores encontrarem hospedeiros suscetíveis (Ostfeld, Keesing 2000; Civitello et al. 2015; Young et al. 2017), mesmo em se tratando de parasitas multi-hospedeiros, como é o caso do *T. cruzi*, de modo que a abundância das espécies tem uma importância sobre os efeitos diluidor e amplificador de uma determinada parasitose. A respeito das variáveis área do núcleo e cobertura do solo, sabe-se que algumas espécies de pequenos mamíferos são mais dependentes dos fragmentos florestais, enquanto os canídeos silvestres estão mais relacionados à matriz.

Os canídeos podem utilizar os fragmentos florestais como refúgio durante seus deslocamentos, porém quase nunca sua área núcleo, frequentando mais as bordas dos fragmentos. Os cálculos das métricas da área núcleo e do grau de proximidade requerem distâncias especificadas, que podem variar de acordo com a abordagem e a ecologia das espécies do estudo (Oliveira 2018). Sabendo que os canídeos silvestres quase nunca frequentam o interior dos fragmentos florestais e que, por essa razão, as armadilhas para coleta de pequenos mamíferos foram distribuídas nas bordas da maioria dos fragmentos, foi considerada como área núcleo a partir de 50 metros da borda. Para o cálculo do grau de proximidade foi utilizada a distância de 500 metros, levando em consideração também a mobilidade dos canídeos, já que de acordo com estudos sobre deslocamento de pequenos mamíferos em fragmentos de Mata Atlântica, a distância de 100 metros parece ser a distância limite para a movimentação dos mesmos (Pires et al. 2002; Drobovolski 2006). Sendo assim, a distância especificada cobriria o deslocamento dos dois grupos de mamíferos estudados.

A respeito da análise espacial, nossos resultados mostraram que, no geral, as características ecológicas espaciais da área de estudo demonstraram que a infecção por *T. cruzi* em canídeos silvestres e pequenos mamíferos está mais relacionada a fragmentos de maior tamanho, com formas irregulares e maior grau de proximidade. Segundo Volotão (1998), métricas de área e de forma são importantes, pois a riqueza e a abundância de algumas espécies dependem diretamente das dimensões dos fragmentos na paisagem, para garantir sua existência. Em contrapartida, outras espécies tendem a ser favorecidas pelo efeito de borda, particularmente predadores e parasitas (Metzer 1999). Isso pode explicar as maiores taxas de infecção por *T. cruzi* e uma maior abundância de canídeos silvestres em fragmentos irregulares, já que além do tamanho, a forma dos fragmentos também influencia o grau de impacto do efeito de borda (Farina 1998). O grau de proximidade parece ter relativa importância no que diz respeito à formação dos corredores ecológicos, que garantem a conectividade entre os fragmentos de vegetação natural, permitindo o fluxo genético, de matéria e o deslocamento da fauna (Smaniotto 2007).

Apesar das características ecológicas espaciais apresentadas, vale destacar o fragmento 394 (Trilha E), com forma relativamente regular e que apresentou valores expressivos das variáveis analisadas. Segundo Forman, Godron (1986), fragmentos com formas regulares tendem a apresentar uma maior diversidade de espécies. Além do mais, outro fator a ser considerado a respeito desse fragmento é o seu tamanho. Nossos resultados mostraram que apesar de, no geral, ter havido perda de área dos fragmentos durante os cinco anos de estudo, fragmentos da classe 2 (tamanho médio) tiveram um ganho de área de aproximadamente 2%, de modo que esses dois fatores (área e forma dos fragmentos) podem ter contribuído para a correlação positiva com a riqueza e abundância de pequenos mamíferos capturados nesse fragmento.

Sobre a infecção por *Leishmania* spp., nas Américas, mais de 40 espécies de mamíferos já foram descritas como hospedeiras de *Leishmania* spp. (Oliveira et al. 2005); no entanto, apenas uma minoria atua como reservatório, sendo fonte de infecção para flebotomíneos vetores, contribuindo para a dispersão desse parasita na natureza (Quaresma et al. 2011; Roque, Jansen 2014).

A maioria das infecções por *Leishmania* spp. nos pequenos mamíferos foi detectada através da sorologia e, em quatro espécimes (*Gracilinanus agilis*, *Calomys expulsus* e *Oligoryzomys nigripes*) foi detectado DNA de *Leishmania* spp. em órgãos internos (fígado), um tecido que o vetor não tem acesso direto (diferente de sangue ou pele), refletindo seu baixo potencial infectivo; muito embora sua participação na transmissão desse parasita através da via oral (presa-predador) deva ser considerada (Brandão et al. 2019; Lainson et al. 2002; Spotin, Parvizi 2015). A maioria dos canídeos infectados por *Leishmania* spp. estavam co-infectados com *T. cruzi* e apenas uma amostra de pele de *C. thous* apresentou PCR (kDNA) positiva para esse parasita.

As infecções por *Leishmania* spp. estão provavelmente associadas a curtos períodos de maior parasitismo, que não foi detectado em nenhum dos animais investigados durante os anos de acompanhamento, mas que parecem ser suficientes para manter a transmissão desse parasita na área de estudo.

O resultado da interação parasita-hospedeiro é determinado pelo conjunto das variáveis do micro-habitat do hospedeiro e do hospedeiro com o meio ambiente (Thomas et al. 2000; Foratinni 2002). Apesar da extinção, e mesmo a capacidade de um parasita causar dano ao hospedeiro ser um fenômeno natural, a velocidade com que os humanos vêm causando maior impacto negativo à natureza em um intervalo de tempo menor tem gerado um desequilíbrio ambiental e climático global (Andriolo 2007). Uma possível consequência é o estabelecimento de novas relações causadas pela maior proximidade entre a fauna silvestre, doméstica e os humanos, aumentando, com isso, a exposição aos agentes infecciosos que circulam entre eles, de modo que, nesse contexto, todas as vias importam. Isso pode contribuir para aumentar o risco do processo conhecido como *spillover*, que é a aquisição da capacidade de um parasita de saltar entre diferentes espécies - incluindo a habilidade de infectar humanos (Plowright et al. 2017). Um exemplo evidente desse processo é a atual pandemia causada pelo novo coronavírus (Sars-CoV-2), em que se acredita ser o vírus oriundo de animais silvestres, e cujo processo evolutivo resultou em sua capacidade de saltar entre diferentes espécies, até chegar ao homem, de modo que a Covid-19 é apontada como uma doença de origem zoonótica (Plowright et al. 2017; Acosta et al. 2020).

Assim, compreender que os ciclos de transmissão resultam de uma complexa rede de interações entre parasitas, hospedeiros e o meio ambiente significa olhar essas relações sob uma perspectiva de Saúde Única (*One Health*) (Bogich et al. 2012; Zinsstag et al. 2012).

4 CONCLUSÕES

- A transmissão de *Trypanosoma cruzi* na região do Limoeiro ocorre de forma mais intensa (taxas de infecção por animal e por expedição) que a de *Leishmania* spp.; sendo predominantes na fauna silvestre, uma vez que os cães domésticos, embora criados soltos, passam a maior parte do tempo em torno das residências;
- Canídeos silvestres, cães domésticos e marsupiais compartilham a DTU TcIII, e as possíveis interações entre esses animais apontam para a possibilidade de estarem envolvidos numa rede sobreposta de transmissão, através da provável conectividade espacial entre eles;
- A transmissão por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. se manteve ativa na área ao longo do acompanhamento, como atestado pelos eventos de conversão sorológica;
- A transmissão de *Leishmania* spp. está provavelmente associada a curtos períodos de maior parasitismo nos hospedeiros;
- Pequenos mamíferos apresentaram uma maior riqueza de espécies de tripanossomatídeos e/ou genótipos de *T. cruzi* do que os canídeos, que parecem atuar como filtros biológicos;
- A fauna de pequenos mamíferos participa do ciclo de transmissão de *T. cruzi* e podem ser fonte de infecção aos canídeos por meio da predação ou servindo de fonte de infecção para os vetores que podem vir a infectar os canídeos posteriormente;
- *Gracilinanus agilis* é a espécie de pequeno mamífero mais abundante da área e a única com potencial infectivo para *T. cruzi*, indicando um papel diferenciado no ciclo de transmissão desse parasita na área;

- A abundância de espécies, a área núcleo, a cobertura do solo e o grau de proximidade foram as variáveis mais positivamente correlacionadas à transmissão de *T. cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos silvestres;
- As características ecológicas espaciais da região do Limoeiro demonstraram que a infecção por *T. cruzi* em pequenos mamíferos e canídeos silvestres está diretamente relacionada a fragmentos de maior tamanho, com formas irregulares e maior grau de proximidade;
- O grau de proximidade foi a variável comum tanto na análise estatística clássica como na análise espacial, mostrando o papel da conectividade espacial da paisagem para o ciclo de transmissão de *T. cruzi*;
- A aplicação da Ecologia da Paisagem mostrou ser eficaz como ferramenta de identificação de fatores ambientais com potencial para a transmissão de *T. cruzi*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta AL, Xavier F, Chaves LSM, Sabino EC, Saraiva AM, Sallum MAM. Interfaces à transmissão e spillover do coronavírus entre florestas e cidades. *Estud. av.* 2020; 34(99): 191-208.
- Aguirre AA, Tabor GM. Global factors driving emerging infectious diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1149(1): 1–3.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3):e0004349.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, *et al.* *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017; 57:1-29.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes Gonçalves JL, Sparovek G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 2013; 22(6): 711–728.
- Andriolo A. Desafios para a Conservação da Fauna. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo, SP: Roca; 2007. p.19-25.
- Arias JR, Naif RD, Miles MA, de Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1981; 75(4): 537–541.
- Ashford, R.W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 1996; 14(5): 523–532.
- Austad SN. The adaptable opossum. *Sci Am.* 1988; 258(2): 98-105.
- 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 Trop.* 2017; 172, 173–179.
- Batista M. Modelação Geográfica em Processos de Caracterização e Avaliação da Paisagem numa Perspectiva Transfronteiriça [dissertation]. Évora, Portugal: Universidade de Évora. 2014. p.264.
- Bhunias GS, Kesari S, Chatterjee N, Mandal R, Kumar V, Das P. Seasonal relationship between normalized difference vegetation index and abundance of the *Phlebotomus kala-azar* vector in an endemic focus in Bihar, India. *Geospat Health.* 2012; 7(1): 51-62.
- Bickley SM, Lemos FG, Gilmore MP, Azevedo FC, Freeman EW, Songsasen N. Human perceptions of and interactions with wild canids on cattle ranches in central Brazil. *Oryx.* 2019; 54(4): 1–8.
- Bogich TL, Chunara R, Scales D, Chan E, Pinheiro LC, Chmura AA. *et al.* Preventing pandemics via international development: a systems approach. *Plos Med.* 2012; 9(12): e1001354.

Brady CA. Observation on the behaviour and ecology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). In: J. F. Eisenberg (ed.), Vertebrate ecology in the northern neotropics. Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA; 1979. p.161-171.

Brandão EMV. Pequenos mamíferos infectados por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em Cumari/GO: mais uma peça do quebra-cabeças que envolve a transmissão desses parasitas na área. [master's thesis]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2016. 99p.

Brandão EMV, Xavier SCC, Carvalhaes JG, D'Andrea OS, Lemos FG, Azevedo FC, et al. Trypanosomatids in Small Mammals of an Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in an Anthropogenic Landscape. *Pathogens*. 2019; 8(4): 1-17.

Brandão EMV, Xavier SCC, Rocha FL Lima CFM, Candeias ÍZ, Lemos FG, Azevedo FC, Jansen AM, Roque ALR. Wild and domestic canids and their interactions in the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. in an area of the Brazilian cerrado. *Pathogens*. 2020(9): 818.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2003; 97(3): 291–296.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(8): e0004792.

Butler JRA, du Toit JT, Bingham J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. *Biol Conserv.* 2004; 115(3): 369–378.

Caldart ET, Freire RL, Ferreira FP, Ruffolo BB, Sbeghen MR, Mareze M, et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2017; 26(1) 17-27.

Cardoso RM, de Araújo NNSL, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mendes JD. et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasit Vectors*. 2015; 8(1):171.

Carreira JC, da Silva AV, de Pita PD, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit. Vectors*. 2012; 5(1): 111.

Carvalho FMV, Marco-Júnior P, Ferreira LG. The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. *Biol. Cons.* 2009; 142(7): 1329–1403.

- Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM, Roque ALR. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(12):e3389.
- Castañera MB, Lauricella LA, Chuit R, Gurtler RE. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural área of northwestern Argentina. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 1998; 92(6): 671-683.
- Civitello DJ, Cohen J, Fatima H, Halstead NT, Liriano J, McMahon TA, et al. Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(28): 8667–8671.
- Colombo FA, Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati EAB, Pereira-Chioccola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*. 2011; 109(2):267-274.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol*. 2011; 182(1): 14–21.
- Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos IA, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1996; 90(5): 498–502.
- Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(1):e2583.
- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Anez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop*. 2006; 98(13): 247-254.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000; 16(4): 142–144.
- Curi N. Avaliação do estado de saúde e do risco de transmissão de doenças entre canídeos (Mammalia: Carnivora) silvestres e domésticos na região da Serra do Cipó, Minas Gerais: Implicações para conservação. Belo Horizonte: Departamento de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2005.
- Dalponete JC, Courtenay O. Hoary Fox *Pseudalopex vetulus* (Lund, 1842). In: Sillero-Zubiri, C.; Hoffmann, M. & Macdonald, D. W. eds. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK; 2004. p.72-76.
- Dalponete JC. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: Canidae). *Mamm. Species*. 2009; 847: 1–7.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2006; 48(3): 151–156.

- Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit. Vectors.* 2009; 2 (Suppl. 1): 1-8.
- Dario MA, Rodrigues MS, Barros JHDS, Xavier SCC, D'Andrea PS, Roque ALR, 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; 9: 477.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious disease of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Sci.* 2000; 287(5452): 443-449.
- Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em áreas endêmicas de Calazar, no Ceará. *Hospital.* 1955; 48: 61-76.
- Deane MP, Mangia RH, Pereira NM, Momen H, Goncalves AM, Morel CM. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984a; 79(4):495-497.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984b; 79(4):513-5.
- Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83(5): 613-615.
- de Freitas TP, D'Andrea PS, de Paula DA, Nakazato L, Dutra V, Bonvicino CR, et al. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(1): 81-83.
- Dias JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006; 28(2): 83-84.
- Dias JCP, Neto VA. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(Suppl. 2), 68-72.
- Dias, RA. *Canis lupus familiaris*: uma abordagem evolutiva e veterinária / Ricardo Augusto Dias. -- São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo; 2019. 128 p.
- Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RM, Abreu-Silva AL, Santos RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Dev Ctries.* 2008; 2(1):24-33.
- Drobovolski R. A paisagem do Parque Estadual de Itapeva, RS, e seu entorno: padrões, processos e fatores direcionadores. [master's thesis]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006. p. 80
- Dürr S, Ward MP. Roaming behaviour and home range estimation of domestic dogs in Aboriginal and Torres Strait Islander communities in northern Australia using four different methods. *Prev. Vet. Med.* 2014; 117(2): 340-357.

- Eisenberg JF, Redford KH. Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Vol.3. Chicago and London: The University of Chicago Press; 1999. p. 609.
- Farina A. Principles and methods in landscape ecology. London: Chapman & Hall Ltd; 1998. 436 p.
- Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, Lima VMF. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2009; 165(1-2): 150-154.
- Figueiredo FB, Gremiao ID, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar D A, *et al.* First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(2): 200–201.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc).* 2017; 148(3):125-131.
- Forattini, OP. O pensamento epidemiológico evolutivo sobre as infecções. *Rev. Saúde Pública.* 2002; 36(3): 257-262.
- Foroutan M, Khademvatan S, Majidiani H, Khalkhali H, Hedayati-Rad F, Khashaveh S, Mohammadzadeh H. Prevalence of *Leishmania* species in rodents: A systematic review and meta-analysis in Iran. *Acta Trop.* 2017; 172, 164-172.
- Fraga J, Montalvo AM, de Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(2):238-45.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, *et al.* Ancestral genomes, sex and population structure of *T cruzi*. *Plos Pathog.* 2006; 2(3): e24.
- Forman RTR, Godron M. Landscape Ecology. John Wiley and Sons, New York, NY, USA; 1986.
- Grimaldi GJr, Momen H, Naiff RD, Mahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44(6): 645–661.
- Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol.* 2014; 44(9):605–612.
- Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitol.* 2007; 134(1): 69-82.
- Haddad NM. *et al.* Fragmentação de habitat e seu impacto duradouro nos ecossistemas da Terra. *Sci Adv.* 2015; 1(2) Suppl.1; 8-17.
- Hay SI, Lennon JJ. Deriving meteorological variables across Africa for the study of vector-borne disease: a comparison of remote sensing and spatial interpolation of climate. *Trop Med Int Health.* 1999; 4: 58-71.

- Hayward GF, Phillipson J. Community structure and functional role of small mammals in ecosystems. In: Stoddart DM. (Ed.). Ecology of small mammals. London: Chapman and Hall; 1979. p. 135-211.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005; 99(5): 379–388
- Hoare, C. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972. 479p.
- Iranzo EC, Traba J, Acebes P, Gonzalez BA, Mata C, Estades CF, Malo JE. Niche Segregation between Wild and Domestic Herbivores in Chilean Patagonia. *Plos One.* 2013; 8(3): e59326.
- Jácomo ATA, Silveira L, Diniz-Filho JAF. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. *J. Zool.* 2004; 262(1): 99–106.
- Jansen AM, Roque ALR. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: Telleria J., Tibayrenc M., editors. American trypanosomiasis Chagas Disease – on hundred years of research. London: Elsevier; 2010. p. 249-276.
- Jansen AM, Xavier SC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 2015; 151: 1-15.
- Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit. Vectors.* 2018; 11(1): 502.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Natur.* 2008; 451(7181): 990–993.
- Juarez KM, Marinho-Filho J. Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. *J. Mammal.* 2002; 83(4):925-933.
- Kariyeva J, Van Leeuwen WJD. Environmental Drivers of NDVI – Based Vegetation Phenology in Central Asia. *Remote Sensing.* 2001; 3(2): 203-246.
- Kazemi H, Klug H, Kamkar B. New services and roles of biodiversity in modern agroecosystems: A review. *Ecol. Indic.* 2018, 93: 1126–1135.
- Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet Parasitol.* 2008; 152(3-4): 249-256.
- Klink CA, Machado RB. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv. Biol.* 2005; 19(3): 707–713.
- Kotviski BM, Facure KG, de Azevedo FC, Freitas-Junior MC, Lemos FG. Trophic niche overlap and resource partitioning among wild canids in an anthropized neotropical ecotone. *Mastozool. Neotrop.* 2019; 26(2): 368–376.

Krishnaswamy J, Bawa KS, Ganeshaiyah KN, Kiran MC. Quantifying and mapping biodiversity and ecosystem services: utility of a multi-season NDVI based mahalanobis distance surrogate. 2009; 113: 857-867.

Kubacka J, Gerlée A, Foucher J, Korb J, Podmokla E. Correlates of blood parasitism in a threatened marshland passerine: infection by kinetoplastids of the genus *Trypanosoma* is related to landscape metrics of habitat edge. *Parasitol.* 2019; 146(8): 1036-1046.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *British Med Bull.* 1972; 28(1): 44.

Lainson R, Ishikawa EAY, Silveira FT. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96(6): 630-631.

Lainson R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010; 1(2): 13–32.

Lemos FG, Azevedo FC, Costa HCM, May Junior JA. Human threats to hoary and crab-eating foxes in Central Brazil. *Canid News.* 2011; 14.2.

Lemos FG, Facure KG, Azevedo FC, Rosalino LM, Gheler-Costa C. A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado Biome at Central Brazil. In: Rosalino LM and Gheler-Costa C (eds), Middle-sized carnivores in agricultural landscapes, Nova Sciences Publishers, New York; 2011. p. 143-160.

Lemos FG, Azevedo FC, Beisiegel BM, Jorge RPS, Paula RC, Rodrigues FHG, Rodrigues LA. Avaliação do risco de extinção da Raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil. *Bio Brasil.* 2013; 3(1): 160–171.

Lemos FG. Ecologia e Conservação Da Raposa-Do-Campo (*Lycalopex vetulus*) e Interações com Canídeos Simpátricos em Áreas Antropizadas do Brasil Central [dissertation]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2016. p. 168.

Lemos FG, Azevedo FC, Paula RC, Dalponte J. *Lycalopex vetulus*, hoary fox. *IUCN Red List Threat. Species.* 2020; 8235: 1–7.

Lessa LG, Costa FN. Diet and seed dispersal by five marsupials (Didelphimorphia, Didelphidae) in a Brazilian cerrado reserve. *Mamm. Biol.* 2010; 75(1): 10–16.

Lima BS, Dantas-Torres F, de Carvalho MR, Marinho-Junior JF, de Almeida EL, Brito ME, et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2013; 107(9): 592–597.

Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogasuku E, Perez JE, et al. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1999; 93(1): 15–20.

López-Cancino SA, Tun-Ku E, De la Cruz-Felix HK, Ibarra-Cerdeña CN, Izeta-Alberdi A, Pech-May A, et al. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Trop.* 2015; 151: 58-72.

- Lopes CMT, Menna-Barreto RFS, Pavan MG, Pereira MCDS, 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.* 2018; 113(1), 45–55.
- Lukeš J, Butenko A, Hashimi H, Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V. Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends Parasitol.* 2018; 34(6): 466–480.
- Luppi MM, Malta MCC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, *et al.* Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet. Parasitol.* 2008; 155(1-2): 146-151.
- MacArthur RH, Wilson EO. The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton; 1967. p 203
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structures of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(1): 1-12.
- Machado RB. Padrão de Fragmentação da Mata Atlântica em três Municípios da Bacia do Rio Doce - Minas Gerais, e suas consequências para a avifauna. [Master's thesis]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1995.
- Machado EMM, Fernandes AJ, Murta SMF, Vitor RWA, Camilo Júnior DJ, Pinheiro SW, *et al.* A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(6): 958–965.
- Madeira, MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36(5): 551–555.
- Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, Passos SRL. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res. Vet. Sci.* 2009; 87(2), 260-262.
- Malta MC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira AL, Costa EA, Santos RL. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil *Vet. Parasitol.* 2010; 169(1-2): 193-197.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Da Silva FM, *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitol.* 2009; 136(6):641–655.
- Marinho-Filho J, Rodrigues FHG, Juarez KM. The cerrado mammals: Diversity, ecology, and natural history. In: The Cerrados of Brazil; Oliveira P, Marquis R, Eds.; Columbia University Press: New York, NY, USA; 2002. p. 266–284.
- Massara RL. Dieta, uso do habitat e endoparasitas fecais do lobo guará na Serra da Calçada, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. [Master's thesis]. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; 2009.

- McKinney ML, Lockwood JL. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.* 1999; 14: 450–453.
- Medeiros-Sousa AR, de Oliveira Christe R, de Castro Duarte AMR, Mucci LF, Ceretti-Junior W, Marrelli MT. Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. *Malar J.* 2019; 18(1):110.
- Melo ET, Sales MCL, Oliveira JGB. Aplicação do Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) para análise da degradação ambiental da microbacia hidrográfica do Riacho dos Cavalos, Crateús-CE. In: RA'EGA, Curitiba. 2011; 23: 520-533.
- Mendes PC, Beatriz M, de Paula C, Limongi JE. Chagas disease and the space distribution of captured triatomines in Uberlândia, Minas Gerais-Brazil. *Hygeia.* 2008; 3: 176–204.
- Metzger JP. Estrutura da Paisagem e Fragmentação: Análise Bibliográfica. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 1999; 71(3-1): 445-463.
- Metzger JP. O que é ecologia de paisagens? *Biota Neotrop.* 2001; 1(1-2).
- Mills JN, Childs JE. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance of human health. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(4): 529-537.
- Mittermeier RA, Gil RP, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Fonseca GAB. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions, 2nd ed.; University of Chicago Press: Boston, MA, USA; 2005. p. 200.
- Mol JPS, Soave SA, Turchetti AP, Pinheiro GRG, Pessanha AT, Malta MCC, *et al.* Transmissibility of *Leishmania infantum* from maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dogs (*Speothos venaticus*) to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 2015; 212(3-4): 86–91.
- Moonen AC, Bàrberi P. Functional biodiversity: An agroecosystem approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008; 127(1-2): 7–21.
- Morel CM, Deane MP, Goncalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today.* 1986; 2(4):97–100.
- Myneni RB, Hall FB, Sellers PJ, Marshak AL. The interpretation of spectral vegetation indices. *IEEE T Geosci Remote.* 1995; 33: 481-486
- Naveh Z, Lieberman A. Landscape Ecology: Theory and Application. New York. Springer-Verlag; 1994. p.360.
- Nery-Guimarães FV. Leishmaniose e experimental IV–reprodução em hamster (*Cricetus auratus*) de uma leishmaniose cutânea nódulo-tumoral oriunda da Amazônia (histiocitoma leishmaniotico). *O Hospital.* 1951; 40, 11-24.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectores and its hosts. *Vet. Res.* 2009; 40(2):26.

Nunes JB, Laurentti MD, Kanamura HY, Pereira AA, Colombo FA, Marques MJ. *Leishmania infantum* infection in dogs from the Southern region of Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2016; 58: 1-7.

Olifiers N, Gentile R, Fiszton JT. Relation between small mammals species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. *Braz. J. Biol.* 2005; 65(3): 495-501.

Oliveira-Filho AT, Ratter JT. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of Neotropical Savanna*; Oliveira, P.S., Marquis, R.J., Eds.; Columbia University Press: New York, NY, USA; 2002. p. 91–120.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005; 129(3-4): 219–227.

Oliveira JA, Bonvicino CR. Ordem Rodentia. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. (Eds.), *Mamíferos do Brasil*. Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil; 2006. p.347–400.

Oliveira PP. Métricas da paisagem e perspectivas de conservação para Parques em situação de isolamento na cidade de São Paulo: O Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), o Parque Estadual do Jaraguá (PEJ) e o Parque Natural Municipal Fazenda do Carmo (PNMFC), município de São Paulo, SP. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018. p. 422.

Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. Washington, D.C.: 2020; 650p. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52645>.

Orozco MM, Enriquez GF, Alvarado-Otegui JA, Cardinal MV, Schijman AG, Kitron U, *et al.* New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(5): 872–82.

Ostfeld RS, Keesing F. Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool.* 2000; 78(12): 2061–2078.

Otranto D, Cantacessi C, Pfeffer M, Dantas-Torres F, Brianti E, Deplazes P, *et al.* The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Vet Parasitol.* 2015; 213(1-2):12–23.

Paula RC, Rodrigues FHG, Queirolo D, Jorge RPS, Lemos FG, Rodrigues LA. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. *Bio Brasil.* 2013; 3(1): 146–159.

Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Transmission of Chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr res.* 2010; 59: 63-85.

- Peterson NE, Vexemat JA, Rosa ACOC, Lago PRL. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1988; 83 (S1): 28.
- Piccinali RV, Canale DM, Sandoval AE, Cardinal MV, Jensen O, Kitron U, Gurtler RE. *Triatoma infestans* bugs in Southern Patagonia, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 887-889.
- Pires AS, Lira PK, Fernandez FAS, Schittini GM, Oliveira LC. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biol. Conserv.* 2002; 108(2): 229-237.
- Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AI, *et al.* Pathways to Zoonotic Spillover. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15: 502-510.
- Ponzoni FJ, Shimabukuro YE. Sensoriamento Remoto no estudo da vegetação. São José dos Campos: Editora Parêntese; 2007. p. 140.
- Quaresma PF, Rego FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Junior AJ, Teixeira Neto RG, *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105(10): 579–585.
- Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol.* 2009; 136(14): 1915–1934.
- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health.* 2014; 61(7):477–479.
- Ramos VN, Lemos FG, Azevedo FC, Arrais RC, Lima CFM, Candeias IZ, *et al.* Wild carnivores, domestic dogs and ticks: Shared parasitism in the Brazilian Cerrado. *Parasitol.* 2020; 147(6): 689-698.
- Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, Timbó RV, Morais IOB, Lima TM, *et al.* Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet. Med. Sci.* 2019; 6(2):248-256.
- Ribeiro M, Nitz N, Santana C, Moraes A, Hagström L, Andrade R, *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol.* 2016; 162:1-6.
- Ricklefs RE. *A Economia da Natureza*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 546.
- Rios A, Ribeiro M, Sousa A, Pimentel F, Hagström L, Andrade R, *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(1): 3-8.
- Rioux JA. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65(3): 111–125.
- Rocha FL. A rede trófica e o papel dos carnívoros silvestres (Ordem Carnivora) nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*. [dissertation]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2013. p. 148.

- Rocha FL, Roque AL, de Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, de Azevedo FC, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *PLoS One*. 2013; 8(7): e67463.
- Roellig DM, Brown EL, Barnabe C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(7): 1123-1125.
- Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J Parasitol.* 2009; 95(2): 360-364.
- Roellig DM, McMillan K, Ellis AE, Vandeberg JL, Champagne DE, Yabsley MJ. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 2010; 137(6): 959-966.
- Roque ALR, Xavier SCC, da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(5): 742-749.
- Roque ALR, Jansen AM. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41 Suppl.III: 191-193.
- Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(2): e589.
- Roque AL, Xavier SC, Gerhardt M, Silva MF, Lima VS, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Vet Parasitol.* 2013; 193(1-3): 71-77.
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2014; 3(3): 251-262.
- Rose K. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos. *Aust Vet J.* 2004; 82(7):440.
- Rotureau B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(1): 81-96.
- Rouse JW, Haas RH, Schell JA, Deering DW, Harlan JC. Monitoring the vernal advancements and retrogradation (greenwave effect) of nature vegetation. NASA/GSFC Final Report. Greenbelt, MD, NASA. 1974.
- Saf'janova VM. Classification of the genus *Leishmania* Ross. Chapter 11 (in Russian). In: The Leishmaniasis. Protozoology, Academy of Sciences, USSR All Union Society of Protozoologists, Lennigrad, Part 7. 1982. p. 95-101.
- Schallig HO, Silva ES, van der Meide WF, Schonke GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host of zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(3): 387-393.

- Sepúlveda MA, Pelican K, Cross P, Eguren A, Singer RS. Fine-scale movements of rural free-ranging dogs in conservation areas in the temperate rainforest of the coastal range of southern Chile. *Mamm. Biol.* 2015; 80: 290–297.
- Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EA, Lopes EG, Soares RM, Ferreira F. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *Plos One.* 2016; 11(9): e0162854.
- Shida CN, Pivello VR. O contexto do Cerrado Pé-de-Gigante como fragmento: consequências. o desafio da conservação dos recursos naturais do Cerrado Pé-de-Gigante. In: Pivello VR, Varanda EM. O cerrado Pé-de-Gigante (Parque Estadual de Vassununga). São Paulo: SMA; 2005. p. 30-38.
- Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW. (eds). *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs*. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK; 2004. 430 p.
- Sillero-Zubiri C. Family Canidae (dogs). In: *Handbook of Mammals of the World*; Wilson DE, Mittermeier RA. Eds.; Carnivores: Barcelona, Spain; 2009(1). p. 352–447.
- Silva LE. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de produção de suínos. [master's thesis]. Rio Grande do Sul: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004. p. 64.
- Smaniotto M. Análise ambiental de Bacias Hidrográficas com base na fragmentação da paisagem: município de Getúlio Vargas (RS). [master's thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2007. p. 116.
- Souza NP, Almeida ABPF, Freitas TPT, Paz RCR, Duttra V, Nakazato L, Sousa VRF. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43(3): 333-335.
- Spotin A, Parvizi P. Comparative study of viscerotropic pathogenicity of *Leishmania major* amastigotes and promastigotes based on identification of mitochondrial and nucleus sequences. *Parasitol Res.* 2015; 115(3):1221-1228.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1998; 93(5): 669–676.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite.* 2008; 15(3): 226–232.
- Thomas F, Poulin R, Guegan JF, Michalakis Y, Renaud F. Are there pros as well as cons to being parasitized? *Parasitol Today.* 2000; 16(12): 533-536.
- Thomas ME, Rasweilwe IVJJ, D'Alessandro A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102(5): 559-565.
- Tomasini N. Introgression of the kinetoplast DNA: an unusual evolutionary journey in *Trypanosoma cruzi*. *Curr Genomics.* 2018; 19(2):133–139.

- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1993; 68(2): 107–108.
- Thompson RCA. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int. J. Parasitol.* 2013; 43(12-13): 1079-1088.
- Thompson RA, Kutz SJ, Smith A. Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2009; 6(2): 678-693.
- Thompson RC, Lymbery AJ, Smith A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40(10): 1163–1170.
- Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; 92(3): 275-278.
- Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002; 97(6): 887–892.
- Tucker CJ. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Rem Sens Environ.* 1979; 8: 127-150.
- Turner MG, Gardner RH, O’Neill RV. Landscape Ecology in Theory and Practice: Patterns and Process. New York. Springer-Verlag New York; 2001. p. 406.
- Valente ROA, Vettorazzi CA. Análise da estrutura da paisagem na Bacia do Rio Corumbataí, SP. *Sci For.* 2002; 62: 114-129.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. Biology of the kinetoplastida. London: Academic Press. 1976. p. 1–34.
- Volotão CFS. Trabalho de análise espacial Métricas do Fragstats. Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais/INPE. São Jose dos Campos. 1998.
- Wayant NM, Maldonado D, Rojas de Arias A, Cousiño B, Goodin DG. Correlation between normalized difference vegetation index and malaria in a subtropical rain forest undergoing rapid anthropogenic alteration. *Geospat Health.* 2010; 4(2): 179-90.
- Wozencraft WC. Order Carnivora. In: Wilson DE, Reeder DM. Animal species of the world: a taxonomic and geographic reference (2 ed.). Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press; 1993. p. 576.
- Xavier SCC, Roque ALR, Lima VS, Monteiro KJ, Otaviano JC, Ferreira da Silva LF, Jansen AM. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(5): e1647.
- Xavier SCC, Roque ALR, Bilac D, de Araújo VAL, Neto SFC, Lorosa ES, et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(5): e2878.

Young HS, Parker IM, Gilbert GS, Sofia Guerra A, Nunn CL. Introduced species, disease ecology, and biodiversity–disease relationships. *Trends Ecol Evol.* 2017; 32(1): 41–54.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(2):240–253.

Zinsstag J, Mackenzie JS, Jeggo M, Heymann DL, Patz JA, Daszak P. Mainstreaming One Health. *EcoHealth.* 2012; 9: 107-110.