

**Ministério da Saúde**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS (PROTOZOA:  
KINETOPLASTEA) EM MORCEGOS NO PARQUE DAS MANGABEIRAS, BELO  
HORIZONTE, MINAS GERAIS**

**por**

**Mariana Alves Lima**

**Belo Horizonte**

**2023**

**DISSERTAÇÃO MCS – IRR M. A. LIMA**

**2023**

**MARIANA ALVES LIMA**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS (PROTOZOA:  
KINETOPLASTEA) EM MORCEGOS NO PARQUE DAS MANGABEIRAS, BELO  
HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração Transmissores de Patógenos.

Orientação: Dr. José Dilermando Andrade Filho

Coorientação: Dr. Felipe Dutra Rêgo

Belo Horizonte

2023

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740

L628a Lima, Mariana Alves.  
2023

Avaliação da ocorrência de Tripanossomatídeos (Protozoa: Kinetoplastea) em morcegos no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais / Mariana Alves Lima. – Belo Horizonte, 2023

XI, 83 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 57-69

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de Concentração: Transmissores de Patógenos.

1. Trypanosomatidae/patogenicidade. 2. morcegos/parasitologia. 3. Zoonoses/epidemiologia. 4. Parques Comunitários. I. Título. II. Andrade Filho, José Dilermando (Orientação). III. Rêgo, Felipe Dutra (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.93

**MARIANA ALVES LIMA**

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS (PROTOZOA:  
KINETOPLASTEA) EM MORCEGOS NO PARQUE DAS MANGABEIRAS, BELO  
HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração Transmissores de Patógenos.

**Banca examinadora:**

Dr. José Dilermando Andrade Filho (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (IOC/FIOCRUZ) Titular

Dr. Daniel Moreira Avelar (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Carolina Valença Barbosa (IRR/FIOCRUZ) Suplente

**Data defesa:**

25 de agosto de 2023

## AGRADECIMENTOS:

A gratidão é um dos sentimentos mais nobres do homem, desta forma, não poderia deixar de registrar que, a realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas ao longo do meu mestrado. Manifesto minha gratidão a todas elas e, de forma particular:

Agradeço a Deus pela oportunidade que me proporcionou as diversas experiências que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional durante a jornada do mestrado.

Aos meus orientadores Dr. José Dilermando Andrade Filho e Dr. Felipe Dutra Rêgo por todos os ensinamentos e instruções profissionais. Agradeço a confiança e direcionamento durante o processo.

Agradeço aos meus pais, Luciane Alves Lima e Mário Afonso Lima por me incentivar desde a infância, por todo carinho e apoio durante a vida. Mãe, me espelho em sua determinação.

Agradeço ao Davi Tassis por ser o melhor parceiro de vida e se fazer presente em todos os momentos. Muito obrigada por todo incentivo e palavras de conforto, ter você nessa jornada certamente tornou os dias mais leves.

À Débora Capucci por toda parceria, amizade e cumplicidade antes mesmo do início do mestrado. Além do âmbito pessoal agradeço muito por todas as conversas construtivas, orientações e disponibilidade de auxílio a todo momento. Você é uma inspiração profissional para mim.

À Marcela por todo auxílio, interesse e disponibilidade durante o momento que mais precisei. Espero que tenha sido possível contribuir para sua formação da mesma maneira que você me ajudou.

À Jennifer Ferreira para além da amizade pessoal construída durante a graduação agradeço por todos os direcionamentos a respeito dos morcegos. Ter você nessa caminhada fez toda diferença.

À Gabriela pela amizade, conselhos, incentivo durante todo o processo e momentos de descontração.

À Carol Dantas por ensinamentos que vão muito além da ciência, e que ficarão comigo por toda vida. Muito obrigada pela receptividade, bons momentos de conversas e risadas do dia a dia.

À Aldenise por todo entusiasmo com os resultados do estudo, você me motivou e incentivou em momentos de exaustão.

À Flávia Bittencourt pela ajuda, presteza e ensinamentos durante a realização de técnicas moleculares.

À Tina por todo auxílio e ensinamento na técnica de cultivo.

À Carol Cunha e Carina Margonari por toda disponibilidade e pela inspiração como profissionais exemplares.

Agradeço o Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL), pela oportunidade de desenvolver este trabalho

Aos meus amigos por todo companheirismo e cumplicidade, em especial ao Leonardo Carvalho que esteve comigo desde a graduação.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – mais especificamente a Dra. Sônia Talamoni do laboratório de Mastozoologia pela parceria estabelecida e bem-sucedida em ambos os estudos.

À Plataforma de Sequenciamento do Instituto René Rachou/Fiocruz-MG.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os tripanossomatídeos são protozoários endoparasitas obrigatórios que atuam como agentes etiológicos de doenças em diferentes organismos. Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* encontrados em humanos são os de maior interesse em vista de dados epidemiológicos da doença de Chagas, leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral. Em que, esta última originalmente restrita ao ambiente silvestre vem apresentando registros em áreas urbanas, tendo em vista a adaptação de hospedeiros e vetores a este novo ambiente. Apesar da fauna de morcegos de Belo Horizonte ser bastante conhecida, poucos estudos foram realizados no âmbito de saúde pública. Um recente estudo no Parque Municipal das Mangabeiras indica a presença de flebotomíneos infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, reforçando o ciclo de transmissão das leishmanioses na região. Logo, o objetivo foi investigar a ocorrência de tripanossomatídeos em quirópteros coletados no Parque das Mangabeiras, município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram realizadas seis campanhas de captura no ano de 2022, nos meses maio, junho, julho e dezembro utilizando redes de neblina. Foram coletadas amostras de baço, coração, fígado, pele de orelha, membrana alar e sangue para realização de testes parasitológicos (inóculo em meio de cultura) em 152 amostras e moleculares em 186 amostras em *nested* PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S. Dentre 56 morcegos que compreendem 5 espécies, *Artibeus lituratus* foi mais abundante (50%), seguido por *Sturnira lilium* (21,4%) e *Carollia perspicillata* (10,7%). As amostras submetidas ao diagnóstico parasitológico em meio de cultura não apresentaram positividade, sendo a maioria descartada devido à ausência de crescimento de protozoários (68,4%). Dentre as 186 amostras submetidas a técnica molecular 11 (5,9%) apresentaram resultado positivo para a presença de tripanossomatídeos, sendo 6 (54,5%) identificados como *Leishmania infantum* nas seguintes espécies de morcegos: *A. lituratus*, *C. perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Platyrrhinus lineatus*; três (27,3 %) para *Trypanosoma* sp. Neobat 3 (*A. lituratus*, *S. lilium*); um (9,1%) para *Le. braziliensis* (*P. lineatus*); e um (9,1%) para *Trypanosoma* sp Neobat 4 (*A. caudifer*). A presente pesquisa revela resultados significativos sobre a fauna de quirópteros e sua infecção por tripanossomatídeos em um parque urbano, fornecendo informações valiosas para a compreensão da ecologia e epidemiologia desses animais em áreas urbanas de Belo Horizonte.

**Palavras-chave:** Tripanossomatídeos, Morcegos, Parque urbano, Zoonoses

## ABSTRACT

Trypanosomatids are obligate endoparasitic protozoans that act as etiological agents of diseases in different organisms. The genera *Leishmania* and *Trypanosoma* found in humans are the most interesting in view of epidemiological data on Chagas Disease, Cutaneous Leishmaniasis and Visceral Leishmaniasis. The last mentioned, originally restricted to the wild environment, have been registered in urban areas, in view of the adaptation of hosts and vectors to this new environment. Despite the fact that the bat fauna of Belo Horizonte is well known, few studies have been carried out in the field of public health and a recent study in the Municipal Park of Mangabeiras indicates the presence of sandflies infected with different species of *Leishmania*, reinforcing the transmission cycle of leishmaniasis in the region. The present study aimed to investigate the occurrence of trypanosomatids in bats collected in Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. In the year 2022, six captures were carried out (May, June, July, and December) using mist nets. Spleen, heart, liver, ear skin, alar membrane and blood samples were collected for parasitological (inoculum in culture medium) and molecular tests – nested PCR directed at the V7V8 region of the 18S gene. Fifty-six bats belonging to five species were captured, with *Artibeus lituratus* being the most abundant (50%), followed by *Sturnira lilium* (21.4%) and *Carollia perspicillata* (10.7%). The samples submitted to parasitological diagnosis in culture medium did not show positivity. Among the 186 samples submitted to the molecular technique (Nested PCR v7v8), 11 samples (5.9%) were positive for the presence of trypanosomatids, of which: six (54.5%) *Leishmania infantum* identified in the following species: *A. lituratus*, *C. perspicillata*, *G. soricina* and *P. lineatus*; three (27.3%) *Trypanosoma* sp. Neobat 3 (*A. lituratus*, *S. lilium*); a sample (9.1%) for *Le. braziliensis* (*P. lineatus*); and one (9.1%) for *Trypanosoma* sp Neobat 4 (*A. caudifer*). The present research reveals significant results about bat fauna and their trypanosomatid infection in an urban park, providing valuable information for understanding the ecology and epidemiology of these animals in urban areas of Belo Horizonte.

**Keywords:** Trypanosomatids, Bats, Urban park, Zoonoses.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem representativa da árvore filogenética da família Trypanossomatidae baseada principalmente no gene 18S rRNA com destaque para os tipos de ciclo de vida. .... 14
- Figura 2: Localização do Parque das Mangabeiras no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. .... 24
- Figura 3: Imagem representativa do local de coleta “Ciranda dos Brinquedos” no PM - MG. .... 25
- Figura 4: Imagem representativa da coleta e processamento dos morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais..... 26
- Figura 5: Procedimento de eutanásia e coleta de fragmento de órgãos e tecidos dos morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. .... 28
- Figura 6: Imagens representativas das espécies de morcegos capturados no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022..... 29
- Figura 7: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de sangue de morcego submetidas a PCR dirigida ao gene citocromo B. .... 34
- Figura 8: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de órgãos e tecidos de morcego submetidas a PCR dirigida ao gene gama actina..... 40
- Figura 9: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de sangue de morcego submetidas a Nested PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S da SSU rRNA.. .... 41
- Figura 10: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de órgãos e tecidos de morcego submetidas a Nested PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S da SSU rRNA..... 42
- Figura 11: Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de órgãos e tecidos de morcego submetidas a Nested PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S da SSU rRNA.....42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Classificação taxonômica de exemplares quirópteros capturados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, de acordo com o sexo..... 34
- Tabela 2: Espécies de morcego por mês de coleta no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022. .... 35
- Tabela 3: Classificação dos morcegos capturados no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, de acordo com o sexo e condição reprodutiva. .... 35
- Tabela 4: Resultado das amostras de morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, submetidas ao meio de cultura para tentativa de isolamento de parasitos ..... 38
- Tabela 5: Resultados dos órgãos positivos de morcegos e sequenciamento da região V7V8 de amostras coletadas no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022..... 44
- Tabela 6: Resultado das amostras positivas das espécies de morcegos por órgãos, coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022. .... 46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CN – Controle negativo

COBEA – Comissão Nacional de Bem-Estar Animal

CP – Controle positivo

Cyt b – Citocromo B

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza

kDNA – DNA mitocondrial

LIT – *Liver infusion tryptose*

LC – Leishmaniose cutânea

LV – Leishmaniose visceral

MERS-COV – Síndrome respiratória do Oriente Médio por coronavírus

MG – Minas Gerais

Mg – Miligramas

MOTU - Unidade Taxonômica Operacional Molecular

NGS - *Next-Generation Sequencing*

NNN – Novy-MacNeal-Nicolle

OIE - *World Organization for animal Health*

OPS – Organização Panamericana de Saúde

Pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PUC – Pontifícia Universidade Católica

PM – Parque das Mangabeiras

RMBH – Região Metropolitana de Belo Horizonte

SARS-COV – Síndrome respiratória aguda grave por coronavírus

SBCAL – Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSU rRNA – Subunidade menor do RNA ribossomal

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. Família Trypanosomatidae: Diversidade e status taxonômico</b> .....	12
<b>1.2. Quirópteros: Aspectos gerais, ecológicos e sua relação com parasitos da família Trypanosomatidae</b> .....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	21
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1. Aspectos éticos, legais e de biossegurança</b> .....	22
<b>4.2. Rede de Colaboradores</b> .....	22
<b>4.3. Caracterização da área de estudo - Parque das Mangabeiras</b> .....	23
<b>4.4. Captura, processamento, identificação e eutanásia de quirópteros</b> .....	24
<b>4.5. Eutanásia e coleta de material biológico dos morcegos</b> .....	26
<b>4.7. Isolamento de Trypanosomatidae em meio de cultura</b> .....	30
<b>4.8. Extração e quantificação de DNA</b> .....	30
<b>4.9. Controles endógenos da PCR</b> .....	31
<b>4.10. <i>Nested</i>-PCR para detecção molecular de Trypanosomatidae</b> .....	32
<b>4.11. Reação para sequenciamento de DNA</b> .....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	33
<b>5.1. Fauna de Quirópteros</b> .....	33
<b>5.2. Infecção natural por Trypanosomatidae</b> .....	36
<b>FONTE: Elaborado pela autora</b> .....	39
<b>5.3. Detecção molecular de Trypanosomatidae</b> .....	40
<b>5.5. Análise comparativa da positividade de quirópteros por tripanossomatídeos</b> .....	43
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Família Trypanosomatidae: Diversidade e status taxonômico

Os tripanossomatídeos são protozoários pertencentes ao filo Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981, à classe Kinetoplastea, à ordem Trypanosomatida Kent, 1880 e à família Trypanosomatidae Doflein, 1901. A classe é caracterizada pela presença de cinetoplasto, uma região constituída por ácido desoxirribonucleico (DNA) extranuclear e mitocondrial, denominado kDNA que se apresenta em grande número de cópias. O kDNA está associado a bolsa flagelar, e está presente em todas as formas de vida desses protozoários (Vickerman, 1976).

A ordem Trypanosomatida é composta por endoparasitas obrigatórios contendo um único flagelo que emerge de forma lateral ou apical da bolsa flagelar que se liga ao kDNA (Schneider & ochsenreiter, 2018). Durante muito tempo a classificação dos tripanossomatídeos era baseada nas formas evolutivas encontradas no ciclo celular: amastigota, coanomastigota, esferomastigota, epimastigota, opimastigota, promastigota, tripomastigota (Hoare, 1972), entretanto, abordagens filogenéticas têm sugerido a classificação destes protozoários de acordo com as semelhanças genéticas (Yurchenko *et al.* 2021).

A família Trypanosomatidae é composta por parasitos que possuem associação ecológica com ampla gama de hospedeiros, como:

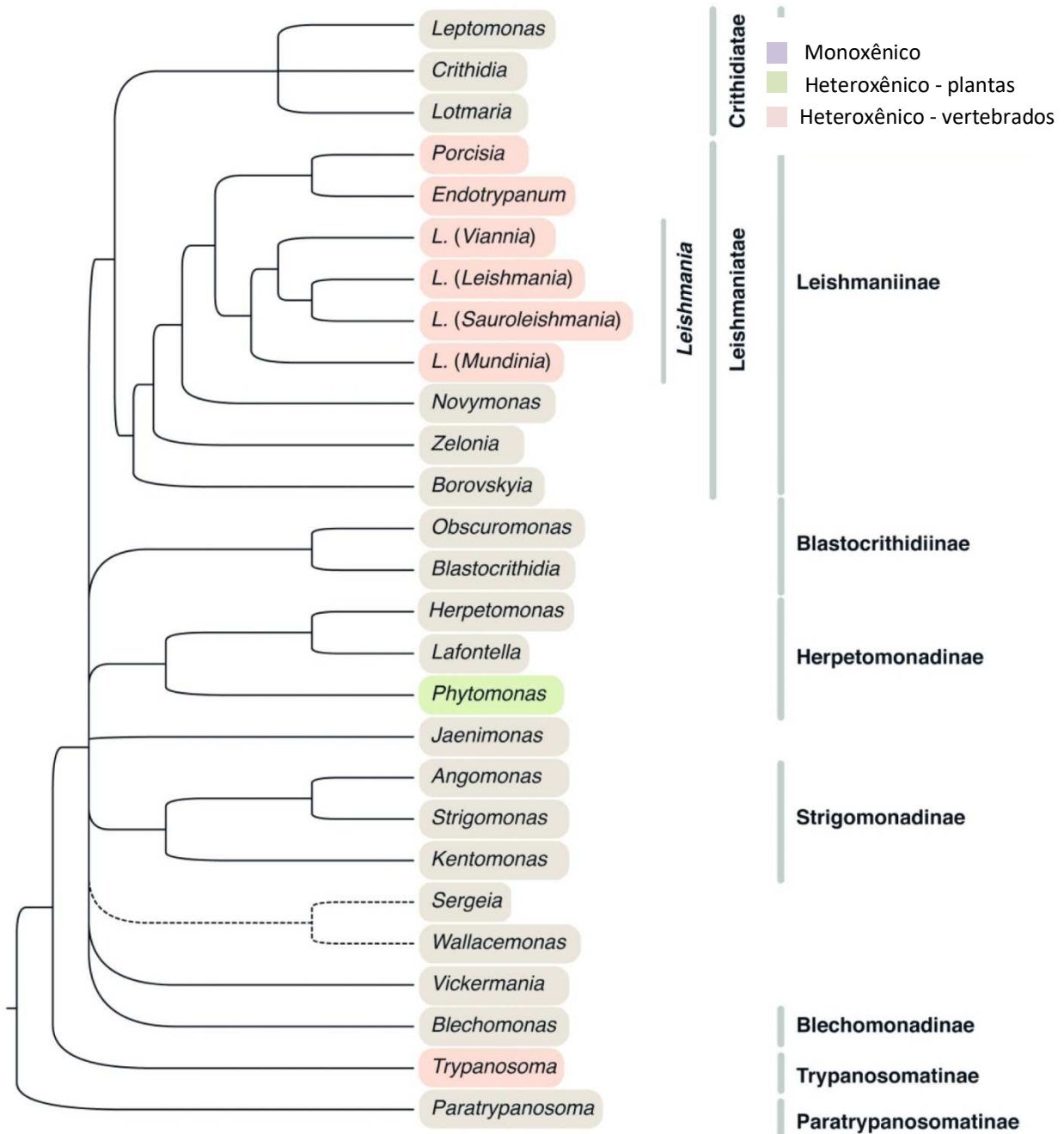
- Insetos: *Angomonas* Souza & Corte Real, 1991, *Blastocrithidia* (Laird, 1959), *Blechomonas* Votýpka & Sukóva, 2013, *Crithidia* Léger, 1902, *Kentomonas* Votýpka, Yurchenko, Kostygov & Lukeš, 2014, *Leptomonas* Kent, 1880, *Lotmaria* Evans & Schwarz, 2014, *Novyimonas* Kostygov & Yurchenko, 2020, *Herpetomonas* Kent, 1880, *Paratrypanosoma* Votýpka & Lukeš, 2013, *Sergeia* Svobodová, Zidková, Cepicka, Oborník, Lukeš & Votýpka), *Strigomonas* (M. Lwoff & A. Lwoff, 1931, *Wallaceina* Frolov & Kolesnikov, 1999 e *Zelonia* Shaw, Camargo & Teixeira, 2017.
- Plantas: *Phytomonas* Donovan, 1909.
- Animais vertebrados (incluindo seres humanos): *Endotrypanum* Mesnil & Brimont, 1908; *Leishmania* Ross, 1903, *Porcisia* Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 e *Trypanosoma* Gruby, 1843 (Kaufer *et al.*, 2017).

Destes, *Leishmania* e *Trypanosoma*, patógenos encontrados em seres humanos, são os de maior interesse médico, sendo responsáveis pela leishmaniose visceral (LV) e

cutânea (LC), doença de Chagas nas Américas e doença do Sono na África, respectivamente (Figura 1).

Esses protozoários podem ser classificados em dois grupos não taxonômicos segundo Hoare, 1972: monoxênicos, que possuem apenas um hospedeiro ao longo do ciclo de vida, como *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Zelonia* (Kostygov *et al.* 2021; WALLACE *et al.*, 1983) havendo casos que podem ser considerados patogênicos. Já os heteroxênicos contam ciclo de vida envolvendo no mínimo dois hospedeiros, sendo um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado ou planta, como *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Porcisia* (Hoare, 1972; Kostygov *et al.* 2021). A localização da origem do flagelo e sua exteriorização em conjunto com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo mais as características da membrana ondulante e a forma do parasito na porção anterior e posterior são características que, quando combinadas, podem auxiliar na identificação dos tripanossomatídeos (Hoare & Wallace, 1966).

**FIGURA 1** - Imagem representativa da árvore filogenética da família Trypanossomatidae, baseada principalmente no gene 18S rRNA com destaque para os tipos de ciclo de vida.



O gênero *Leishmania* é um dos mais ricos em termos de diversidade, sendo cerca de 38% das espécies patogênicas para os seres humanos e no Novo Mundo estão classificadas nos subgêneros *Leishmania* Lainson & Shaw, 1987, *Mundinia* Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 e *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 (Espinosa *et al.*, 2018). A *Leishmania* é comprovadamente



transmitida por insetos conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) a uma vasta gama de vertebrados incluindo o homem, somando aproximadamente 70 espécies (Bruschi & Gradoni, 2018).

A classificação destes protozoários, que por vez era baseada no seu desenvolvimento no trato digestório dos flebotomíneos, foi atualmente revista baseada em inferências filogenéticas (Espinosa *et al.*, 2018). No Brasil, até o momento, foram identificadas e formalmente descritas dez espécies de *Leishmania* em circulação. Duas pertencem ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (L.) infantum* Nicolle, 1908 e *Leishmania (L.) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972, uma pertence ao subgênero *Mundinia*: *Leishmania (Mundinia) enriettii* Muniz & Medina, 1948, e as outras sete pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (V.) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (V.) lainsoni* Silveira *et al.*, 1987, *Leishmania (V.) lindenbergi* Silveira *et al.* 2002, *Leishmania (V.) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Leishmania (V.) shawi* Lainson *et al.*, 1989 e *Leishmania (V.) utingensis* (BRAGA *et al.* 2003).

Estes parasitos, estão associados tanto a LV quanto a LC, doenças que são influenciadas por fatores sociais, econômicos e ambientais (OPAS, 2019). Além disso a leishmaniose visceral é considerada uma zoonose que anteriormente era transmitidas por vetores restritos a áreas silvestres, e que ao longo das últimas décadas vem apresentando mudanças no perfil epidemiológico, de modo que casos autóctones têm sido registrados em áreas urbanas em diversas regiões do Brasil. Essa dinâmica ocorre em algumas situações devido ao desequilíbrio ambiental causado pelas atividades humanas, que tem ocasionado à adaptação do vetor e do reservatório a estes ambientes modificados (Barata *et al.* 2005, Quintana *et al.* 2020; ROSÁRIO *et al.* 2017).

Os protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma* são classificados em oito subgêneros: *Aneza* Özdikmen, 2009, *Megatrypanum* Hoare, 1964, *Schizotrypanum* Chagas, 1909, *Herpetosoma* Doflein, 1901, *Duttonella* Chalmers, 1908, *Nannomonas* Hoare, 1964, *Pycnomonas* Hoare, 1964 e *Trypanozoon* Lühe, 1906, de modo que estes podem ser agrupados de acordo com sua forma de transmissão, sem que isso represente uma classificação taxonômica. As espécies cujo desenvolvimento ocorre no trato digestório posterior, sendo liberadas nas fezes, são denominadas Stercoraria, representadas por três subgêneros: *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*, destacando-se as espécies *T. cruzi*, *T. lewisi* e *T. theileri*. Aquelas espécies em que o desenvolvimento é parcial no tubo digestório e chegam às glândulas salivares sendo inoculadas mecanicamente na forma de tripomastigotas metacíclicas, são descritas como Salivaria (subgêneros *Aneza*, *Duttonella*, *Nannomonas*,

*Pycnomonas* e *Trypanozoon*), que inclui as espécies *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli* (Hoare, 1964; 1972; Kostygov *et al.* 2021.).

Originalmente, a classificação dos tripanossomatídeos baseava-se em características morfológicas, ciclo de vida e hospedeiros. Nos últimos anos, a classificação tem sido integrada à filogenia molecular para estabelecer novas espécies e suas classificações taxonômicas com maior precisão (ADL *et al.*, 2019). Atualmente, a classificação vem sendo realizada a partir de regiões conservadas, como a V7V8 presente no gene 18S da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA), que é considerada um código de barras para análise da diversidade e detecção de tripanossomatídeos (Dario *et al.* 2017 b; Dario *et al.* 2021). Além disso, o gene que codifica a enzima glicosomal gGAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) também tem sido utilizado para identificação taxonômica e filogenética dos tripanossomatídeos de forma geral (Borghersan *et al.*, 2013; Boucinha, 2020; Marcili *et al.*, 2014). Assim, em meio a controvérsias taxonômicas ainda existentes, o gênero *Trypanosoma* encontra-se dividido em determinados clados bem estabelecidos, incluindo:

- Clado *Trypanosoma cruzi*, que engloba diversas espécies do Novo e Velho Mundo, incluindo aquelas exclusivas de morcegos (Lima *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 2001; 2008).
- Clado *Trypanosoma brucei*, que contém espécies provenientes do continente africano e é transmitido por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) (Stevens *et al.* 1999; 2001).
- Clado aquático, que possui tripanossomas encontrados em peixes, anfíbios, isolados de ornitorrincos e tartarugas (Ferreira *et al.*, 2007; *et al.* 2008).
- Clado *Trypanosoma avium*/ *Trypanosoma corvi*, que inclui tripanossomas de aves (Sehgal *et al.* 2001).
- Clado *Trypanosoma lewisi*, que é transmitido por pulgas e compreende espécies que parasitam as ordens Rodentia, Lagomorpha e Insectivora (Hamilton *et al.* 2005).
- Clado *Trypanosoma theileri*, com protozoários encontrados na ordem Artiodactyla (Hamilton *et al.* 2005; Rodrigues *et al.*, 2006).

Dentre os clados mencionados, destaca-se o clado *Trypanosoma cruzi*, que compreende a espécie de mesmo nome descrita por Chagas, 1909, constitui-se como grupo geneticamente heterogêneo e atua como agente etiológico da doença de Chagas em seres humanos (Zingales *et al.*, 2012). Sua transmissão ocorre por meio de insetos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) infectados, principalmente por dois modos: ao defecarem sob a pele do hospedeiro

após a alimentação sanguínea, liberando formas infectantes presentes nas fezes e na urina; ou por meio de alimentos contaminados com vetores infectados (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). O *T. cruzi* é considerado uma espécie heterogênea do ponto de vista genético, segregando-se em sete diferentes unidades de tipagem discreta (DTUs) circulantes entre mamíferos e insetos vetores. Esta classificação tem como objetivo agrupar os parasitos de acordo com a diversidade genética, características biológicas, epidemiológicas e patológicas (Zingales *et al.*, 2012).

Por meio de estudos bioquímicos e moleculares, o *T. cruzi* é subdividido nas linhagens TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e Tcbat, (Lima *et al.*, 2015); em que a linhagem Tcbat associada a morcegos antrópicos era até pouco tempo considerada exclusiva desses animais foi detectada em humanos (Zingales, 2011; Ramírez *et al.*, 2014; Guhl *et al.*, 2014). Adiciona-se que a diversidade dos tripanosomas é muito vasta, e em alguns casos pouco se conhece acerca da biologia e os vetores desses parasitos; sendo intitulado de Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU) aquelas sequências genéticas de novas espécies (Clément, 2020). Nesse sentido é possível destacar MOTUs verificadas em quirópteros, e nomeadas como *Trypanosoma* sp. Neobat (Alves *et al.* 2021; Cottontail *et al.* 2014; Rodrigues *et al.* 2019).

A conhecida diversidade genética dos tripanossomatídeos que ainda é subestimada visto a recorrência de espécies descritas reflete uma complexa relação taxonômica que sem dúvidas está associada a ampla distribuição geográfica dos parasitos, vetores e hospedeiros, de modo que estudos que abordem aspectos ecológicos em cada elo que compõe esta rede pode fornecer percepções importantes sobre a interação parasito-hospedeiro e a evolução desses organismos.

No que tange aos tripanossomatídeos - em particular o *T. cruzi* e a *Leishmania*, sabe-se que estes protozoários possuem uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, dos quais destacam-se mamíferos como primatas, roedores, marsupiais, carnívoros, xenartros, ungulados, lagomorfos e quirópteros (Dobson, 2005; Lampo *et al.*, 2000, Roque & Jansen, 2014). Devido ao fato de compartilharem habitats semelhantes, esses mamíferos coabitam e servem como fonte de alimento para os vetores hematófagos, como flebotomíneos e triatomíneos (Lampo *et al.*, 2000).

As doenças causadas pelos agentes etiológicos citados pertencem a um grupo vasto em que a ocorrência está associada a problemas sistêmicos da saúde do ambiente, devido ao desenvolvimento urbano desenfreado e o desmatamento de áreas nativas. O cenário urbano se torna propício ao estabelecimento, adaptação e proliferação de diferentes vetores (em especial

os insetos) e patógenos, possibilitando a transmissão de doenças zoonóticas como a leishmaniose visceral. (Almeida *et al.* 2020; Ellwanger & Chies, 2019). Ellwanger *et al.* 2020). Sendo possível constatar que a saúde dos seres humanos e animais está diretamente integrada ao meio ambiente (OIE, 2022)

## **1.2. Quirópteros: Aspectos gerais, ecológicos e sua relação com parasitos da família Trypanosomatidae**

Os animais da ordem Chiroptera, também conhecidos como quirópteros, são mamíferos alados que apresentam diversas adaptações morfológicas, como membranas finas e elásticas e ossos leves e tubulares (Fenton, 1992; Kunz & Racey, 1998). A realização do voo verdadeiro possibilita também que os quirópteros desempenhem um papel importante na ecologia, atuando no controle de pragas por meio da predação de insetos, na dispersão de sementes e na polinização de plantas, em que, sua presença é essencial para a manutenção de vários ecossistemas (Fujita & Tuttle, 1991; Reis *et al.*, 2007). Anteriormente a ordem Chiroptera era dividida nas subordens Microchiroptera e Megachiroptera. Esta divisão era baseada em aspectos morfológicos, paleontológicos, nos diferentes modos de percepção sensorial, ultrassom e visão. Entretanto, foram realizados estudos moleculares que mostraram que uma família de Microchiroptera (Rhinolophoidea) estaria associada aos Megachiroptera (Teeling *et al.* 2002; Teeling *et al.* 2018). Assim, surgiu a classificação atual em que a ordem Chiroptera é subdividida nas subordens Yinpterochiroptera, e Yangochiroptera (Amador *et al.*, 2016), somando ao total mais de 1.400 espécies em todo mundo (Simmons & Cirranello, 2022). No Brasil, são encontradas nove famílias de morcegos, incluindo Noctilionidae, Molossidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Emballonuridae, Thyropteridae, Natalidae, Mormoopidae e Furipteridae, totalizando 68 gêneros e 181 espécies (Garbino *et al.* 2020).

Em condições naturais, os morcegos ocupam diferentes tipos de abrigos, como cavernas, troncos de árvores e folhagens. Esses animais podem ser classificados de acordo com seu nível de dependência em relação às cavidades naturais, sendo troglótenos aqueles que visitam cavernas regularmente ou ocasionalmente, troglóbios, os que vivem exclusivamente em cavernas e troglófilos, os que vivem dentro das cavernas, mas não exclusivamente (Vandel, 2013). Todavia, a escolha dos abrigos pelos morcegos envolve a interação de diversos fatores físicos, como temperatura, umidade, ar e luz, além de fatores bióticos, como disponibilidade de alimento, predação e competição. Cada espécie possui suas próprias preferências ecológicas

(Kunz, 1982; Torquetti *et al.* 2017; Trajano, 1985). No entanto, observa-se que o cenário natural está cada vez mais sendo modificado devido à destruição e fragmentação dos habitats naturais, especialmente em áreas cársticas, podendo ocasionar um maior contato dos morcegos com seres humanos e animais domésticos, à medida que procuram alimento e abrigo (Kunz, 1982; Reis, 2002; Tencate *et al.*, 2012). Muitas espécies têm se adaptado e até se beneficiado em ambientes modificados pela presença humana, utilizando-se de construções urbanas como fonte de abrigo (Reis, 2002). Por outro lado, algumas espécies persistem ao se estabelecerem em fragmentos naturais no meio urbano (Silva de Araújo & Bernard 2016). Neste contexto, a presença de quirópteros sobretudo no ambiente urbano e periurbano desperta preocupação em saúde pública haja vista os morcegos atuam como reservatórios e hospedeiros de diversos patógenos comuns aos seres humanos e outros animais.

Estes animais também têm sido recentemente associados como reservatórios naturais de inúmeros vírus que por muitas vezes causam infecções humanas sem contato direto, por meio de fenômenos como transbordamento zoonótico (Drexler *et al.*, 2012; Quan *et al.* 2013; Han, 2015). Os morcegos são também encontrados com infecção por bactérias (Kosoy *et al.* 2010), fungos (Meteyer *et al.* 2012), protozoários (Schaer *et al.* 2013) e helmintos (Lichtenfels *et al.* 1981) que por vezes se apresentam de forma assintomática (O’Shea *et al.* 2014) e representam risco ao causarem doenças em humanos e outros animais (Brook & Dobson, 2015). Um fator preponderante no que concerne à saúde pública é a alta mobilidade e dispersão destes animais durante o voo, contribuindo para a propagação dos parasitos (Zhang *et al.* 2013).

É visto em estudos prévios que morcegos podem atuar como reservatórios de protozoários do gênero *Trypanosoma* e hospedeiros de espécies de *Leishmania* no Brasil e em outros países (Azami-Conesa *et al.* 2021; Roque & Jansen, 2014). Dentre estes albergam inúmeras espécies do clado *T. cruzi* (*T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. livingstonei* e *T. wauwau*) (Lima *et al.* 2012; Lima *et al.* 2013, Lima *et al.* 2015). No Brasil, diversos estudos têm sido realizados para investigar a presença de tripanossomatídeos em morcegos, contribuindo para a compreensão da diversidade desses protozoários e sua relação com os quirópteros. Métodos moleculares, como a análise do DNA, têm sido amplamente utilizados para identificar e caracterizar os tripanossomatídeos presentes nessas espécies de morcegos (Rangel *et al.* 2019; Vieira *et al.* 2022). Além disso, esses estudos têm investigado a prevalência, distribuição geográfica e fatores associados à infecção por tripanossomatídeos em diversas populações de morcegos de diferentes regiões do país (Alves *et al.* 2021); demonstrado a variedade das espécies de parasitos em morcegos brasileiros e destacando a importância

desses animais como potenciais reservatórios e disseminadores desses protozoários (Castelo-Branco *et al.* 2023; Ratzlaff *et al.* 2022). Os resultados desses estudos têm contribuído para a ampliação do conhecimento sobre a epidemiologia e a ecologia dessas infecções, auxiliando na implementação de medidas de controle e prevenção adequadas para a saúde humana e animal.

Essas informações evidenciam a importância dos morcegos como reservatórios e disseminadores de patógenos, o que reforça a necessidade de estudos para compreender a relação entre esses animais e os tripanossomatídeos, como o gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*. Deste modo, estudar os quirópteros e sua relação com parasitos da família Trypanosomatidae é fundamental para compreender a diversidade desses mamíferos alados, bem como o papel que desempenham como hospedeiros e sua contribuição para a epidemiologia desses parasitos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram a elevada susceptibilidade dos morcegos à infecção por diversos agentes patogênicos, principalmente protozoários da família Trypanosomatidae (De Araujo *et al.*, 2022; Roque & Jansen, 2014; Vieira *et al.*, 2022). A relevância desses animais como hospedeiros nos ciclos naturais de diferentes patógenos é ampliada devido aos seus hábitos ecológicos, que abrangem vastas regiões geográficas e adaptação a diversos ambientes, incluindo áreas urbanas (Lampo *et al.*, 2000). Além disso, o contato entre morcegos e seres humanos tem aumentado devido às ações antrópicas, como a expansão urbana desordenada e a proximidade com áreas silvestres, o que pode favorecer a transmissão de doenças.

Entre os anos de 2017 e 2022, foram registrados em Belo Horizonte um total de 2.666 casos confirmados de LV e 2.108 casos de LC (Sinan, 2023). Estudos na capital têm evidenciado a presença de espécies vetoras de parasitos do gênero *Leishmania*, como *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia whitmani*, bem como flebotomíneos com infecção natural e detecção molecular de *Leishmania* (Souza *et al.*, 2004; Margonari *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2010, 2011).

Apesar de haver um bom conhecimento sobre a fauna de morcegos na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Perini *et al.* 2014), poucos estudos foram realizados no contexto da saúde pública, investigando especificamente a presença de agentes patogênicos nesses animais. Um estudo recente identificou a presença de *Le. infantum* nas espécies *Eumops auripendulus* e *Eptesicus brasiliensis* coletadas em Belo Horizonte e Caeté, reforçando o papel

desses morcegos nos ciclos naturais da *Leishmania* (De Araújo *et al.*, 2022). Além disso, Serra e Meira *et al.*, 2022 também realizaram coletas em cavernas do Parque das Mangabeiras, que indicaram a presença de uma possível espécie vetora (*Evandromyia edwardsi*) infectada com diferentes espécies de *Leishmania* (*Le. amazonensis*, *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Leishmania* sp.). Diante desses achados, torna-se fundamental investigar a presença de tripanossomatídeos em hospedeiros/reservatórios sinantrópicos e silvestres encontrados em diferentes ecótopos, a fim de compreender melhor os ciclos de transmissão zoonótica de doenças emergentes e reemergentes que podem ter impacto na saúde pública.

Assim, este estudo justifica-se pela necessidade de preencher a lacuna de conhecimento sobre a presença de tripanossomatídeos em morcegos da região urbana de Belo Horizonte, contribuindo para a compreensão dos potenciais riscos à saúde pública e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle dessas doenças. Além disso, a pesquisa fornecerá dados importantes para embasar ações de vigilância epidemiológica e subsidiar políticas públicas voltadas para a conservação da biodiversidade e a promoção da saúde ambiental.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar a ocorrência de tripanossomatídeos em quirópteros coletados no Parque das Mangabeiras, município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Descrever a fauna de quirópteros coletados no Parque das Mangabeiras;
2. Verificar a infecção natural de quirópteros por parasitos da família Trypanosomatidae;
3. Detectar a presença de DNA de tripanossomatídeos em diferentes amostras biológicas de quirópteros.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aspectos éticos, legais e de biossegurança**

Todos os procedimentos técnicos realizados na coleta de animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, seguindo as orientações e normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto René Rachou - Fiocruz Minas (Nº 37/21-5; Anexo 1) e da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (Nº14/2022; Anexo 2). Todas as autorizações necessárias foram obtidas junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Essas medidas garantem o cumprimento das exigências éticas, legais e de biossegurança durante o desenvolvimento do estudo.

Todos os procedimentos de captura dos morcegos e coleta de material biológico foram realizados por profissionais devidamente treinados e qualificados. Durante as atividades de campo, os profissionais estavam equipados com os devidos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), incluindo luvas, máscaras, macacões de segurança e calçados adequados. Além disso, foi exigido que todos os profissionais envolvidos tivessem um calendário vacinal atualizado, incluindo a vacinação antirrábica. Essas medidas visam garantir a segurança tanto dos profissionais quanto dos animais envolvidos no estudo, seguindo as boas práticas de biossegurança e minimizando os riscos de contaminação e transmissão de doenças.

### **4.2. Rede de Colaboradores**

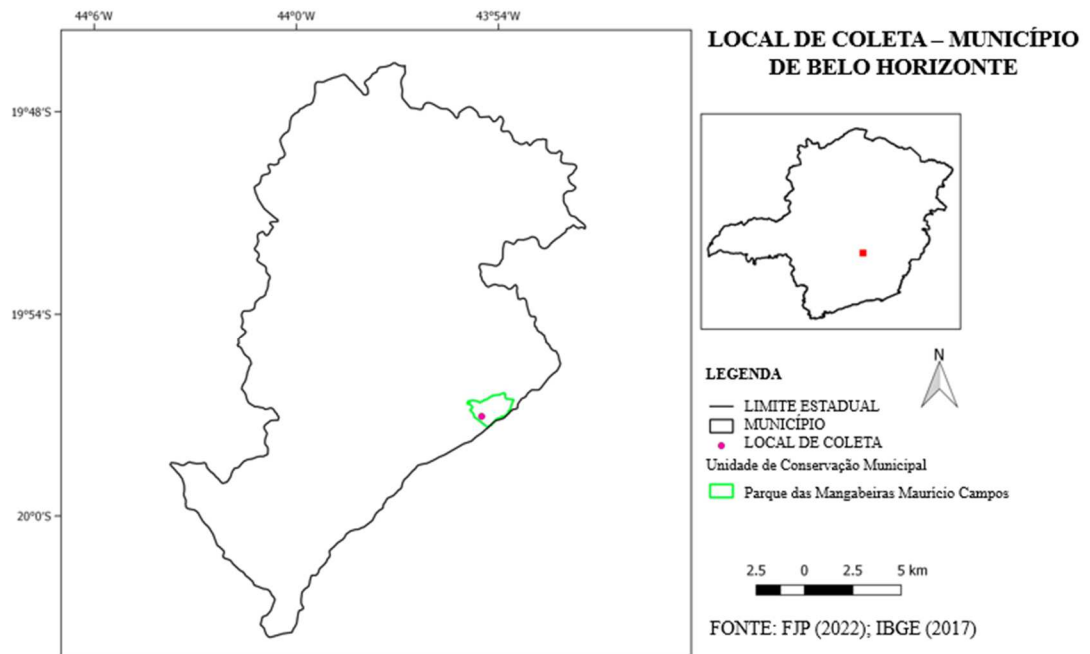
A captura dos animais e coleta das amostras biológicas dos morcegos foram realizadas em colaboração com o laboratório de Mastozoologia do Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MINAS). Essa parceria permitiu a integração de conhecimentos e recursos entre os pesquisadores envolvidos, contribuindo para o desenvolvimento conjunto do estudo. Além disso, é importante ressaltar que parte dos animais coletados, bem como certas amostras biológicas dos tecidos analisados, foram utilizados também em um projeto de pesquisa coordenado pela Dra. Sônia Aparecida Talamoni em conjunto com a aluna de mestrado Jennifer Ferreira, intitulado "Comparação da Concentração de Metais Pesados em Diferentes Matrizes Biológicas de Morcegos". Essa colaboração ampliou as possibilidades de análise e interpretação dos resultados, enriquecendo o conhecimento científico na área.



### 4.3. Caracterização da área de estudo - Parque das Mangabeiras

O Parque das Mangabeiras (PM) está localizado na região centro-sul de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao pé da Serra do Curral e na fronteira norte do Quadrilátero Ferrífero (Figura 2). Criado em 1966, é considerado um dos maiores parques urbanos da América Latina, abrangendo uma área de 245,2 hectares. O parque tem como objetivo principal a conservação da fauna, flora e dos recursos hídricos, além de oferecer atividades de uso público (BAHIA *et al.* 2009; PBH, 2022). O clima predominante na região, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, é do tipo subtropical de altitude (*Cwb*), caracterizado como temperado úmido com inverno seco (BECK *et al.*, 2018). A temperatura média anual em Belo Horizonte é de 21,1°C, com verões quentes e úmidos de dezembro a março, e invernos mais secos entre junho e setembro. O PM possui uma altitude variando entre 987 e 1342 metros, apresentando uma vegetação predominante de mata atlântica, com a presença de trechos de cerrado, como o campo sujo e o campo cerrado, principalmente nas encostas. A diversidade biológica do parque é notável, abrigando diversas espécies de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (PBH, 2023). Entre os mamíferos encontram-se esquilos, gambás, tapitis, micos, tatus e quatis, sendo este último recentemente objeto de estudo quanto a ectoparasitas e patógenos (PBH, 2023; Estevam *et al.*, 2020). O PM também desempenha importantes serviços ambientais, como a produção e infiltração de água, polinização, banco genético de espécies endêmicas e ameaçadas, equilíbrio térmico, entre outros (MMA/IBAMA, 2020). O parque é um destino popular para a prática de ecoturismo, atraindo cerca de 15 mil visitantes por mês. Além das atividades recreativas e esportivas, o PM oferece programas educativos sobre preservação da natureza.

**FIGURA 2:** Localização do Parque das Mangabeiras no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.



FONTE: Leandro Aguiar Souza.

#### 4.4. Captura, processamento, identificação e eutanásia de quirópteros

As capturas dos quirópteros foram realizadas utilizando redes de neblina (*mist nets*) em um local específico de coleta chamado "Ciranda dos Brinquedos" (19°57'03.3"S 43°54'30.4"W) (Figura 3). Esse espaço é aberto ao público, com uma área de recreação voltada para o lazer infantil, cercado por vegetação de Floresta Estacional Semidecídua. Em cada coleta foram utilizadas 10 redes de neblina com uma área de 12 m x 3 m cada, sendo dispostas de 18h à meia-noite, com inspeção periódica em intervalos de aproximadamente 30 minutos. No total, foram realizadas seis coletas nos meses de maio/22, junho/22, julho/22 e dezembro/22.

**FIGURA 3:** Imagem representativa do local de coleta “Ciranda dos Brinquedos” no PM - MG.



**LEGENDA:** a) Placa de sinalização no PM para a Ciranda dos Brinquedos; b) Imagem próxima do local de coleta, evidenciando elementos que compõe a Ciranda dos Brinquedos; c) Imagem geral da Ciranda dos Brinquedos com destaque presença de visitantes. **FONTE:** Elaborado pela autora.

Os morcegos capturados foram colocados em sacos de algodão individualizados para a coleta de dados biológicos e biométricos. Para garantir o bem-estar dos animais, foram realizadas observações clínicas dos principais parâmetros vitais durante o período de manipulação (Figuras 4 a, b), e uma solução de água com sacarose foi oferecida a cada indivíduo utilizando uma pipeta de transferência descartável (Figura 4 c). A ossificação completa das epífises metacarpais dos animais foi utilizada para a classificação etária dos indivíduos adultos e a ossificação incompleta para classificação dos indivíduos jovens. Foram registrados o sexo dos quirópteros por meio de observação visual das características sexuais dos indivíduos; sendo evidência e estado das mamas nas fêmeas, e evidência de testículos nos machos. Além disso, foi realizada a pesagem para determinação da massa corporal (em gramas) com o uso de um dinamômetro tubular, e a medição do comprimento do antebraço (em milímetros) com o auxílio de um paquímetro digital. A identificação das espécies foi realizada seguindo a chave taxonômica proposta por Vizotto & Taddei (1973) e Gardner (2008).

**FIGURA 4:** Imagem representativa da coleta e processamento dos morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.



**LEGENDA:** a) Avaliação dos sinais clínicos e reprodutivos em campo; b) Exemplar morcego capturado durante o estudo; c) Oferta da solução de água com sacarose com auxílio de pipeta descartável. **FONTE:** Elaborado pela autora.

Os animais capturados que se encontravam em situação de ameaça de extinção de acordo com a IUCN (2022), assim como as fêmeas prenhas, lactantes, com filhotes, ou que possuíam anilhas de identificação, foram imediatamente soltos conforme os protocolos de biossegurança em campo seguindo as diretrizes determinadas pelos protocolos ambientais, de ética e os objetivos do trabalho em relação a padronização dos dados. Aqueles selecionados para o estudo foram conduzidos ao laboratório de Mastozoologia do Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados da PUC Minas para os procedimentos de eutanásia e coleta de material biológico. Esses procedimentos seguiram as diretrizes éticas e legais estabelecidas pelos comitês de ética em pesquisa e pela legislação vigente (CEUA N° 37/21-5; SISBIO N°s: 80543-4, 15237-2, 82980-1).

#### **4.5. Eutanásia e coleta de material biológico dos morcegos**

Antes da coleta de material biológico dos morcegos, foi administrada uma dose anestésica via injeção intraperitoneal de tiopental sódico de acordo com as especificações do

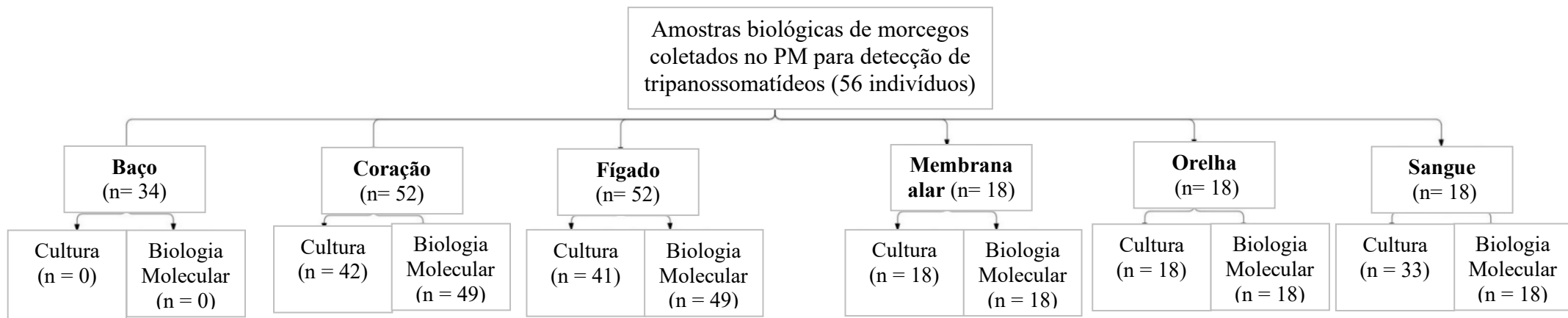
fabricante (0,50 mg/kg de massa corporal) para permitir a coleta de sangue por punção cardíaca e posterior avaliação da presença de tripanossomatídeos em meio de cultura, bem como a realização de técnicas moleculares, seguindo o protocolo descrito por Favoretto *et al.* (2019). Após a administração da anestesia, os morcegos foram posicionados em decúbito dorsal para a eutanásia, que foi realizada por meio da injeção intraperitoneal de uma dose letal de tiopental sódico (3 vezes a dose anestésica). Após a eutanásia, os morcegos foram fixados individualmente com alfinetes em estruturas de isopor, conforme ilustrado na Figura 4. Em seguida, foi feito um corte sagital na cavidade abdominal utilizando instrumentação cirúrgica, como bisturi, tesouras e pinças autoclavadas, sendo coletadas amostras biológicas de baço, coração, fígado e membrana alar, aproximadamente 20 mg de cada (Figura 5). As amostras foram rotuladas com números de identificação individual e os tecidos foram acondicionados em solução RNA later (RNAlater®, Invitrogen), enquanto as amostras de sangue foram armazenadas em tubos com EDTA, sendo todas mantidas a -20°C até a extração de DNA total. Fragmentos de tecidos e órgãos destinados ao exame parasitológico de cultura foram mantidos a 4°C por pelo menos 72 horas em tampão fosfato salino pH 7,2 (PBS 1x) suplementado com antibióticos (penicilina 5.000 U/mL e estreptomicina 5.000 µg/mL) e antifúngico (5-fluorocitosina 50 mg/L), para posterior inóculo em meio de cultura, ao passo que, as amostras de sangue foram inoculadas imediatamente em meio de cultura. Após a coleta do material biológico, os morcegos foram destinados à Coleção Científica de Mamíferos do Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (Anexo 6). Para a realização das técnicas de detecção por meio de cultura e métodos moleculares em amostras biológicas não foi possível a obtenção dos fragmentos elencados em todos os morcegos do estudo (n=56). Logo foram utilizados fragmentos de baço (34), coração (49), fígado (49) membrana alar (18), orelha (18) e alíquotas de sangue (18); devido a adversidades no momento da coleta, sendo utilizadas 152 amostras para o cultivo e 186 para detecção molecular (Figura 6).

**FIGURA 5:** Procedimento de eutanásia e coleta de fragmento de órgãos e tecidos dos morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.



**FONTE:** Jennifer Ferreira.

**FIGURA 6:** Fluxograma das amostras biológicas coletadas e destinadas ao meio de cultura e biologia molecular de morcegos do Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022.



**FONTE:** Elaborado pela autora

#### 4.7. Isolamento de Trypanosomatidae em meio de cultura

Para o isolamento de tripanossomatídeos em meio de cultura, foram utilizadas alíquotas de sangue e fragmentos de tecidos (coração, fígado, membrana alar e pele de orelha) obtidos durante a eutanásia dos morcegos. As alíquotas de sangue total foram imediatamente inoculadas em meio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e infusão de fígado bovino (*Liver infusion triptose* – LIT), enquanto os fragmentos de tecido foram mantidos a 4°C por pelo menos 72 horas em solução PBS 1x suplementada com antibióticos e antifúngico, conforme descrito no tópico 4.5. Após este período de pré-incubação, os fragmentos de tecido foram macerados em capela de fluxo laminar e inoculados em meio de cultura NNN+LIT suplementado com 20% de soro fetal bovino estéril inativado e antibióticos (Penicilina 5000 U/mL e Estreptomicina 5000 µg/mL). As culturas foram mantidas em tubos cônicos de 15 mL, devidamente identificados, e armazenadas em uma estufa biológica a uma temperatura de 25°C (+1°C). As culturas foram inspecionadas semanalmente durante dois meses para observação de formas flageladas. Aquelas que apresentaram contaminação por fungos ou bactérias foram descartadas após avaliação macroscópica e microscópica entre lâmina e lamínula utilizando um microscópio biológico binocular Olympus CX31. A cada semana, as amostras remanescentes foram repicadas, sendo redistribuídas em novos tubos com as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente, continuando o processo de avaliação até completar o período total de observação.

#### 4.8. Extração e quantificação de DNA

Os fragmentos de órgãos (baço, coração, fígado, membrana alar e pele de orelha) foram processados individualmente para a extração do DNA total. Foi utilizado o Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene Tissue Kit® (Qiagen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Ao final do processo de extração, as amostras foram eluídas em 50 µL de solução de eluição e armazenadas a -20°C. As amostras de sangue foram processadas individualmente utilizando o kit de extração Blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

O DNA extraído foi avaliado quanto à qualidade e concentração utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher). Após a medição, as amostras foram alíquotadas em tubos de 1,5 mL na concentração de 20 ng/µL para utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR). Aquelas amostras que apresentaram uma concentração acima de



20 ng/ $\mu$ L foram diluídas proporcionalmente com água destilada estéril, enquanto as amostras com baixo nível de DNA foram concentradas utilizando um concentrador a vácuo (Eppendorf Concentrator Plus), sendo novamente avaliadas quanto a concentração.

#### 4.9. Controles endógenos da PCR

Com o objetivo de avaliar a qualidade e integridade do material genômico extraído e eliminar resultados falsos negativos devido à presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas à PCR utilizando controles endógenos. Para as amostras de sangue, foi realizada a amplificação do gene mitocondrial Citocromo B (*cytB*), enquanto para os demais órgãos e tecidos foi amplificado o gene gama actina de mamíferos.

A reação PCR dirigida ao *cytB* foi realizada utilizando 5 $\mu$ L de DNA, tampão da PCR (PCR *Buffer* 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,0 mM Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 100 $\mu$ M deoxinucleotídeos (dNTPs), 1 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®) e 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador: *cytb1*: (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') e *cytb2*: (5'GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3'), que flanqueiam uma região de 359 pb do gene supracitado. As condições da PCR para amplificação do *cytB* seguiram o protocolo proposto por Steuber *et al.* (2005).

Para a amplificação do gene gama actina utilizou-se 5 $\mu$ L de DNA, tampão da PCR (PCR *Buffer* 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl); 0,75 mM Cloreto de Magnésio (Life Technologies®); 0,50 $\mu$ M de deoxinucleotídeos (dNTPs), 0,5 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®) e 1,25  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador:  $\gamma$  *actina fw*: 5'ACAGAGAGAAGATGACGCAGATAATG 3' e  $\gamma$  *actina rv*: 5'GCCTGAATGGCCACGTACA3'. A reação amplifica uma região de 70 pares de bases e foi realizada seguindo proposto por Espitia *et al.* (2010).

Para todas as reações de PCR dirigidas ao alvo *cytB* e gama actina foram utilizados controle positivos compostos por DNA extraído sangue de capivara. Além disso, foram utilizados controles negativos compostos pela mistura dos reagentes da PCR sem adição de DNA *template* em todas as reações.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador automático (ProFlex PCR System; Applied biosystems) e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose

2,0% corados com brometo de etídio. A visualização dos produtos ocorreu em uma exposição à luz ultravioleta no transluminador L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia).

#### 4.10. *Nested*-PCR para detecção molecular de Trypanosomatidae

Utilizando a técnica de *Nested*-PCR, foi amplificada a subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) do gene 18S na região conhecida como V7V8 para detecção molecular de Trypanosomatidae. Foram utilizados os iniciadores TRY927F (5' GAAACAAGAAACACGGGAG 3'), e TRY927R (5' CTACTGGGCAGCTTGGGA 3') que amplificam um fragmento de 927pb. O material resultante da primeira PCR foi diluído na proporção 1:50 em água destilada estéril, sendo posteriormente utilizado (2,0 µL) como DNA *template* da reação de *Nested*, utilizando os iniciadores internos SSU561F - 5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3' e SSU561R - 5' CTGAGACTGTAACCTCAAAGC 3', que amplificam um fragmento de 561pb, seguindo o protocolo estabelecido por Noyes *et al.* (1999, 2000).

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático ProFlex PCR System (Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV) no transluminador L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia).

Em todas as reações de PCR para detecção de Trypanosomatidae foi utilizado controle positivo composto por cepas referência de *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *Le. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), na concentração de 20 ng/µL e como controle negativo foi utilizada a mistura dos reagentes da PCR sem adição de DNA *template*.

#### 4.11. Reação para sequenciamento de DNA

Após a amplificação das amostras positivas nas reações de PCR, o produto amplificado foi purificado utilizando os kits QIAquick PCR Purification e QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, para purificação de produto amplificado e de bandas retiradas do gel de agarose, respectivamente. Em seguida, duas reações foram preparadas contendo cada 1 µL dos produtos purificados na concentração de 10 ng/µL juntamente com 1 µL dos iniciadores (senso e antissenso) em uma reação individual na

concentração de 5 pmol, e água destilada suficiente para atingir um volume final de 6,5 µL. Essa mistura foi enviada para a Plataforma de Sequenciamento de DNA por eletroforese capilar do Instituto René Rachou/Fiocruz-MG. A reação de sequenciamento de Sanger foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando os softwares Finch TV (Geospiza, Inc.) e MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), sendo realizado a avaliação de cromatogramas em ambas as fitas visualmente quanto a presença de picos duplos, sendo quando necessário a atribuição de correta de nucleotídeos. Após a definição da sequência consenso utilizou-se a ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento (BLAST) para comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas na base de dados do GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), sendo posteriormente depositadas as sequências obtidas no estudo. Para a confirmação das espécies também utilizamos sequências com coberturas e identidades superiores a 98%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Fauna de Quirópteros

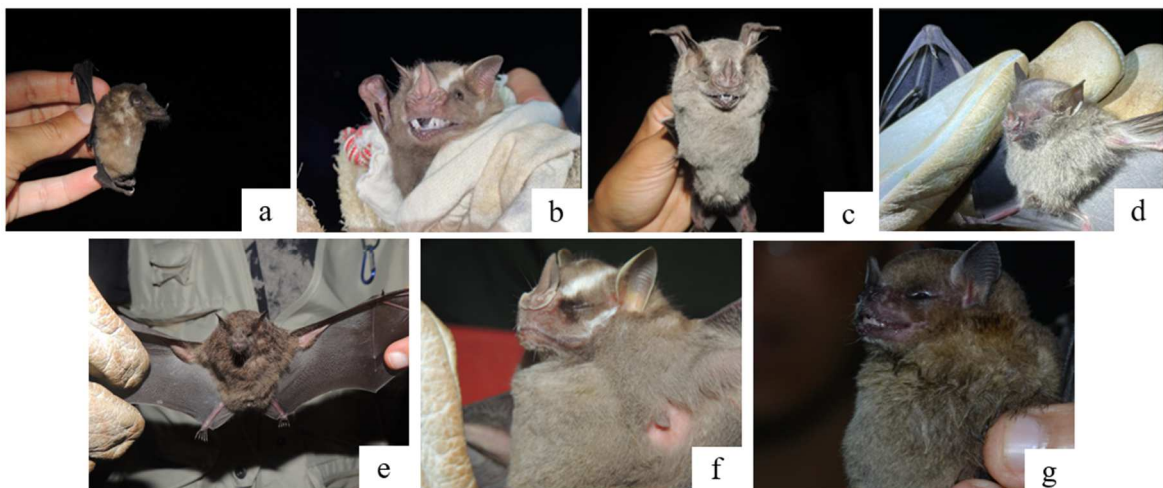
Durante os quatro meses de captura, foram realizadas seis campanhas no Parque das Mangabeiras, sendo uma em maio, duas em junho, duas em julho e uma em dezembro de 2022. O esforço amostral, de acordo com a metodologia proposta por Straube e Bianconi (2003) foi de 12.960 m<sup>2</sup>/h. Um total de 56 quirópteros foram coletados de forma aleatória durante o período de estudos. Todos os quirópteros pertencem à família Phyllostomidae, e foram distribuídos nas subfamílias Stenodermatinae (57,1%), Carollinae (14,3%) e Glossophaginae (28,6%). Das sete espécies coletadas durante o estudo, aquelas com hábito alimentar frugívoro foram as mais abundantes, representando 71,4% do total. As espécies mais comuns foram *Artibeus lituratus* (50%), *Sturnira lilium* (21,4%) e *Carollia perspicillata* (10,7%) (Tabela 1; Figura 7).

**TABELA 1:** Classificação taxonômica de exemplares quirópteros capturados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, de acordo com o sexo.

Subfamília	Espécie	Hábito alimentar	Exemplares capturados		Total (%)
			Fêmea	Macho	
<b>Carollinae</b>	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro	4	2	6 (10,7)
<b>Glossophaginae</b>	<i>Anoura caudifer</i>	Nectarívoro	0	2	2 (3,6)
<b>Glossophaginae</b>	<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívoro	0	2	2 (3,6)
<b>Stenodermatinae</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	10	18	28 (50)
<b>Stenodermatinae</b>	<i>Artibeus obscurus</i>	Frugívoro	0	1	1 (1,8)
<b>Stenodermatinae</b>	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Frugívoro	4	1	5 (8,9)
<b>Stenodermatinae</b>	<i>Sturnira lilium</i>	Frugívoro	4	8	12 (21,4)
	<b>Total (%)</b>		<b>22 (39,3)</b>	<b>34 (60,7)</b>	<b>56 (100)</b>

FONTE: Elaborado pela autora.

**FIGURA 7:** Imagens representativas das espécies de morcegos capturados no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022.



**LEGENDA:** a: *Anoura caudifer*; b: *Artibeus lituratus*; c: *Artibeus obscurus*; d: *Carollia perspicillata*; e: *Glossophaga soricina*; f: *Platyrrhinus lineatus*; g: *Sturnira lilium*. **FONTE:** Jennifer Ferreira, Marcelo Souza e Lucas Assunção.

A distribuição dos animais coletados e posteriormente processados conforme os critérios mencionados no terceiro parágrafo do tópico 4.4, no Parque das Mangabeiras de acordo com mês de captura é apresentada na Tabela 2. Em números absolutos, o mês de julho apresentou maior abundância com 21 animais coletados, seguido pelos meses de maio e junho (13 espécimes cada) e dezembro (9 espécimes), enquanto a maior riqueza de espécies foi observada no mês de junho (4 espécies), seguido pelos meses de maio e julho (ambos com 4 espécies) e dezembro (3 espécies).

**TABELA 2:** Espécies de morcego por mês de coleta no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022.

Espécies Coletadas	Meses de coleta – Ano 2022				Total (%)		
	Maio	Junho	Julho	Dezembro			
<i>A. caudifer</i>	0	0	1	0	1	2(3,6)	
<i>A. lituratus</i>	9	0	2	7	3	7	28 (50)
<i>A. obscurus</i>	1	0	0	0	0	0	1 (1,8)
<i>C. perspicillata</i>	1	1	1	1	2	0	6 (10,7)
<i>G. soricina</i>	0	0	2	0	0	0	2 (3,6)
<i>P. lineatus</i>	2	1	1	1	0	0	5 (8,9)
<i>S. lilium</i>	0	0	4	4	3	1	12 (21,4)
<b>Total (%)</b>	<b>13 (23,2)</b>	<b>13 (23,2)</b>	<b>21 (37,5)</b>	<b>9 (16,1)</b>	<b>56 (100)</b>		

FONTE: Elaborado pela autora.

De maneira geral as fêmeas coletadas foram categorizadas como adultos (95,5%), sendo uma fêmea jovem (4,5 %), já morcegos machos adultos representam 100% do total (Tabela 3).

**TABELA 3:** Classificação dos morcegos utilizados no estudo, capturados no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, de acordo com o sexo e condição reprodutiva.

ID	Espécie	Idade	Sexo	Peso (g)
M1	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	75,5
M2	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	78
M3	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	64,5
M4	<i>Carollia perspicillata</i>	Adulto	Macho	14
M5	<i>Artibeus obscurus</i>	Adulto	Macho	46
M6	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	60
M7	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	60
M8	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto	Macho	15,5
M9	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto	Fêmea	19,5
M10	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	20
M11	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	72
M12	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	57,5
M13	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	57
M14	<i>Carollia perspicillata</i>	Adulto	Macho	16
M15	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto	Fêmea	20,5
M16	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto	Fêmea	25
M17	<i>Carollia perspicillata</i>	Adulto	Fêmea	20
M18	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Fêmea	19
M19	<i>Anoura caudifer</i>	Adulto	Macho	6
M20	<i>Glossophaga soricina</i>	Adulto	Macho	10
M21	<i>Glossophaga soricina</i>	Adulto	Macho	9
M22	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	18
M23	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	20

ID	Espécie	Idade	Sexo	Peso (g)
M24	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	23g
M25	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	56,5g
M26	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	70
M27	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	73
M28	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	18,5
M29	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Fêmea	22
M30	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto	Fêmea	29
M31	<i>Carollia perspicillata</i>	Adulto	Fêmea	16
M32	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	68
M33	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	70
M34	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	70
M35	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	62
M36	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Fêmea	17
M37	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	70
M38	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	70
M39	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	18
M40	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	66
M41	<i>Carollia perspicillata</i>	Adulto	Fêmea	14,5
M42	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	22
M43	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	20,5
M44	<i>Carollia perspicillata</i>	Jovem	Fêmea	12,5
M45	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Fêmea	15,5
M46	<i>Artibeus lituratus</i>	Jovem	Fêmea	67
M47	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Fêmea	79
M48	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	82
M49	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	76
M50	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	73
M51	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	72,5
M52	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	74
M53	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	72
M54	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto	Macho	66
M55	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto	Macho	19,5
M56	<i>Anoura caudifer</i>	Adulto	Macho	11,5g

FONTE: Elaborado pela autora.

## 5.2. Infecção natural por Trypanosomatidae

Foram realizadas tentativas de isolamento de Trypanosomatidae por meio de cultura em um total de 152 amostras, correspondentes a 42 indivíduos. Devido à alta taxa de contaminação verificada no período de experimentação a metodologia foi descontinuada, e não empregadas em todas as amostras. Dentre as amostras, 41 (26,9%) eram fragmentos de fígado, dos quais cinco (12%) apresentaram contaminação e 36 (88%) apresentaram resultado negativo.

Das 42 (27,6%) amostras de coração, 34 (81%) foram negativas para a presença de Trypanosomatidae, enquanto oito (19%) apresentaram contaminação. Além disso, das 18 amostras de pele de orelha (11,8%), 11 (61,1%) apresentaram contaminação e sete (38,9%) foram negativas. Já as 18 amostras de membrana alar (11,8%) resultaram em 17 (94,4%) amostras contaminadas e uma amostra negativa (5,6%). Por fim, das 33 amostras de sangue (21,7%), 7 apresentaram contaminação e 26 apresentaram resultado negativo (Tabela 4).

No total, 48 amostras (31,5%) foram descartadas devido a contaminação fúngica, enquanto 104 amostras (68,4%) foram descartadas devido à ausência de crescimento de protozoários após 30 dias de cultivo. Observou-se que a maioria das amostras de fígado (80,9%), coração (81,8%) e sangue (78%) foram descartadas

sem apresentar indícios de contaminação. Por outro lado, 94,4% das amostras de membrana alar foram descartadas por apresentarem contaminação fúngica.

**TABELA 4:** Resultado das amostras de morcegos coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022, submetidas ao meio de cultura para tentativa de isolamento de parasitos.

Indivíduos	Espécies	Amostras biológicas coletadas de Morcegos				
		Fígado	Coração	Pele de Orelha	Membrana Alar	Sangue
<b>M1</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo
<b>M2</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M3</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo	Negativo
<b>M4</b>	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Contaminado	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M5</b>	<i>Artibeus obscurus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M6</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Contaminado	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M7</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M8</b>	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	-
<b>M9</b>	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M10</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo
<b>M11</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M12</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Contaminado	Contaminado	Contaminado	Negativo
<b>M13</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo
<b>M14</b>	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado
<b>M15</b>	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Contaminado	Negativo	Contaminado	Contaminado	Contaminado
<b>M16</b>	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Contaminado
<b>M17</b>	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo
<b>M18</b>	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Contaminado	Negativo
<b>M19</b>	<i>Anoura caudifer</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
<b>M20</b>	<i>Sturnira lilium</i>	-	Negativo	-	-	-
<b>M21</b>	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo	-	-	Contaminado
<b>M22</b>	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
<b>M23</b>	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo



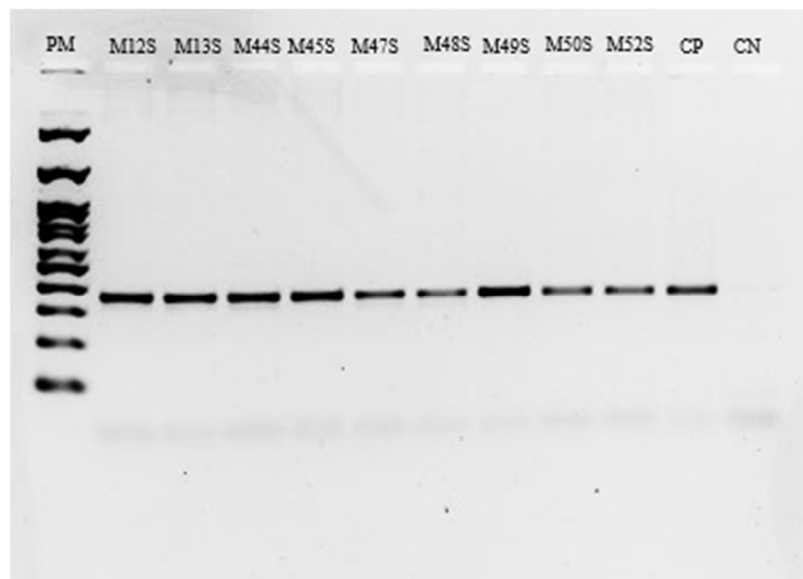
Indivíduos	Espécies	Amostras biológicas coletadas de Morcegos				
		Fígado	Coração	Pele de Orelha	Membrana Alar	Sangue
M24	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M25	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M26	<i>Sturnira lilium</i>	Contaminado	Negativo	-	-	Negativo
M27	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Contaminado
M28	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo	-	-	-
M29	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M30	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M31	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Contaminado	-	-	Contaminado
M32	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M33	<i>Sturnira lilium</i>	Contaminado	Contaminado	-	-	Negativo
M34	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
M35	<i>Artibeus lituratus</i>	Contaminado	Negativo	-	-	Contaminado
M36	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Contaminado	-	-	Negativo
M37	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Contaminado	-	-	-
M38	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo	-	-	-
M39	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo	-	-	-
M40	<i>Carollia perspicillata</i>	Contaminado	Negativo	-	-	-
M41	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Contaminado	-	-	-
M42	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo	-	-	-

FONTE: Elaborado pela autora.

### 5.3. Detecção molecular de Trypanosomatidae

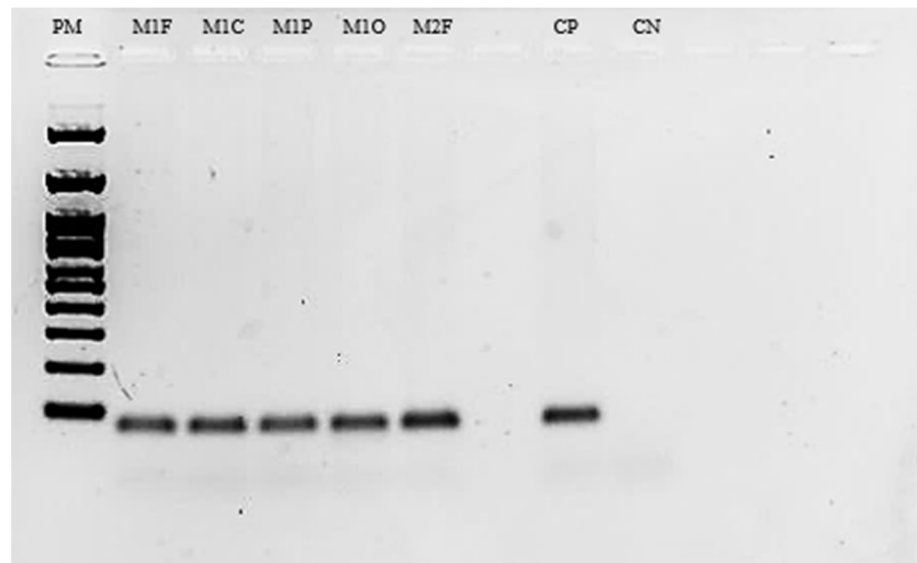
Antes da detecção de tripanossomatídeos, realizou-se a amplificação do gene Citocromo B (*cytB*) em amostras de sangue (18) e do gene gama actina em amostras de órgãos e tecidos (168). As amplificações foram bem-sucedidas (Figuras 8 e 9), indicando qualidade e integridade do material genômico extraído.

**FIGURA 8:** Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de sangue de morcego submetidas a PCR dirigida ao gene citocromo B.



**LEGENDA:** PM: peso molecular de 100 pares de bases. Canaletas M12S a M52S: amostras de sangue dos morcegos. CP: controle positivo (DNA extraído de sangue de capivara). CN: controle negativo. **FONTE:** Elaborado pela autora.

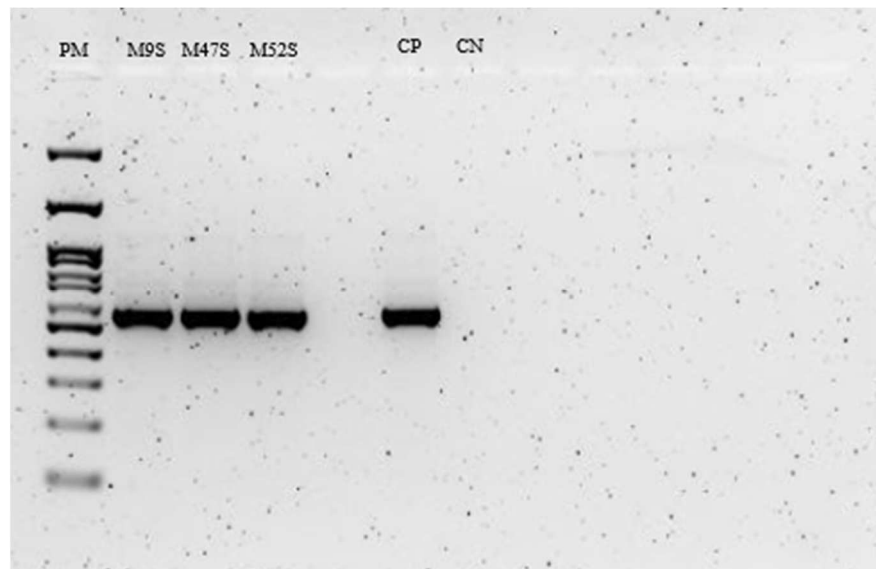
**FIGURA 9:** Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de órgãos e tecidos de morcego submetidas a PCR dirigida ao gene gama actina.



**LEGENDA:** PM: peso molecular de 100 pares de bases. Canaletas M1F a M2F: amostras de tecidos e órgãos dos morcegos. CP: controle positivo (DNA extraído de sangue de capivara). CN: controle negativo. **FONTE:** Elaborado pela autora.

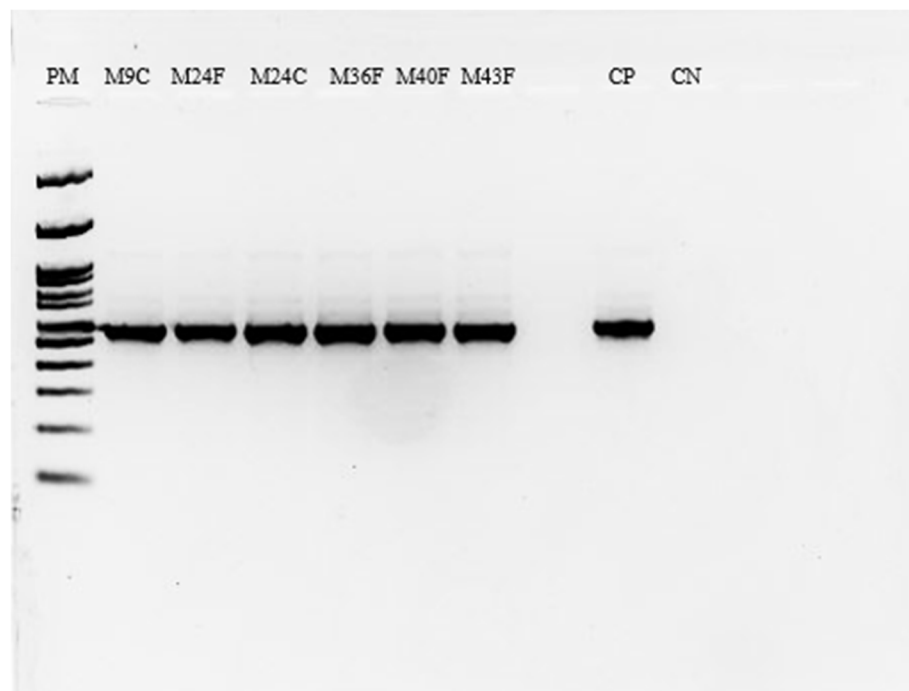
Em seguida as amostras foram submetidas à *Nested* PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S. Desse total, 11 amostras (5,9%) apresentaram resultado positivo para a presença de tripanossomatídeos. Das amostras de sangue (18) três (16,6%) apresentaram resultado positivo, sendo: M9 (*Platyrrhinus lineatus*) positivo para *Leishmania braziliensis* (OR656597), M51 (*Artibeus lituratus*) para *Trypanosoma* sp. Neobat 3 (OR656598) e M56 (*Anoura caudifer*) positivo para *Trypanosoma* sp. Neobat 4 (OR656599) (Figura 10). Com relação aos órgãos e tecidos testados (168), oito amostras (4,9%) apresentaram resultado positivo, sendo: amostras de baço (M1- *Artibeus lituratus* e M21 *Glossophoga soricina*) para *Le. infantum* (OR656595 e OR656596); coração dos indivíduos M9 (M9 (*Platyrrhinus lineatus*) e M26 (*Artibeus lituratus*) com DNA de *Le. infantum* (OR656592 e OR656594 respectivamente); e por fim no fígado quatro amostras foram positivas, duas para *Le. infantum* – M26 *Artibeus lituratus* (OR656593) e M44 *Carollia perspicillata* (OR656590); e duas para *Trypanosoma* sp. Neobat 3 nos indivíduos M39 (*Sturnira lilium*) (OR656589) e M47 (*Artibeus lituratus*) (OR656591) (Figura 11).

**FIGURA 10:** Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de sangue de morcego submetidas a *Nested* PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S da SSU rRNA.



**LEGENDA:** PM: peso molecular de 100pb; Canaletas 9S a 52S: amostras de sangue de morcego; CP: controle positivo: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); CN: controle negativo. **FONTE:** Elaborado pela autora.

**FIGURA 11:** Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose 2% das amostras de órgãos e tecidos de morcego submetidas a *Nested* PCR dirigida a região V7V8 do gene 18S da SSU rRNA.



**LEGENDA:** PM: peso molecular de 100pb. M9C a M43F: amostras de órgãos. CP: controle positivo – *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); CN: controle negativo. **FONTE:** Elaborado pela autora.

### 5.5. Análise comparativa da positividade de quirópteros por tripanossomatídeos

Ao analisar as amostras positivas para Trypanosomatidae através da *Nested* PCR da região V7V8, observou-se uma predominância de positividade para a espécie *Leishmania infantum* (6/11 – 54,5%) seguido por *Trypanosoma* sp. (Neobat 3 e 4) (4/11 36,4%) e *Le. braziliensis* (1/11 9,0%) (Tabela 5).

**TABELA 5:** Resultados dos órgãos positivos de morcegos e sequenciamento da região V7V8 de amostras coletadas no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022.

ID	Espécie	Classificação etária/ sexo	Órgãos			
			Baço	Coração	Fígado	Sangue
M1	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto/♂	<i>Le. infantum</i>	-	-	-
M9	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Adulto/♀	-	<i>Le. infantum</i>	-	<i>Le. braziliensis</i>
M21	<i>Glossophaga soricina</i>	Adulto/♂	<i>Le. infantum</i>	-	-	-
M26	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto/♂	-	<i>Le. infantum</i>	<i>Le. infantum</i>	-
M39	<i>Sturnira lilium</i>	Adulto/♂	-	-	<i>T. sp. Neobat 3</i>	-
M44	<i>Carollia perspicillata</i>	Jovem/♀	-	-	<i>Le. infantum</i>	-
M47	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto/♀	-	-	<i>T. sp. Neobat 3</i>	-
M51	<i>Artibeus lituratus</i>	Adulto/♂	-	-	-	<i>T. sp. Neobat 3</i>
M56	<i>Anoura caudifer</i>	Adulto/♂	-	-	-	<i>T. sp. Neobat 4</i>

FONTE: Elaborado pela autora.

Quando consideramos a positividade de Tripanossomatídeos entre o número de indivíduos coletados/órgãos, as espécies *Anoura caudifer* (1/2) e *Glossophaga soricina* (1/2) apresentam a maior indicie, com 50% de suas amostras contendo sequências de DNA de interesse para o estudo, sendo constatadas no sangue e baço respectivamente (Tabela 6). Em seguida as espécies *Platyrrhinus lineatus* (20% - 1/5), *Carollia perspicillata* (17% - 1/6) *Artibeus lituratus* (14,2% - 5/28) e *Sturnira lilium* (8,3%, - 1/12). A espécie *A. lituratus* apresentou amostras positivas em quatro órgãos referentes a quatro morcegos, um com dois órgãos positivos. Para essa espécie o fígado foi detectado duas vezes, totalizando 5 amostras; entretanto resulta na de maneira geral um indicie reduzido devido a quantidade de morcegos totais capturados. Em *P. lineatus* duas fontes biológicas foram detectadas positivas – coração e sangue, que correspondem ao mesmo indivíduo. A espécie *A. obscurus* foi a única coletada que não apresentou positividade. O fígado juntamente com o coração se configurou como os órgãos mais presentes no estudo, em que o fígado foi também o de maior positividade com quatro de 49 amostras.

**TABELA 6:** Resultado das amostras positivas das espécies de morcegos por órgãos, coletados no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais em 2022.

Espécies	Órgãos						Total por indivíduo (%)
	Baço	Coração	Fígado	Membrana Alar	Pele de orelha	Sangue	
<i>Anoura caudifer</i>	0	0	0	0	0	1	<b>1/2(50)</b>
<i>Artibeus lituratus</i>	1	1	2	0	0	1	<b>4/28 (45,4) *</b>
<i>Aritbeus obscurus</i>	0	0	0	0	0	0	<b>0/1 (0)</b>
<i>Carollia perspicillata</i>	0	0	1	0	0	0	<b>1/6(17)</b>
<i>Glossophaga soricina</i>	1	0	0	0	0	0	<b>1/2(50)</b>
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	0	1	0	0	0	1	<b>1/5 (20) *</b>
<i>Sturnira lilium</i>	0	0	1	0	0	0	<b>1/12 (8,3)</b>
<b>Total (%)</b>	<b>2/34(5,9)</b>	<b>2/49(4,1)</b>	<b>4/49(8,2)</b>	<b>0/18 (0)</b>	<b>0/18 (0)</b>	<b>3/18(16,7)</b>	<b>9/56 (16,1)</b>
							<b>11/ 186 (6)</b>

\*A soma total da positividade entre os órgãos foi contabilizada por indivíduo, portanto alguns indivíduos tiveram positividade em mais de um órgão, não influenciando no valor da soma total. **FONTE:** Elaborado pela autora.



## 6 DISCUSSÃO

Os morcegos desempenham um papel importante na dinâmica ecológica dos ambientes naturais, fornecendo serviços ecossistêmicos essenciais, como polinização e dispersão, que contribuem para a manutenção da biodiversidade (KUNZ *et al.*, 2011). No entanto, com o crescimento urbano as alterações nas condições naturais do habitat afetam não apenas os morcegos, mas também outras espécies. Os parques urbanos são considerados refúgios de fragmentos florestais em meio à urbanização, mas também enfrentam pressões ambientais, como poluição do ar, solo e água, perturbações sonoras e espécies exóticas (RUSSO & ANCILLOTTO, 2015). A proximidade dos morcegos com áreas urbanas é uma preocupação, uma vez que são conhecidos por manter e transmitir tripanossomatídeos, vírus, bactérias e fungos (CORRÊA *et al.* 2013; MORATELLI & CALISHER 2015; VOLOKHOV *et al.* 2017). Estudos como este, realizado no Parque das Mangabeiras, são de grande importância para uma melhor compreensão da ecoepidemiologia dos morcegos em parques urbanos, especialmente em Belo Horizonte, onde não há levantamentos prévios nesse segmento. O presente estudo confirma a detecção molecular de *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e *Trypanosoma* sp. em morcegos, indicando seu possível papel como hospedeiros ou reservatórios desses parasitos podendo assim, contribuir para a manutenção do ciclo epidemiológico de doenças emergentes e reemergentes.

Todos os espécimes coletados neste estudo pertencem à família Phyllostomidae, sendo considera a família com maior diversidade de espécies na região neotropical (Fenton, 1992b). É sabido que fragmentos florestais preservados têm uma maior atividade de morcegos em comparação com áreas alteradas (Silva de Araújo & Bernard, 2016), sendo coletado no Parque das Mangabeiras 56 indivíduos de morcegos distribuídos em sete espécies de morcegos. O índice de riqueza de morcegos em habitats fragmentados pode conter relação negativa com a infecção por hemoparasitas, uma vez que é maior se comparado a ambientes de floresta contínua, sendo observado o crescimento de um e a redução do outro (Cottontail *et al.* 2009). Isso se deve a determinadas características, como a alteração da cobertura vegetal que atua favorecendo a transmissão de patógenos (Cottontail *et al.* 2009). Diferente do que foi visto por Rangel *et al.* (2019) no Rio de Janeiro, em que o nível de infecção não apresentou variação significativa entre duas áreas com diferentes níveis de preservação. Devido a longevidade e o constante deslocamento realizado pelos morcegos, as infecções aqui constatadas podem ter sido adquiridas anteriormente em outro local.

Devido ao número de coletas realizadas (seis), com esforço amostral de 12.960 m<sup>2</sup>/h em uma área específica do parque, os dados de riqueza e abundância podem ter sido afetados, não abrangendo a área total do parque.

As espécies *A. lituratus*, *S. liliium* e *C. perspicillata* foram as mais abundantes e já foram observadas anteriormente em Belo Horizonte por De Knecht *et al.* (2005), com destaque para *A. lituratus* apresentou maior incidência em ambos os estudos. Embora sejam encontradas em florestas tropicais, estas espécies também mostram tolerância e adaptação a ambientes modificados, principalmente *A. lituratus* (De Souza Laurindo & Vizentin-Bugoni, 2020), o que resulta na ocorrência dessas espécies a diferentes condições ambientais, dispondo de abrigos desde cavidades naturais e árvores até edificações humanas (Gannon *et al.*, 1989; Evelyn & Stiles, 2003).

A utilização de parques urbanos como refúgios de fragmentos florestais pode contribuir para a conservação e manutenção dessas espécies pertencentes a família Phyllostomidae (Silva de Araújo & Bernard 2016; Nunes *et al.* 2017). Silva de Araújo e Bernard (2016) observaram uma maior atividade de filostomídeos dentro ou próximo a fragmentos florestais em áreas urbanas, ao contrário do comportamento da família Molossidae, que mostrou uma preferência por ambientes sem áreas verdes (Silva de Araújo & Bernard, 2016). Um exemplo é a espécie *A. lituratus* – de maior abundância no presente estudo (50%), comumente encontrada em fragmentos verdes dentro de áreas antropizadas, como parques urbanos (De Oliveira Sene, 2022; Guedes *et al.*, 2020; Zortéa & Chiarello, 1994) e é considerada uma espécie generalista, indicando a partir de tais características uma possível resiliência e adaptação favorável à urbanização e ambientes fragmentados (Barros *et al.* 2006; Bredt & Uieda, 1996).

Além disso adiciona-se que essas espécies generalistas têm se adaptado e utilizado de ambientes modificados, ao empoleirar-se em estruturas que compõe fragmentos florestais e até mesmo diretamente nos centros urbanos (BARROS *et al.* 2006). Em estudos realizados foi possível verificar que cada espécie possui uma resposta específica a ambientes modificados (Pacheco *et al.* 2010; Russo & Ancillotto, 2015), sendo comum a redução da riqueza e o aumento da abundância de determinadas espécies, evidenciando de modo geral o efeito negativo gerado (Avila-Flores & Fenton, 2005; Geggie & Fenton, 1985).

A relação entre o número de fêmeas (22/39,3%) e machos (34/60,7%) - coletados conforme os parâmetros estabelecidos no estudo evidenciou certa predominância de indivíduos machos. Entretanto, a proporção é vista de forma significativa realizando análises intraespecíficas. Considerando *A. lituratus*, a espécie mais abundante neste estudo, cerca de 35% dos indivíduos coletados foram fêmeas enquanto cerca de 65% foram machos. Resultado similar foi observado para a espécie *S. liliium*, no qual cerca de 33,3% foram fêmeas e 66,7% machos. Contudo, para *C. perspicillata* observou-se predominância de fêmeas (66,6%) em detrimento dos machos (33,3%).

Quando realizada uma comparação entre a positividade para tripanossomatídeos e o sexo, observou-se que dos nove indivíduos positivos, três eram fêmeas (13,6%) com quatro amostras positivas para *Le. braziliensis*, *Le. infantum* (2) e *Trypanosoma* sp. Neobat 3; e seis machos (17,6%) com sete amostras positivas para *Le. infantum* (4) e *Trypanosoma* sp. Neobat 3 (2) e Neobat 4. Não foi possível afirmar que exista correlação direta entre estas variáveis, haja vista que provavelmente os dados espelham a proporção geral entre machos e fêmeas que é reduzida. Resultado similar ao presente estudo foi observado por Vieira (2016) que além da relação entre machos e fêmeas constatou maior positividade do gênero *Trypanosoma* para machos (3/4 - 75%) e maior positividade de fêmeas para o gênero *Leishmania* (3/5 60%).

As fêmeas positivas para os tripanossomatídeos foram categorizadas como adulto (2) e jovem (1). Já os machos positivos foram classificados em adulto (6). A categorização dos indivíduos positivos de acordo com a classificação etária pode indicar que animais adultos estão mais susceptíveis a infecção, haja vista o maior tempo de exposição aos insetos vetores, contudo, mesmo que reduzido o registro de morcegos na fase jovem positivos para Trypanossomatidae (1) pode indicar contato estreito com os agentes patogênicos ainda em fase inicial, ocorrendo em infecções em tempos mais recentes (Vieira, 2016).

A família Phyllostomidae abriga uma grande diversidade de hábitos alimentares, incluindo espécies que se alimentam de insetos – *Molossus molossus*, frutas – *A. lituratus*, néctar – *A. caudifer*, carne – *Chrotopterus auritus*, e hematófaga – *Desmodus rotundus* (Nowak, 1999; Gardner, 1976). Nesse contexto, destaca-se a subfamília Stenodermatinae, que usualmente apresenta espécies de dieta frugívora e, portanto, tende a ser mais comum em áreas com disponibilidade de árvores frutíferas, inclusive parques urbanos (Pereira & Esbérard 2009). No presente estudo, foi observada uma predominância do hábito alimentar frugívoro (5/7 71,4%), não sendo coletados morcegos insetívoros. Tal fato deve-se a metodologia empregada (redes de neblina) que não favorece a coleta de morcegos insetívoros por apresentarem voo acima do dossel, como nas famílias Emballonuridae, Molossidae, Mormoopidae e

Vespertilionidae (Kalko & Handley, 2001). Contudo, todas as espécies do estudo além da fonte principal complementam sua dieta de acordo com a sazonalidade e disponibilidade de recursos, incorporando outros alimentos como néctar, folhas e insetos (Reis *et al.* 2007).

Destaca-se a importância das espécies com hábitos alimentares ecléticos uma vez que se beneficiam da flexibilidade alimentar ao se adaptarem a diferentes cenários de disponibilidade de alimentos, inclusive com escassez de recurso, como é visto em todas as espécies coletadas no presente estudo, bem como em *A. lituratus*, que é conhecido por ser generalista em ambientes com recursos limitados, mostrando uma alta plasticidade alimentar (Galetti & Morellato, 1994; Passos & Graciolli, 2004). Neste sentido, De Oliveira Sene, 2022 e Guedes *et al.*, 2020 e observaram a presença de insetos nas fezes de *A. lituratus*, o que pode indicar um comportamento oportunista na ausência de frutas, um recurso para suprir a necessidade de proteína ou até mesmo ocorrendo a ingestão inadvertida de insetos juntamente com frutas (Courts, 1998, Fleming *et al.* 1972; Gardner, 1976, Heithaus *et al.* 1975, Thomas, 1984).

O hábito de incorporar várias fontes alimentares na dieta visto nas espécies de estudo pode gerar implicações nas dinâmicas de transmissão de patógenos, uma vez que a alimentação insetívora pode servir como fonte de infecção para hospedeiros e/ou reservatórios (Thomas *et al.* 2007; Reimann *et al.* 2022). As espécies *A. caudifer* e *G. soricina* – de hábito alimentar primariamente nectarívoro (Barros *et al.* 2013; Zortéa, 2003) com poucos exemplares coletados neste estudo apresentaram positividade para *Trypanosoma* sp. e *Le. infatum* respectivamente. Especula-se que a transmissão do patógeno pode ter acontecido ocasionalmente durante a ingestão de néctar em plantas como bromélias que são utilizadas como abrigos por barbeiros como visto em *Rhodnius domesticus*; através das fezes, como também em uma alimentação ocasional de artrópodes (Lent *et al.* 1979; Monteiro *et al.* 2018; Zortéa, 2003). No caso dos flebotomos que possuem aproximadamente 3mm de comprimento acredita-se que estes não participam da dieta de morcegos, e se ocasionalmente ocorra seja de maneira acidental, como por exemplo ao realizar o *grooming* individual ou mútuo.

Além da transmissão por meio da alimentação insetívora dos morcegos, é importante mencionar que a infecção por tripanossomatídeos também pode ocorrer através de insetos hematófagos. Adiciona-se que esses fatores em conjunto com o compartilhamento de abrigos entre morcegos e flebotomíneos/triatomíneos (Alves *et al.* 2008; Campos *et al.* 2020; Pinto *et al.* 2015) e o hábito noturno desses insetos poderiam influenciar na dinâmica de infecções (Reimann *et al.* 2022), chamando a atenção para o potencial risco de os morcegos estarem envolvidos na manutenção do ciclo desses patógenos.

A capacidade de *Lu. longipalpis* - uma das principais espécies vetoras se alimentar em *C. perspicillata*, bem como em outras espécies de morcegos, foi observada por Lampo *et al.* (2000). No presente estudo, identificou-se a infecção de *C. perspicillata* por *Le. infantum*, o principal agente etiológico transmitido por *Lu. longipalpis*. Além disso, evidências moleculares indicam a possibilidade de morcegos atuarem como recurso alimentar primário para barbeiros, apresentando fonte de positividade para *T. cruzi* em detrimento de roedores e marsupiais do Equador, indicando que os ciclos de transmissão podem ser mais intensos em quiróptero em determinadas regiões (Pinto *et al.* 2003; 2006; 2015).

De acordo com Pinto *et al.* (2015) a espécie de barbeiro *Cavernicola pilosa* foi verificada em associação com o morcego insetívoro *Myotis* sp. dentro de uma residência no Equador, além da associação entre a espécie *Triatoma dispar* aos morcegos insetívoros *Molossus molossus* e *Myotis* sp., sendo um indivíduo da última espécie positivo para *T. c. marinkellei*, coletados no interior de um galinheiro, localizado próximo a residência.

Já existem registros das principais espécies coletadas no presente estudo - *A. lituratus*, *C. perspicillata* e *S. liliium*, infectadas naturalmente por parasitos do gênero *Trypanosoma* sp. (Rangel *et al.* 2019) e *Leishmania* sp. (Lima *et al.* 2008). Das 152 amostras submetidas ao isolamento em meio de cultura, nenhuma apresentou resultado positivo, sendo que 31,5% das amostras apresentaram contaminação por fungos ou bactérias e 68,4% resultaram em amostras negativas, ou seja, sem crescimento de formas flageladas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Savani *et al.* (2010), que identificaram 21 amostras contaminadas e 319 amostras negativas em um estudo conduzido na cidade de São Paulo. Diferente do observado por Lima *et al.* (2008) com o primeiro isolado de *Leishmania* (*Le. Infantum*) em morcego (*Carollia perspicillata*).

A alta taxa de amostras contaminadas neste estudo indica a necessidade de procedimentos adicionais para garantir a integridade das amostras durante a manipulação, incluindo o uso de capela de fluxo laminar. As condições de cultivo *in vitro* utilizadas neste estudo, validadas previamente pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses (Fiocruz Minas) em outros estudos, não foram um fator determinante para os resultados negativos e contaminados. Verifica-se até o momento a impossibilidade de resultados positivos para sangue em meio de cultura para amostras com parasitos identificados como *Trypanosoma* sp. Neobats (Rodrigues *et al.* 2019). O indivíduo M36 positivo no fígado para *Trypanosoma* sp. Neobat 3 apresentou sangue em meio de cultura sem a presença de parasitos ou outros microorganismos, sendo tido como negativo e posteriormente descartado, como também verificado anteriormente por

Rodrigues *et al.* (2019) em condições de cultivo semelhante. Tais evidências reforçam a incapacidade de *Trypanosoma* sp. Neobat crescer em meio de cultura convencional (NNN/LIT), não apresentando condições ideais para a sobrevivência como ocorre para *Trypanosoma* spp.

Os morcegos possuem a capacidade de se deslocar tanto em curtas distâncias -como entre abrigos e áreas de alimentação, quanto em longas distâncias - em eventos migratórios populacionais, realizados através do voo verdadeiro (Trajano, 1996; Aguiar *et al.* 2014). Devido às atividades humanas que alteram o ambiente natural, há cada vez mais a presença de morcegos em áreas urbanas, especialmente da família Phyllostomidae, próximos a fragmentos florestais (Silva de Araújo & Bernard, 2016; Nunes *et al.* 2017). Essa capacidade de dispersão das colônias e adaptação a ambientes antropizados, aliada à diversidade alimentar, possibilita a manutenção de doenças e a dispersão de patógenos (FAO, 2011; Nunes *et al.* 2017). É importante ressaltar que a maioria dos registros de morcegos infectados por agentes etiológicos de doenças pertence à família Phyllostomidae (Corrêa *et al.*, 2013).

As doenças causadas por tripanossomatídeos merecem uma atenção especial, pois os morcegos compartilham abrigos com seres humanos e vetores que possuem patógenos causadores de várias doenças (Fabián, 1991; Jansen & Roque, 2010). O compartilhamento de abrigo entre morcegos infectados e barbeiros foi constatado por Dias *et al.*, 1942 no norte do Brasil. Inclusive a espécie *A. lituratus* que utiliza palmeiras como abrigo (Dos Reis *et al.* 2009) assim como visto em barbeiros, foi verificada no referido estudo com DNA de *Trypanosoma* sp. (sangue e fígado) e *Le. infantum* (baço, coração e fígado).

A espécie *S. lilium* positiva para *Trypanosoma* sp. neste estudo já foi verificada no Brasil com infecção por *T. dionisii* e *T. cruzi* (Lima *et al.* 2015; Nishimura *et al.* 2010). Entretanto *C. perspicillata* que foi positiva para *Le. infantum* é comumente associada na literatura a infecção por diferentes DTU's de *T. cruzi* (I, III, IV e V), bem como *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* e *T. rangeli* (Dario *et al.* 2017a, 2017b; Da Costa *et al.* 2016; Dos Santos *et al.* 2018; Rangel *et al.* 2019).

No presente estudo, das 186 amostras analisadas, 11 (5,9%) apresentaram positividade para a presença de tripanossomatídeos. Deste total de positivos, aproximadamente 63,6 % foram positivas para o gênero *Leishmania* (85,7% para *Le. infantum* e 14,3% para *Le. braziliensis*) e 36,4% para o gênero *Trypanosoma*. Através do sequenciamento do fragmento interno da *Nested* PCR, não foi possível realizar a identificação a nível de espécie do gênero *Trypanosoma*, entretanto, a análise molecular indicou a presença de duas diferentes MOTU, sugerindo a presença de dois táxons. Adiciona-se que as amostras identificadas como *Trypanosoma* sp. foram submetidas a técnica de PCR convencional *multilocus* conforme protocolo estabelecido

por Da Cruz Moreira e Ramirez 2019, amplificadas na região AC do gene SL-IRac, regiões I e II do gene spliced-leader (SL-IR I e II), domínio divergente D7 do gene 24S $\alpha$  rRNA (24S $\alpha$  rDNA) e o fragmento nuclear A10, que possibilita verificar as diferentes DTUs de *T. cruzi*; não havendo regiões amplificadas após a aplicação da técnica. Ao comparar o código de acesso de Genbank de amostras de *Trypanosoma* verificou-se a compatibilidade com amostras de Rodrigues *et al.* (2019), sendo MH411068.1 constatado em amostras de fígado e sangue, e MH411067.1 verificado em uma amostra de sangue.

Como também visto pelos autores referidos verificamos a positividade da MOTU Neobat 3, na espécie *Artibeus lituratus* (2), além da espécie *Sturnira lilium* (1), em que a linhagem Neobat 3 é observada na literatura com infecção em *A. jamaicensis*, *A. lituratus* e *A. cinereus* (Cottontail *et al.* 2014; Lima *et al.* 2015; Rodrigues *et al.* 2019). Além disso foi possível averiguar positividade de *Trypanosoma* Neobat 4 na espécie *A. caudifer* – já detectada com *Crithidia mellificae* (RANGEL *et al.* 2019). Este configura-se como o primeiro registro da linhagem Neobat 4 em outros quirópteros que não *C. perspicillata* (Alves *et al.* 2021). Alves *et al.* (2021) obtiveram sequências compatíveis com *Trypanosoma* sp. Neobats 3, 4, além do 1 e 5, apresentando alto nível de infecção por *T* spp. Neobat 4 restrito a *C. perspicillata*. Ainda não se sabe os vetores que transmitem as linhagens de *T*. spp. Neobats, possivelmente insetos hematófagos que compartilham o habitat com os morcegos estejam atuando na manutenção do ciclo. Originalmente foram descritos no Panamá por Cottontail *et al.* (2014), e recentemente foram associados com a espécie *T. wauwau* por um ancestral próximo.

Evidências demonstram que *T. wauwau* e *T*. spp Neobats formam um conjunto mais próximo da linhagem de tripanossomatídeos encontrados em marsupiais e roedores australianos do que outros mamíferos neotropicais, indicando serem espécies mais basais; havendo também evidências da espécie *T. cruzi* ter evoluído e sido dispersada por animais da ordem Chiroptera, sendo possivelmente este o hospedeiro original de *T. cruzi* (Dario *et al.* 2017b; Kostygov *et al.* 2021; Lima *et al.* 2015b; Lopes *et al.* 2018; Rodrigues *et al.* 2019). A constatação de *Trypanosoma* spp Neobats (1, 2 3, 4 e 5) em diferentes localizações geográficas auxilia no entendimento da distribuição destes patógenos, que já é verificado por autores em diferentes localidades (Cottontail *et al.* 2014; Lima *et al.* 2015; Rodrigues *et al.* 2019).

Amostras de sangue, inclusive coagulado são utilizadas para a detecção molecular de *Trypanosoma* e *Leishmania* (Azami-Conesa *et al.* 2020; Alves *et al.* 2021; Dario *et al.* 2021; Rodrigues *et al.* 2019). Foi possível detectar DNA de *Le. braziliensis* e *Trypanosoma* sp. em amostras de sangue (3/18), sendo que estudos indicam que a positividade de parasitos no

sangue, assim como na pele pode estar relacionada a uma infecção mais recente (Azami-Conesa *et al.* 2020).

Amostras de baço, coração, fígado e pele são comumente vistos na literatura sendo utilizados para a detecção de tripanossomatídeos (Alcover *et al.* 2020; Azami-Conesa *et al.* 2020), sendo possível também citar outras estratégias que podem ser empregadas como a coleta de fezes e *swab* perianal, que em conjunto com amostras de patágio (pele) de morcegos detectaram DNA de *T. cruzi* em estudo de Quiroga *et al.* (2022). No presente estudo amostras de coração e fígado apresentaram DNA de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma* sp. conforme Berzunza-Cruz *et al.* (2015) que confirmou a positividade por *L. mexicana* em amostras de coração e fígado de morcegos. Os baços apresentam grande positividade na literatura comparado a outras fontes biológicas, sendo dois positivos no presente estudo para *Le. infantum*, estando em consonância com o ciclo biológico da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado na qual há ocorrência de formas amastigotas na fase crônica (Azami-Conesa *et al.* 2020). A positividade em órgãos internos indica uma menor chance de transmissão se comparado ao sangue, tendo em vista o contato com os insetos vetores (Pires *et al.* 2017). Para fragmentos de membrana alar e orelha resultado diferente foi visto em comparação com as outras fontes biológicas, com amostras negativas em todos os indivíduos. Entretanto, De Castro Ferreira (2017) detectou *Le. braziliensis* em amostras de pele de morcegos em Corumbá/ MS, sendo a pele de orelha considerado a matriz mais adequada para o diagnóstico de *Leishmania* em roedores e cães devido a sensibilidade e atuação de maneira menos invasiva (Reis *et al.* 2013; Svobodová & Votýpka, 2003); sendo possível até mesmo detecção de *Le. infantum* em pelos de morcego (Azami-Conesa *et al.* 2020).

Os resultados moleculares evidenciam que os órgãos com resultados positivos para tripanossomas podem variar entre indivíduos, demonstrando a importância de se analisar diferentes matrizes biológicas. A diferença de positividade entre os órgãos além da participação nos ciclos das doenças está associada a resposta imune de cada indivíduo interferindo na progressão e distribuição dos parasitos (Maia & Campino, 2008; Reis *et al.* 2013).

Os morcegos demonstram suportar certa tolerância a diferentes infecções (Brook & Dobson, 2015), visto em outros mamíferos o acúmulo de diferentes cepas de *T. cruzi* apresentando resposta imune atenuada (Perez *et al.* 2014; Rodrigues *et al.* 2010). A técnica de *Next-Generation Sequencing* (NGS) é corriqueiramente empregada e se mostra muito eficiente para a detecção de coinfeção de *Trypanosoma*, inclusive em morcegos coletados no Brasil (Austen & Barbosa, 2021; Dario *et al.* 2017b), podendo ser uma metodologia implementada em futuras publicações do Grupo de Estudos em Leishmanioses. Entre os morcegos positivos



mencionados anteriormente, foi identificada uma infecção mista no indivíduo M9 (*P. lineatus*) em fontes biológicas incomuns visto o ciclo biológico dos parasitos. A positividade de *Le. infantum* em amostra de coração podem estar associadas ao sangue circulante. A detecção de infecção mista em morcegos já foi constatada por De Oliveira *et al.*, (2015) em amostra de baço detectada com *Le. infantum* e *Le. amazonensis*, por Ferreira (2010) em Belo Horizonte com roedores positivos para *Le. infantum* e *Le. braziliensis*. No gênero *Trypanosoma* a múltipla infecção também foi constatada por Rangel *et al.* (2019) por *T. dionisii* e *T. cruzi* (TcI – *S. lillium* e TcIII – *A. lituratus*), e por Dario *et al.* (2017b) pela técnica de NGS, em que a maior parte das espécies de *Trypanosoma* sp. constatados foram provenientes de infecção mista, sendo uma resultante do hábito gregário dos mamíferos voadores.

Em um estudo recente, a fauna de flebotomíneos do Parque das Mangabeiras foi descrita (Serra & Meira *et al.*, 2022), sendo estes insetos predominantes em ambientes cavernícolas. A espécie *Ev. edwardsi*, foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis*, sugerindo possível participação na transmissão deste parasito, fato que já havia sido sugerido a partir de um relato de infecção natural em Cotia, São Paulo (SUCEN, 2005). Ainda com relação ao estudo conduzido por Serra & Meira *et al.*, (2022), a presença de DNA de *Le. amazonensis* e *Le. infantum* também foi detectada em flebotomíneos por técnicas moleculares, sugerindo a circulação destes agentes patogênicos.

A ausência de coletas sistemáticas neste estudo representa uma limitação para a compreensão completa da diversidade de morcegos, da positividade observada e dos estudos ecológicos comparativos. No entanto, é importante destacar o caráter colaborativo dessa pesquisa, que envolveu projetos de diferentes instituições com objetivos distintos. Apesar das limitações, a presente pesquisa revela resultados significativos sobre a fauna de quirópteros e sua infecção por tripanossomatídeos em um parque urbano, fornecendo informações valiosas para a compreensão da ecologia e epidemiologia desses animais em áreas urbanas. A detecção de espécies de morcegos predominantes na região, como *A. lituratus*, *S. lillium* e *C. perspicillata*, e sua positividade para *Leishmania* e *Trypanosoma*, ressalta a importância desses animais como hospedeiros e potenciais reservatórios de patógenos de importância em saúde pública. Nossos dados confirmam que os morcegos são hospedeiros adequados para espécies de *Trypanosoma* do clado *T. wauwau*. Além disso, a presença de insetos vetores infectados nas proximidades do parque indica a possibilidade de estabelecimento de ciclos epidemiológicos envolvendo morcegos, vetores e outros mamíferos. Esses achados destacam a necessidade de ampliar os estudos e as ações de vigilância em saúde, visando a compreensão e o controle dessas zoonoses,

não apenas no contexto do Parque das Mangabeiras, mas em outras áreas urbanas onde a interação entre morcegos e seres humanos ocorre de forma frequente.

## 7 CONCLUSÕES

- Primeiro registro de DNA da MOTU *Trypanosoma Neobat 4* fora de *C. perspicillata*, sendo detectado na espécie *A. caudifer*.
- A alta taxa de amostras contaminadas por fungos e bactérias em amostras de tecido submetidos a cultivo *in vitro* indica a necessidade de procedimentos adicionais prévios e durante a retirada dos fragmentos para garantir maior integridade das amostras.
- Detecção mista de DNA de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* no coração e sangue respectivamente, possivelmente associada a circulação sanguínea.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S. M. *et al.* Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 4-119, 2019.
- AGUIAR, L. M. S. *et al.* Habitat use and movements of *Glossophaga soricina* and *Lonchophylla dekeyseri* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Neotropical Savannah. **Zoologia, Curitiba**, v. 31, n. 3, p. 223-229, 2014.
- ALCOVER, M. M. *et al.* Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area. **Preventive veterinary medicine**, v. 175, p. 104874, 2020.
- ALVES, F. M. *et al.* Trypanosoma spp. Neobats: Insights about those poorly known trypanosomatids. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 16, p. 145-152, 2021.
- ALMEIDA, L. S. *et al.* Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 3857-3868, 2020.
- ALVES, V. R. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 251-253, 2008.
- AMADOR, L. I. *et al.* Bat systematics in the light of unconstrained analyses of a comprehensive molecular supermatrix. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 25, n. 1, p. 37-70, 2016.
- AUSTEN, J. M.; BARBOSA, A. D. Diversity and epidemiology of bat trypanosomes: a one health perspective. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1148, 2021.
- AVILA-FLORES, R.; FENTON, M. B. Use of spatial features by foraging insectivorous bats in a large urban landscape. **Journal of mammalogy**, v. 86, n. 6, p. 1193-1204, 2005.
- AZAMI-CONESA, I. *et al.* A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1101, 2021.
- AZAMI-CONESA, I. *et al.* First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 172-176, 2020.
- BAHIA F.N. *et al.* Estudo do comportamento alimentar de micos-estrela (*Callithrix penicillata* É. Geoffroy 1812) em um parque urbano em Minas Gerais. **Anais 9 Congresso de Ecologia do Brasil**; São Lourenço, Brasil, 2009.
- BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38. p. 421–42, 2005.
- BARROS, M. A.S. *et al.* Seasonal variation in the diet of the bat *Anoura caudifer* (Phyllostomidae: Glossophaginae) at the southern limit of its geographic range. **Acta Chiropterologica**, v. 15, n. 1, p. 77-84, 2013.

- BARROS, R. S. M. *et al.* Morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 6, 2006.
- BECK, H. E. *et al.* Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. **Sci. Data**. 5:180214, 2018.
- BERZUNZA-CRUZ, M. *et al.* *Leishmania (L.) mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e0003438, 2015.
- BORGHESAN, T. C. *et al.* Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. **Protist**, v. 164, n. 1, p. 129-152, 2013.
- BRAGA, R. R. *et al.* *Leishmania (Viannia) utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Vlannamyia) tuberculata* in Amazonian Brazil. **Parasite**, v. 10, n. 2, p. 111-118, 2003.
- BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 2, n. 2, p. 54-57, 1996.
- BROOK, C. E.; DOBSON, A. P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 3, p. 172-180, 2015.
- BOUCINHA, C. *et al.* Analysing ambiguities in trypanosomatids taxonomy by barcoding. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.
- CAMPOS, Aldenise M. *et al.* Species composition of sand flies (Diptera: Psychodidae) in caves of Quadrilátero Ferrífero, state of Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0220268, 2020.
- CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. *et al.* Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. **Microbial Pathogenesis**, p. 106032, 2023.
- CLÉMENT, L. *et al.* Out of Africa: the origins of the protozoan blood parasites of the *Trypanosoma cruzi* clade found in bats from Africa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 145, p. 106705, 2020.
- CORRÊA, M. M. de O. *et al.* Quirópteros hospedeiros de zoonoses no Brasil. **Bol. Soc. Bras. Mastozool.**, 67: 23-38, 2013.
- COTTONTAIL *et al.* Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panamá. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1133-1145, 2009.
- COTTONTAIL, V. M. *et al.* High local diversity of *Trypanosoma* in a common bat species, and implications for the biogeography and taxonomy of the *T. cruzi* clade. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108603, 2014.
- COURTS, S. E. Dietary strategies of Old World fruit bats (Megachiroptera, Pteropodidae). How do they obtain sufficient protein? **Mammal Review**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 185-194, 1998.

- DARIO, M. A. *et al.* High Trypanosoma spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. **Plos one**, v. 12, n. 11, p. e0188412, 2017a.
- DARIO, M. A. *et al.* Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005790, 2017 b.
- DARIO, M. A. *et al.* *Trypanosoma rangeli* genetic, mammalian hosts, and geographical diversity from five Brazilian biomes. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 736, 2021.
- DA COSTA, A. P. *et al.* Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. **Acta tropica**, v. 164, p. 185-193, 2016.
- DA CRUZ MOREIRA, O.; RAMIREZ, J. C.. Genotyping of Trypanosoma cruzi from clinical samples by multilocus conventional PCR. **T. cruzi Infection: Methods and Protocols**, p. 227-238, 2019.
- DE ARAÚJO, G. R. *et al.* Bats as hosts of *Leishmania (Leishmania) infantum* in Minas Gerais, an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 32, p. 100740, 2022.
- DE CASTRO FERREIRA, E. *et al.* *Leishmania (V.) braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: First records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. **Acta Tropica**, v. 172, p. 217-222, 2017.
- DE KNEGT, L. V. *et al.* Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 576-583, 2005.
- DE OLIVEIRA, F. M. *et al.* First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta tropica**, v. 150, p. 176-181, 2015.
- DE OLIVEIRA SENE, Camila; DA SILVA, Shirley Seixas Pereira; GUEDES, Patrícia Gonçalves. Registro de alimentação insetívora oportunista em *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Chiroptera, Phyllostomidae) em um parque urbano no município do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). **Biotemas**, v. 35, n. 4, p. 2, 2022.
- DE SOUZA LAURINDO, R.; VIZENTIN-BUGONI, J. Diversity of fruits in *Artibeus lituratus* diet in urban and natural habitats in Brazil: a review. **Journal of Tropical Ecology**, v. 36, n. 2, p. 65-71, 2020.
- DIAS, E. *et al.* Investigations on Trypanosomiasis in Bats in the State of Para. The Triatomid, *C. pilosa*, as a Vector. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 2, n. 1, 1942.
- DREXLER, Jan Felix *et al.* Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nature communications**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2012.
- DOBSON, A. P. What links bats to emerging infectious diseases? **Science**, v. 310, n. 5748, p. 628-629, 2005.
- DOS REIS, N. R. *et al.* **Morcegos do Brasil**. Univesidade Estadual de Londrina, 2007.

- DOS SANTOS, Francisco CB *et al.* Trypanosoma sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre state, Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 6, p. 828-837, 2018.
- ELLWANGER, J. H. *et al.* Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.
- ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. The triad “dogs, conservation and zoonotic diseases” – An old and still neglected problem in Brazil. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 17, n. 3, p. 157-161, 2019.
- ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Zoonotic spillover: Understanding basic aspects for better prevention. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.
- ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.
- ESPITIA, C. M. *et al.* Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC immunology**, v. 11, p. 1-12, 2010.
- ESTEVAM, L. G. T. M. *et al.* Seven years of evaluation of ectoparasites and vector-borne pathogens among ring-tailed coatis in an urban park in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100442, 2020.
- EVELYN, M. J.; STILES, D. A. Roosting Requirements of Two Frugivorous Bats (*Sturnira lilium* and *Arbiteus intermedius*) in Fragmented Neotropical Forest1. **Biotropica**, v. 35, n. 3, p. 405-418, 2003.
- FABIÁN, M. E. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero Trypanosoma Gruby, 1843. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 1, p. 69-81, 1991.
- FAVORETTO, S. M *et al.* Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa. **UNIFESP: São Paulo, Brazil**, p. 6-7, 2019.
- FENTON, M. B. Bats. New York: Facts on File. **Call no**, p. 19-20, 1992.
- FENTON, M. B. *et al.* Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. **Biotropica**, p. 440-446, 1992.
- FERREIRA, E. de C. *et al.* **Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** 2010. Tese de Doutorado Ciências da Saúde Fundação Oswaldo cruz Instituto Rene Rachou.
- FERREIRA, R. C. *et al.* A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia 1. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 427-435, 2008.

- FERREIRA, R. C. *et al.* Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1623-1638, 2007.
- FLEMING, T. H. *et al.* Three Central American bats communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. *Ecology*, New York, v. 53, n. 4, p. 556-569, 1972.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests. In: Newman SH, HE Field, CE de Jong, JH Epstein (Eds.), *FAO Animal Production and Health Manual*. 12. Rome 2011.
- FUJITA, M. S.; TUTTLE, M. D. Flying foxes (Chiroptera: Pteropodidae): threatened animals of key ecological and economic importance. **Conservation Biology**, v. 5, n. 4, p. 455-463, 1991.
- GALETTI, M. & L.P.C. MORELLATO. Diet of the large fruiteating bat *Artibeus lituratus* in a forest fragment in Brazil. *Mammalia*, Paris, 58 (4): 661-665, 1994.
- GANNON, M. R. *et al.* *Sturnira lilium*. **Mammalian Species**. n.333. New York: 1989, p.1-5.
- GARBINO G.S.T. *et al.* Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. **Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros** (Sbeq). Disponível em: <https://www.sbeq.net/lista-de-especies>. Acesso em: jul 20223
- GARDNER, A. L. Feeding habits. In: BAKER, R. J.; JONES JR., J. K.; CARTER, D. C. (Ed.). *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae. Part II. Special Publications*, Texas Tech University Museum n. 10, Lubbock: Texas Tech Press, p. 293-350, 1976.
- GARDNER, A. L. (Ed.). *Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats (Vol. 2)*. **University of Chicago Press**, 2008.
- GEGGIE, J. F.; FENTON, M. B. A comparison of foraging by *Eptesicus fuscus* (Chiroptera: Vespertilionidae) in urban and rural environments. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 2, p. 263-266, 1985.
- GUEDES, P. G. *et al.* Padrão reprodutivo, dieta e parasitologia de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) em parques urbanos do município do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). **Biotemas**, v. 33, n. 2, p. 4, 2020.
- GUHL, F *et al.* From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 9, p. 605-612, 2014.
- HAMILTON, P. B. *et al.* The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3167-3175, 2005.
- HAN, Hui-Ju *et al.* Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. **Virus research**, v. 205, p. 1-6, 2015.
- HEITHAUS, E. R *et al.* Foraging patterns and resource utilizations in seven species of bats in seasonal tropical forest. **Ecology, New York**, v. 56, n. 4, p. 841-854, 1975.

HOARE, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. **The Journal of Protozoology**, v. 11, n. 2, p. 200-207, 1964.

HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **The trypanosomes of mammals**. A zoological monograph, 1972.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385-1386, 1966.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: **American trypanosomiasis**. Elsevier. p. 249-276, 2010.

IUCN. 2022. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Acesso: 24 mar. 2023.

KALKO, E. KV; HANDLEY, C. O. Neotropical bats in the canopy: diversity, community structure, and implications for conservation. **Plant ecology**, v. 153, p. 319-333, 2001.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-17, 2017.

KOSOY, M. *et al.* Bartonella spp. in bats, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1875, 2010.

KOSTYGOV, A. Y. *et al.* Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, v. 11, n. 3, p. 200407, 2021.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

KUNZ, T. H.; RACEY, P. A. Bat biology and conservation. 1st ed. **Washington. Smithsonian: Institution Press**, 384p. 1998

KUNZ, T. H. Roosting ecology of bats. **Ecology of bats**, p. 1-55, 1982.

KUNZ, T. H. *et al.* Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1-38, 2011.

LAMPO, M. *et al.* A possible role of bats as a blood source for the Leishmania vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 6, p. 718-719, 2000.

LENT, H. *et al.* Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American museum of Natural History**, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979.

LICHTENFELS, J. R. *et al.* Filarioid nematodes in olfactory mucosa, olfactory bulb, and brain ventricular system of bats. **Transactions of the American Microscopical Society**, p. 216-219, 1981.

LOPES, C. M. T. *et al.* *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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 45-55, 2018.

LIMA, H. De *et al.* Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 412-414, 2008

LIMA, L. *et al.* Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental, and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. **Protist**, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LIMA, L. *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Trop. Elsevier BV**, v. 151, p. 166-177, 2015.

LIMA, L. *et al.* New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-18, 2015 b.

LIMA, L. *et al.* *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 1-

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MARCILI, A. *et al.* Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARGONARI, C. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 31-38, 2006.

METEYER, C. U.; BARBER, D.; MANDL, J. N. Pathology in euthermic bats with white nose syndrome suggests a natural manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 583-588, 2012.

MMA/IBAMA. **Plano de Manejo dos Parques Municipais das Mangabeiras, da Serra do Curral e Fort Lauderdale**. 2020. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/meio-ambiente/caderno-1-plano-de-manejo.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2023.

MONTEIRO, F. A. *et al.* Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. **Advances in parasitology**, v. 99, p. 265-344, 2018.

MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 1-22, 2015.

NISHIMURA, S. M. M. *et al.* Trypanosomatids in Phyllostomids (Chiroptera, Phyllostomidae) from Perobas Biological Reserve, Paraná, Brazil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 13, n. 2, 2010.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. JHU press, 1999.

NOYES, H. A. *et al.* A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia1. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 2, p. 331-339, 1999.

NOYES, H. A. *et al.* Corrigendum to "A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia"[International Journal for Parasitology 29 (2) (1999) 331-339]. **International Journal for Parasitology**, v. 2, n. 30, p. 228, 2000.

NUNES, H. *et al.* Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban ecosystems**, v. 20, p. 953-969, 2017.

World Organization for animal Health (OIE). Tripartite and UNEP support OHHLEP's definition of "One Health". <https://www.oie.int/en/tripartite-and-unep-support-ohhleps-definition-of-one-health/>. Acesso em: set. 2023

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas. **Informe de Leishmanioses**, n. 7, mar. 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leishinforme-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: jul. 2022.

O'SHEA, T. J. *et al.* Bat flight and zoonotic viruses. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 741, 2014.

PACHECO, S. M. *et al.* Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, v. 16, n. 1, p. 629-647, 2010.

PASSOS, F. C.; GRACIOLLI, G. Observações da dieta de ações da dieta de *Artibeus lituratus* (Olf ers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. 2004

PEREIRA, A. F.; ESBÉRARD, C. E L. Captura de morcegos frugívoros junto a *Ficus tomentella* (Moraceae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 11, n. 1, 2009.

PEREZ, Catherine J.; LYMBERY, Alan J.; THOMPSON, RC Andrew. Chagas disease: the challenge of polyparasitism?. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176-182, 2014.

PERINI, F. A. *et al.* Bats from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, southeastern Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 9, n. 1-2, p. 169-173, 2014.

PINTO, C. M. *et al.* Bats, trypanosomes, and triatomines in Ecuador: new insights into the diversity, transmission, and origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139999, 2015.

PINTO, C. M. *et al.* Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1251-1255, 2006.

PINTO, C. M. *et al.* Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en roedores y marsupiales en dos localidades de Manabí, Ecuador. **Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador**, v. 71, p. 225-233, 2003.

PIRES, R. de C. *et al.* **Infecção por tripanosomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) capturados em diferentes áreas do Brasil e desenvolvimento de uma PCR Multiplex como ferramenta diagnóstica da infecção por Leishmania spp. em mamíferos silvestres.** Tese de Doutorado, 2017.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE (PBH). **Parque das Mangabeiras Maurício Campos.** Abril 2023. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/fundacao-de-parques-e-zoobotanica/informacoes/parques/parque-das-mangabeiras>. Acesso em: maio 2023.

QUAN, P.L. *et al.* Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8194-8199, 2013.

QUINTANA, M. G. *et al.* Multiscale environmental determinants of *Leishmania* vectors in the urban-rural context. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

QUIROGA, N. *et al.* *Trypanosoma cruzi* DNA in *Desmodus rotundus* (common vampire bat) and *Histiotus montanus* (small big-eared brown bat) from Chile. **Acta tropica**, v. 225, p. 106206, 2022.

RAMÍREZ, J. D. *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. **Zoonoses and public health**, v. 61, n. 7, p. 477-479, 2014.

RANGEL, D. A. *et al.* Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007527, 2019.

RATZLAFF, F. R. *et al.* Prevalence and molecular detection of *Leishmania* spp. in bats from Rio Grande do Sul state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 121, n. 11, p. 3193-3202, 2022.

REIMANN, M. M. *et al.* Oral and intragastric: new routes of infection by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*? **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 688, 2022.

REIS, L. E. S. *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 498-503, 2013.

REIS, N. R.; LIMA, Isaac P. D.; PERACCHI, Adriano L. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 739-746, 2002.

REIS, N. R. *et al.* Sobre os morcegos brasileiros. **Morcegos do Brasil**, p. 17-26, 2007.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 215-224, 2006.

RODRIGUES, C. M. *et al.* Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. e846, 2010.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171-181, 2019.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSÁRIO, I. N.G. *et al.* Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 2, p. 450-459, 2017.

RUSSO, D.; ANCILLOTTO, L. Sensitivity of bats to urbanization: a review. **Mammalian Biology**, v. 80, n. 3, p. 205-212, 2015.

SARAIVA, Lara *et al.* Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. **Acta Tropica**, v. 117, n. 2, p. 137-145, 2011.

SARAIVA, L. *et al.* The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033- 1039, 2010.

SAVANI, E. S. M. M. *et al.* Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary parasitology**, 168(1-2), 5-10, 2010.

SCHAER, J. *et al.* High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17415-17419, 2013.

SCHNEIDER, A.; OCHSENREITER, T. Failure is not an option—mitochondrial genome segregation in trypanosomes. **Journal of cell science**, v. 131, n. 18, p. jcs221820, 2018.

SEHGAL, R. N. M. *et al.* Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 9, p. 2319-2327, 2001.

SERRA E MEIRA, P. C. L. *et al.* Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) and Molecular Detection of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Urban Caves of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 59, n. 1, p. 257-266, 2022.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SILVA DE ARAÚJO, M. L. V.; BERNARD, E. Green remnants are hotspots for bat activity in a large Brazilian urban area. **Urban Ecosystems**, v. 19, p. 287-296, 2016.

SIMMONS, N. B.; CIRRANELLO, A. L. Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database. **New York: American Museum of Natural History**, 2022.

SINAN. Doenças e Agravos de Notificação – 2007 em diante. Ministério da Saúde do Brasil. 2023. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>. Acesso em: junho de 2023.

SOUZA, C. M. de *et al.* Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 795-803, 2004.

STEUBER, S. *et al.* PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology research**, v. 97, p. 247-254, 2005.

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226-232, 2008.

STEVENS, J. R. *et al.* The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 107-116, 1999.

STEVENS, J. R. *et al.* The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasitol.**; 48:1-56, 2001.

STRAUBE, F. C.; BIANCONI, G. V. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. **Chiroptera Neotropical**, v. 8, n. 1-2, p. 150-152, 2002.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 137-138, 2005.

SVOBODOVÁ, M.; VOTÝPKA, J. Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and infection**, v. 5, n. 6, p. 471-474, 2003.

TEELING, E. C. *et al.* Bat biology, genomes, and the Bat1K project: to generate chromosome-level genomes for all living bat species. **Annual review of animal biosciences**, v. 6, p. 23-46, 2018.

TEELING, E. C. *et al.* Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1431-1436, 2002.

TENCATE L. C. *et al.* Estudo da microbiota fúngica gastrointestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**; 49(2): 146–152, 2012.

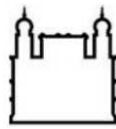
THOMAS, D. W. Fruit intake and energy budgets of frugivorous bats. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 57, n. 4, p. 457-467, 1984.

- THOMAS, M. E. *et al.* Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 559-565, 2007.
- TORQUETTI *et al.* Differences between caves with and without bats in a Brazilian Karst habitat. **Zoologia**, v.34, p.1-7, 2017.
- TRAJANO, E. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 5, p.255-320, 1985.
- TRAJANO, E. Movements of cave bats in Southeastern Brazil, with emphasis on the population ecology of the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera). **Biotropica**, Malden, v. 281, p. 121-129, 1996
- VANDEL, A. Biospeleology: the biology of cavernicolous animals. **Elsevier**, 2013.
- VICKERMAN, K. W. H. R. The diversity of the kinetoplastid flagellates. **Biology of the Kinetoplastida**, p. 1-34, 1976.
- VIEIRA, T. M. *et al.* Leishmania diversity in bats from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106327, 2022.
- VIEIRA, T. M. **Ocorrência natural de tripanossomatídeos em morcegos coletados no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil**. 2016. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.
- VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto. **Boletim de Ciências da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**, v. 1, p. 1-72, 1973.
- VOLOKHOV, D. V. *et al.* Novel hemotropic mycoplasmas are widespread and genetically diverse in vampire bats. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 15, p. 3154-3167, 2017.
- WALLACE, F. G. *et al.* Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids 1. **The Journal of protozoology**, v. 30, n. 2, p. 308-313, 1983.
- YURCHENKO, V. *et al.* Genomics of Trypanosomatidae: where we stand and what needs to be done? **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1124, 2021.
- ZHANG, G. *et al.* Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. **Science**, v. 339, n. 6118, p. 456-460, 2013.
- ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance, and research applications. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.
- ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of chagas disease? **Revista da Biologia**, v. 6, n. 2, p. 44-48, 2011.
- ZORTÉA, M.; CHIARELLO, A. G. Observations on the big fruiteating bat, *Artibeus lituratus* in an urban reserve of southeast Brazil. **Mammalia, Paris**, v. 58, n. 4, p. 665-670, 1994.

ZORTÉA, M. Padrões reprodutivos e alimentares de três morcegos nectarívoros (Phyllostomidae: Glossophaginae) numa área de Cerrado do Brasil Central. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 159-168, 2003.

## ANEXOS

## Anexo 1: Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais – CEUA Fiocruz



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

 Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções  
 Biológicas - VPPCB

**Comissão de Ética**  
**no Uso de Animais**


---

**LICENÇA**
**LW-3/23**

Certificamos que o protocolo (P-37/21.5), intitulado "**Hospedeiros e Reservatórios de Leishmania sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópico no estado de Minas Gerais**", sob a responsabilidade de **JOSE DILERMANDO ANDRADE FILHO**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

**Esta licença tem validade até 30/11/2026 e inclui o uso total de:**

**Marsupialia**

- 90 machos.

- 90 fêmeas.

**Rodentia**

- 90 machos.

- 90 fêmeas.

**Chiroptera**

- 20 machos.

- 20 fêmeas.

**Mesocricetus auratus**

- 100 machos de Golden.

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2022.

**Etelcia Molinaro**  
**Coordenadora da Ceua/Fiocruz**



## Anexo 2: Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais – CEUA PUC MINAS



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais  
Pró-reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA PUC Minas

### PARECER DA CEUA PUC MINAS

Certificamos que o projeto intitulado “**Comparação da concentração de metais pesados em diferentes matrizes biológicas de morcegos**”, protocolo nº **14/2022**, sob a responsabilidade de **Professora Dra. Sônia Talamoni** – que envolve o uso de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA- PUC Minas) da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, em 12/07/2022.

<b>Vigência do projeto</b>	12/07/2022 a 31/03/2023
<b>Espécie</b>	<b>Número de animais</b>
<i>Artibeus lituratus</i>	14
<i>Artibeus planirostris</i>	14
<i>Artibeus obscurus</i>	14
<i>Carollia perspicillata</i>	14
<i>Anoura geoffroyi</i>	14
<i>Glossophaga soricina</i>	14
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	14
<i>Myotis levis</i>	14
<b>Equipe envolvida</b>	Sonia Aparecida Talamoni
	Jennifer Emanuele Ferreira
	Leonardo dos Santos Soares
	Fernanda Santos Delgado Silva
	Sarah Felipe Bessa
	Lucilaine Valéria de Souza Santos

*Gisele Pires M. Dantas*

**Profa. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas**  
**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- PUC Minas**

Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, 2º. andar - sala 228 - Fone: 3319-4517  
CEP 30535-610 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil  
ceua@pucminas.br

### Anexo 3: Licença de coleta e sacrifício dos quirópteros - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80543-4	Data da Emissão: 03/05/2023 16:26:59	Data da Revalidação*: 01/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: MARIANA ALVES LIMA	CPF: 143.962.926-94
Título do Projeto: Estudo das leishmanioses em área de ecoturismo de Minas Gerais ? importância dos flebotomíneos e de mamíferos voadores na manutenção de um ciclo silvestre.	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e transporte de flebotomíneos e morcegos	07/2023	12/2023
2	Coleta e transporte de flebotomíneos e morcegos	01/2022	06/2023

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	SÔNIA APARECIDA TALAMONI	coleta, identificação e manejo dos quirópteros	050.741.568-07	Brasileira
2	Jennifer Emanuele Ferreira	coleta, identificação e manejo dos quirópteros	127.193.876-65	Brasileira
3	JOSÉ DILERMANDO ANDRADE FILHO	coleta, identificação e análise ecológica de flebotomíneos	835.584.546-34	Brasileira
4	Felipe Dutra Rêgo	coleta, identificação e análise ecológica de flebotomíneos	059.973.946-03	Brasileira
5	DEBORA CRISTINA CAPUCCI	coleta, identificação e análise ecológica de flebotomíneos	080.115.636-02	Brasileira
6	LETICIA GRACIELLE TORRES DE MIRANDA ESTEVAM	Responsável pelos procedimentos de anestesia e eutanásia	097.361.266-50	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0805430420230503

Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80543-4	Data da Emissão: 03/05/2023 16:26:59	Data da Revalidação*: 01/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: MARIANA ALVES LIMA	CPF: 143.962.926-94
Título do Projeto: Estudo das leishmanioses em área de ecoturismo de Minas Gerais ? importância dos febotomíneos e de mamíferos voadores na manutenção de um ciclo silvestre.	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena, III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Portaria ICMBio nº 748/2022, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0805430420230503

Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80543-4	Data da Emissão: 03/05/2023 16:26:59	Data da Revalidação*: 01/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: MARIANA ALVES LIMA	CPF: 143.962.926-94
Título do Projeto: Estudo das leishmanioses em área de ecoturismo de Minas Gerais ? importância dos flebotomíneos e de mamíferos voadores na manutenção de um ciclo silvestre.	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Outras ressalvas

1		CBC Brasília-DF
2		PARNA da Serra do Gandarela
3	Não está autorizada a coleta/transporte de fêmeas prenhes, lactantes ou com filhotes, sendo necessário a soltura de indivíduos nestas condições no mesmo local da captura.	CENAP Atibaia-SP
4	O pesquisador e a equipe relacionada (exceto colaboradores locais) nesta autorização podem ter acesso às cavidades preestabelecidas do projeto.	CECAV Brasília-DF

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Caeté	Caeté-MG	Mata Atlântica	Sim	Fora de UC Federal
2	Parque Nacional da Serra do Gandarela	MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
3	Serra da Piedade	Caeté-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dentro de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dentro de Caverna
3	Captura de animais silvestres in situ	Dentro de Caverna
4	Observação e gravação de imagem ou som em caverna	Dentro de Caverna
5	Levantamento de dados abióticos em caverna	Dentro de Caverna
6	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dentro de Caverna
7	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dentro de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Observação e gravação de imagem ou som em caverna	Chiroptera	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera	-
3	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera	-
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera	10
5	Observação e gravação de imagem ou som em caverna	Psychodidae	-
6	Captura de animais silvestres in situ	Psychodidae	-
7	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Psychodidae	5000

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0805430420230503

Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 80543-4	Data da Emissão: 03/05/2023 16:26:59	Data da Revalidação*: 01/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: MARIANA ALVES LIMA	CPF: 143.962.926-94
Título do Projeto: Estudo das leishmanioses em área de ecoturismo de Minas Gerais ? importância dos flebotomíneos e de mamíferos voadores na manutenção de um ciclo silvestre.	
Nome da Instituição: CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Psychodidae	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Insetos)	Secreção
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Urina
3	Método de captura/coleta (Insetos)	Armadilha luminosa, Captura manual
4	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	Laboratório
2	SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0805430420230503

Página 4/5



## Anexo 4: Licença de coleta e sacrifício dos quirópteros - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 82980-1	Data da Emissão: 12/05/2022 08:22:02	Data da Revalidação*: 12/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: SÔNIA APARECIDA TALAMONI	CPF: 050.741.568-07
Título do Projeto: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS DE MORCEGOS	
Nome da Instituição: SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	CNPJ: 17.178.195/0001-67

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	captura de morcegos e coleta de amostras de pelo	04/2022	04/2024
2	elaboração de dissertação de mestrado	04/2022	03/2023
3	determinação da concentração de metal pesado em tecidos e em pelo	10/2022	10/2024
4	elaboração e defesa de dissertação de mestrado	03/2023	03/2024
5	elaboração de 3 relatórios anuais	04/2022	03/2024

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Jennifer Emanuele Ferreira	Pesquisador	127.193.876-65	Brasileira
2	VITÓRIA LOUISE XISTO CHIOLDI	Pesquisador	140.929.926-02	Brasileira
3	Talita de Oliveira Farias	Pesquisador	116.775.396-82	Brasileira
4	Luisa Lauren Lima Vidal	Pesquisador	112.732.606-60	Brasileira
5	FERIANDA SANTOS DELGADO SILVA	Estagiário - Estudante de Ciências Biológicas	154.498.796-01	Brasileira
6	SARAH FELIPE BESSA	Estagiário - Estudante de Ciências Biológicas	022.280.226-08	Brasileira
7	LEONARDO DOS SANTOS SOARES	Estagiário - Estudante de engenharia Química	470.753.048-60	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0829800120220512

Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 82980-1	Data da Emissão: 12/05/2022 08:22:02	Data da Revalidação*: 12/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: SÔNIA APARECIDA TALAMONI	CPF: 050.741.568-07
Título do Projeto: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS DE MORCEGOS	
Nome da Instituição: SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	CNPJ: 17.178.195/0001-67

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosprosperção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0829800120220512

Página 2/5





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 82980-1	Data da Emissão: 12/05/2022 08:22:02	Data da Revalidação*: 12/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: SÔNIA APARECIDA TALAMONI	CPF: 050.741.568-07
Título do Projeto: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS DE MORCEGOS	
Nome da Instituição: SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	CNPJ: 17.178.195/0001-67

#### Outras ressalvas

1	Não está autorizada a coleta/transporte de fêmeas prenhes, lactantes ou com filhotes, sendo necessário a soltura de indivíduos nestas condições no mesmo local da captura.	CENAP Atibaia-SP
---	--	------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	PARNIA Cipó	Jaboticatubas-MG	Cerrado	Não	Dentro de UC Estadual
2	Parque Estadual do Rio Doce	Marliéria-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
3	Área de Proteção Especial da Mutuca	Nova Lima-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
4	Área de Proteção Especial Manancial Serra Azul (APE Serra Azul)	Juatuba-MG	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
5	Parque das Mangabeiras	Belo Horizonte-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
6	APA Carste de Lagoa Santa (Fazenda Cauaia)	Matosinhos-MG	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
7	Serra da Piedade	Caeté-MG	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
8	RPPN Santuário do Caraça	Catás Altas-MG	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Atividades ex-situ (fora da natureza)

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Chiroptera	-
2	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera	-
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera	13

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

\*A quantidade significa por espécie X localidade X ano.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0829800120220512

Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 82980-1	Data da Emissão: 12/05/2022 08:22:02	Data da Revalidação*: 12/05/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: SÔNIA APARECIDA TALAMONI	CPF: 050.741.568-07
Título do Projeto: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS DE MORCEGOS	
Nome da Instituição: SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	CNPJ: 17.178.195/0001-67

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Pêlo
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puçã, Rede de neblina

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	SOCIEDADE MINEIRA DE CULTURA	Laboratório

*Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).*

Código de autenticação: 0829800120220512

Página 4/5



## Anexo 5: Carta de aceita para depósito de exemplares no Museu de Ciências Naturais da PUC Minas.



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Museu de Ciências Naturais

MCN/CA-09/2022

Belo Horizonte, 13 de janeiro de 2022

Ao Órgão Ambiental Competente

### CARTA DE ACEITE

O Museu de Ciências Naturais PUC Minas manifesta o interesse em receber exemplares da Mastofauna e Quiropterofauna provenientes do Projeto projeto intitulado "Hospedeiros e Reservatórios de Leishmania sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópico no estado de Minas Gerais".

O trabalho será coordenado pelo Biólogo José Dilermando Andrade Filho (CRBio 13789/4) do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas.

Os laboratórios do Museu de Ciências Naturais PUC Minas encontram-se plenamente capacitados a receber o referido material sob condições satisfatórias de armazenamento e consulta. Todos os espécimes depositados nesta instituição estarão à disposição de pesquisadores.

Informamos que as normas dos laboratórios do Museu para recebimento dos exemplares são: os exemplares da Mastofauna deverão ser entregues com a pele taxidermizada e o esqueleto congelado; os exemplares da Quiropterofauna deverão ser entregues fixados e mantidos em álcool 70% ;todo material biológico deve ser acompanhado de planilha constando data de coleta, local (incluindo município e coordenadas geográficas) e cópia da licença do Órgão Ambiental Competente.

É essencial que os técnicos responsáveis pela realização do trabalho de campo tenham conhecimento dos procedimentos citados acima. Caso o material não se encontre conforme explicitado ou na ausência de dados e/ou documentos, o mesmo não será aceito.

Solicitamos que caso nenhum material testemunho for coletado gentileza comunicar aos curadores das coleções.

  
Marco Aurélio Cerqueira Veloso  
(CRBio 030736/04D)

  
Prof. Bonifácio José Teixeira  
Coordenador

**Anexo 6: Artigo “Molecular detection of *Leishmania* and blood meal analysis sand flies from Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil” realizado e publicado durante o período do mestrado.**

Acta Tropica 245 (2023) 106961



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)



**Molecular detection of *Leishmania* and blood meal analysis in sand flies from Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil**

Felipe Dutra-Rêgo<sup>a, \*</sup>, Mariana Alves Lima<sup>a</sup>, Giovana Luísa Pereira Almeida<sup>a</sup>, Paulo Silva de Almeida<sup>b</sup>, Grace Kelly Sguario do Valle Bastos<sup>c</sup>, Luiza Vilalva das Neves Alexandre<sup>c</sup>, Rodrigo Daltro Samaniego<sup>c</sup>, Walkiria Arruda da Silva<sup>c</sup>, Alcides de Moraes Ogaya<sup>c</sup>, José Dilermando Andrade-Filho<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Estudo em Leishmanioses, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório Regional de Entomologia de Dourados, Núcleo Regional de Saúde, Secretaria Estadual de Saúde, Mato Grosso Sul, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório Regional de Entomologia da Gerência de Vigilância em Saúde de Corumbá, Secretaria Municipal de Saúde, Mato Grosso do Sul, Brasil

ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Sand fly  
*Leishmania*  
Cutaneous leishmaniasis  
Molecular detection  
Brazil

ABSTRACT

In this study, we investigated the presence of *Leishmania* in sand flies collected from a peridomestic area in Corumbá, Mato Grosso do Sul, after an autochthonous case of cutaneous leishmaniasis was confirmed. A total of 1,542 sand flies belonging to seven species were collected, with *Lu. cruzi* being the most prevalent (94.3%). We detected the presence of DNA from *Le. infantum* (7 pools) and *Le. braziliensis* (3 pools) by sequencing the ITS1 amplicon in ten pools, all of which were composed of engorged (3) and non-engorged (7) females of *Lu. cruzi*. We collected 24 engorged females, with *Homo sapiens* being the most common blood meal source (91.6%), followed by *Dasyprocta azarae* and *Canis lupus familiaris* (4.2% each). To our knowledge, this is the first molecular evidence of *Le. braziliensis* in wild-caught *Lu. cruzi* in Brazil, suggesting its potential role as a vector for this parasite.