



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

DOUTORADO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM MAMÍFEROS
SILVESTRES ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA - BAHIA**

**PATRÍCIA HERCILIA ARCANJO DE ALMEIDA
BIÓLOGA**

**SALVADOR – BAHIA
DEZEMBRO, 2020**

PATRÍCIA HERCÍLIA ARCANJO DE ALMEIDA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM MAMÍFEROS
SILVESTRES ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA - BAHIA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

SALVADOR – BA

DEZEMBRO DE 2020

“Dedico este trabalho ao meu filho,
João Miguel. Ele me ensinou o que é ser
resiliente em todos os aspectos da vida”.

**Hemoparasitos em mamíferos silvestres oriundos da Mata Atlântica – Bahia:
Revisão sistemática, meta-análise e detecção molecular**

PATRÍCIA HERCÍLIA ARCANJO DE ALMEIDA

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal
nos Trópicos**

Salvador, 17 de dezembro de 2020

Comissão examinadora:



**Dr. Aristeu Vieira da Silva
Presidente da banca
UEFS**



**Dr. Artur Gomes Dias Lima
UNEB**



**Dr. Eddy José Francisco de Oliveira
UEFS**



Marcelo Biondaro Gois (Nov 18, 2024 05:57 AST)

**Dr. Marcelo Biondaro Gois
UFRB**



**Dr.ª Silvane Maria Braga Santos
UEFS**



**Dr. Luís Fernando Pita Gondim
Coordenador PPGCAT
EMEVZ / UFBA**

Termo aprovação - Patrícia Hercília

Final Audit Report

2024-11-21

Created:	2024-11-18
By:	ARISTEU V SILVA (aristeuvsilva@gmail.com)
Status:	Signed
Transaction ID:	CBJCHBCAABAAJKbh-td9H-8X9P_YM3C6Lj64Me372AI5

"Termo aprovação - Patrícia Hercília" History

-  Document created by ARISTEU V SILVA (aristeuvsilva@gmail.com)
2024-11-18 - 9:49:24 AM GMT- IP address: 177.42.194.52
-  Document emailed to Aristeu Vieira da Silva (aristeuvsilva@uefs.br) for signature
2024-11-18 - 9:49:28 AM GMT
-  Document emailed to Eddy José Francisco (eddyfo@gmail.com) for signature
2024-11-18 - 9:49:28 AM GMT
-  Document emailed to Artur Gomes de Lima (parasitologista@gmail.com) for signature
2024-11-18 - 9:49:28 AM GMT
-  Document emailed to Silvane Maria Braga Santos (silvane@uefs.br) for signature
2024-11-18 - 9:49:28 AM GMT
-  Document emailed to Marcelo Biondaro Goes (marcelobiondaro@gmail.com) for signature
2024-11-18 - 9:49:28 AM GMT
-  Email viewed by Aristeu Vieira da Silva (aristeuvsilva@uefs.br)
2024-11-18 - 9:49:46 AM GMT- IP address: 66.249.88.2
-  Document e-signed by Aristeu Vieira da Silva (aristeuvsilva@uefs.br)
Signature Date: 2024-11-18 - 9:50:02 AM GMT - Time Source: server- IP address: 177.42.194.52
-  Email viewed by Marcelo Biondaro Goes (marcelobiondaro@gmail.com)
2024-11-18 - 9:54:18 AM GMT- IP address: 74.125.210.128
-  Signer Marcelo Biondaro Goes (marcelobiondaro@gmail.com) entered name at signing as Marcelo Biondaro Gois
2024-11-18 - 9:57:41 AM GMT- IP address: 170.245.69.65
-  Document e-signed by Marcelo Biondaro Gois (marcelobiondaro@gmail.com)
Signature Date: 2024-11-18 - 9:57:43 AM GMT - Time Source: server- IP address: 170.245.69.65

 Email viewed by Eddy José Francisco (eddyfo@gmail.com)

2024-11-18 - 10:47:31 AM GMT- IP address: 74.125.210.129

 Document e-signed by Eddy José Francisco (eddyfo@gmail.com)

Signature Date: 2024-11-18 - 10:49:07 AM GMT - Time Source: server- IP address: 200.128.81.2

 Email viewed by Artur Gomes de Lima (parasitologista@gmail.com)

2024-11-18 - 11:40:08 AM GMT- IP address: 66.249.88.5

 Email viewed by Silvane Maria Braga Santos (silvane@uefs.br)

2024-11-19 - 10:52:22 PM GMT- IP address: 66.249.88.1

 Document e-signed by Silvane Maria Braga Santos (silvane@uefs.br)

Signature Date: 2024-11-19 - 10:53:59 PM GMT - Time Source: server- IP address: 177.42.194.49

 Document e-signed by Artur Gomes de Lima (parasitologista@gmail.com)

Signature Date: 2024-11-21 - 6:25:46 PM GMT - Time Source: server- IP address: 191.136.219.160

 Agreement completed.

2024-11-21 - 6:25:46 PM GMT

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Patrícia Hercília Arcanjo de Almeida

Nascida em 24 de abril de 1987, na cidade de Itabuna - BA

Possui graduação em Ciências Biológicas (2011). Mestre em Zoologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Atualmente é doutoranda no Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos na Universidade Federal da Bahia e atua como pesquisadora do grupo de pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública na linha molecular e epidemiologia das zoonoses da UEFS.

Produções Bibliográficas

- ALMEIDA, P. H. A.; SANTANA, P.C.S; SILVA, A. V. Prevalência de protozoários e helmintos entéricos em residentes de São Cristóvão, Feira de Santana, Bahia, Brasil. v.16, p.61 - 66, 2012.
- SANTOS,S.A.;ALMEIDA,P.H.A.;SILVA, A.V.*Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Stylommatophora, achatinidae) em um município do semi-árido baiano: ocorrência, habitat e morfologia. In: XVIII encontro de zoologia do nordeste, com o tema 'do oceano ao sertão', 2013, 2013,Maceió.livro de resumos xviii ezn 2013. , 2013.
- SILVA, A.V.ALMEIDA, P.H.A. SANTOS, S.A.A. *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (STYLOMMATOPHORA, ACHATINIDAE): Um novo vetor de Giardia? In: XVIII Encontro de Zoologia do Nordeste, com o tema ' Do oceano ao Sertão, 2013, Maceió. LIVRO DE RESUMOS XVIII EZN. , 2013.
- ALMEIDA, P. H. A.; SANTOS, S. A. A.; SILVA, A. V. Detecção de *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium* sp em *Achatina fulica* bowdich (1822) In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013, Florianópolis. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul.
- ALMEIDA, P. H. A.; SANTOS, S. A. A.; SILVA, A. V; GUERRA, L. M. S. M. E. M.; OLIVEIRA, P. M. V.; Borges, J.N; Ferreira, K.A.Nematódeos de Interesse Médico Veterinário Infectando *Achatina fulica* em Feira de Santana, Semi-árido Baiano In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2013, Florianópolis. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul. , 2013.
- SANTOS, S. A. A.; ALMEIDA, P. H. A.; M, V; SILVA, A. V; GUERRA, L. M. S. M. E. M.; OLIVEIRA, P. M. V.; Borges, J.N; Ferreira, k.A. Presença de oocistos de *Cryptosporidium* ssp. em *Achatina fulica* In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia- III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013, Florianópolis. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul. , 2013.
- LISBOA, L. J.; ALMEIDA, P. H. A.; FREITAS, L.A.S; TEQUE, T. O. S.; SANTOS, J.G.A Experiência da Formação do Grupo de Adolescentes na Unidade de Saúde da Família São Cristóvão- Distrito de Tiquaruçu- Feira de Santana- Ba In: Congresso Acadêmico de Odontologia, 2011, Lauro de Freitas. IV Congresso Acadêmico de Odontologia- CONAO e III Encontro dos ex-alunos de Odontologia da UNIME. , 2011.
- LISBOA, L. J.; ALMEIDA, P. H. A.; FREITAS, L.A.S; TEQUE, T. O. S.; SANTOS, J.G. O papel do ACS no desenvolvimento das ações do pet-saúde In: 1º Encontro Baiano de Reabilitação Oral e 10ª Jornada Odontológica da Bahiana, 2011, Salvador. 1º Encontro Baiano de Reabilitação Oral e 10ª Jornada Odontológica da Bahiana. , 2011.
- FREITAS, L.A.S; ALMEIDA, P. H. A.; LISBOA, L. J.; TEQUE, T. O. S.; BARBONI, S. A.V.ATIVIDADES DESENVOLVIDAS/EXPERIÊNCIAS VIVENCIADAS NO PET-SAÚDE DA FAMÍLIA NA UNIDADE DE SAÚDE DA FAMÍLIA SÃO CRISTÓVÃO – DISTRITO DE TIQUARUÇU – FEIRA DE SANTANA, BAHIA - 2010 In: VII Jornada de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010, Feira de Santana. I Amostra do PET-Saúde/ UEFS. , 2010.
- ALMEIDA, P. H. A. Caracterização genotípica de *Trypanossoma Cruzi* detectados em animais selvagens de duas regiões da Bahia, 2017. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).
- ALMEIDA, P. H. A.; SANTOS, S. A. A.; SILVA, A. V. Avaliação da presença de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Pulmonata) e estudo dos helmintos e protozoários associados, em Feira de Santana, Bahia, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos são especialmente orientados...

À Deus, luz e motivação de todos os meus passos e caminhos.

Ao meu orientador, Aristeu Vieira da Silva, pelo amparo e constante empenho no trabalho. Por compreender minhas limitações, necessidades e anseios e pelo incentivo, paciência no decorrer desses três anos e meio.

À minha amiga e colega de doutorado Maria da Conceição, pela paciência, por compartilhar momentos de estudos, de processamento de amostras no laboratório e ainda, por dividir comigo a sua “BAT- CAVERNA” e pelos bons momentos que passamos durante esse tempo de doutorado que jamais esquecerei.

À Universidade Federal da Bahia, por permitir a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, pela oportunidade de realizar o meu doutorado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos pelos ensinamentos durante o curso.

À secretária do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, pelo grande apoio e atenção dedicados aos alunos do mestrado e doutorado.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia (LABIO) da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo apoio e incentivo no decorrer desde trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior, Capes, pelo suporte concedido na forma de Bolsa de Estudos: "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)-Código de financiamento 001*". À FAPESB pela concessão dos recursos financeiros que apoiaram a execução do projeto, pelo Edital Programa Núcleos Emergentes – PRONEN (Termo de Outorga PNE0001/2014).

Ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (UESC), em especial ao Prof. Dr. George Albuquerque e toda a sua equipe pela ajuda na coleta de animais silvestres no Baixo Sul e armazenamento das amostras. Muito, Obrigada!

Ao Instituto Evandro Chagas, em especial ao Dr. Márcio, a Jedson Cardoso, a Poliana Lemos por toda ajuda na realização do Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) FIOCRUZ- SALVADOR, chefiado por Dra. Milena Botelho Pereira Soares que cedeu as cepas de *Trypanosoma* para realizações das PCRs. Não poderia deixar de agradecer à Tanira Bastos, a pessoa que entrei em contato e que nos deu todo o suporte e atenção para o envio das cepas.

Ao Laboratório de Entomologia (LENT- UEFS), em especial ao Professor Eddy pelo suporte físico e auxílio nas etapas envolvendo às técnicas de biologia molecular e as funcionárias Luciara e Joelande por toda disposição durante o trabalho e pelas dicas de PCRs.

Ao Prof. Dr. Téo Veiga de Oliveira e sua equipe do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana pela atenção e por disponibilizar amostras de mamíferos utilizadas no trabalho, bem como os dados de identificação das espécies e as coordenadas geográficas.

As funcionárias em especial, Selma, Aline, Patrícia, Alane, Cíntia e aos estagiários em especial, Matheus e Rebeca do laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS (LAC-UEFS).

À Gorete, pelo grande apoio, por todos os conselhos, e pelo grande carinho e atenção dedicados a mim durante essa pesquisa.

Aos meus pais Tania Arcanjo e Paulo Henrique, pelo apoio completo e incondicional. Tudo que me ensinaram contribui para que eu chegasse até aqui e eu espero poder retribuir tudo que vocês sempre fizeram e fazem por mim.

Às minhas irmãs Fernanda e Anita, que nos momentos mais difíceis sempre ressaltavam que acreditavam no meu potencial. Ser vista como exemplo por elas é um grande orgulho e não há palavras que definam o apoio e o amor recebido.

Ao meu esposo Geovane, meu eterno agradecimento por compreender todos os meus momentos de dificuldades. Seu valioso e incansável apoio foi fundamental para continuar essa jornada. Obrigada, por tudo!

Finalmente, ao AMOR da minha vida, João Miguel, Luz da minha vida! Para você meu amor, um grande beijo da mamãe e meu eterno obrigado. AMO VCS!

E não vai demorar que passemos adiante (...) o alto escopo de uma grande ciência, de uma grande e bela ciência, que faz arte na defesa da vida.

Carlos Chagas, 1928.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DC- doença de Chagas

DM – Divisão de Mamíferos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTU- Unidades discretas de tipificação

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

kDNA- Ácido Desoxirribonucleico circular do cinetoplasto

Md- Mediana

mtDNA- DNA mitocondrial

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

NGS - *Next-Generation Sequencing* (Sequenciamento de última geração)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

RS- Revisão Sistemática

SARS- Síndromes respiratórias severas

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UESC- Universidade Estadual de Santa Cruz

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Informações revelantes dos 35 artigos incluídos para as análises quantitativas sobre a infecção de <i>T. cruzi</i> em mamíferos silvestres no Brasil.	45
Tabela 2.	Estatísticas descritivas (número de animais examinados, N; frequência absoluta de positivos, Fi; frequência relativa de positivos, fi; intervalo de confiança para a frequência relativa de positivos; IC95%) e meta-análise (número de estudos incluídos na análise, NE; frequência combinada de positivos, FC; intervalo de confiança para a frequência combinada de positivos; IC95%; estatísticas I^2 e Q) segundo a natureza do método diagnóstico de <i>Trypanosoma</i> e ordem de mamíferos silvestres avaliada, em artigos brasileiros do período de 2000 a 2020.	46
Tabela 3.	Identificação dos mamíferos silvestres segundo a ordem, gênero e espécies capturados e examinados para infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nos municípios de Belmonte, Ilhéus, Una e Mascote na Bahia, Brasil, 2020.	65
Tabela 4.	Composição dos <i>pools</i> de amostras de tecidos de mamíferos selvagens segundo o número de amostras, a ordem e espécie do mamífero e a localidade de coleta. Feira de Santana, 2020.	78
Tabela 5.	Espécie de protozoário sequenciado, número de contigs distribuídos por cada espécie de parasito detectado, número total de contigs por amostra e o número de acesso no Blastx, oriundos do litoral Sul da Bahia, 2020.	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Fluxograma do processo de busca e seleção para as análises qualitativas e quantitativas de artigos originais sobre a detecção de *Trypanosoma* em mamíferos silvestres no Brasil no período de 2000 a 2020..... 44
- Figura 2. Localização dos municípios do Estado da Bahia onde foram coletadas amostras dos mamíferos silvestres: Belmonte (verde); Ilhéus (Laranja); Mascote (Rosa); Una (amarela). 62
- Figura 3. Imagem do gel de agarose corado com Bioed da nested PCR para a amplificação de 480 bp da região minicírculo KDNA utilizando os primers S17 e S18 a partir de órgãos de mamíferos silvestres. (PM) marcador; 1-11 amostras; 12 e 13 controles positivos 14-16 controles negativos. 65
- Figura 4. Localização dos municípios do Estado da Bahia onde foram coletadas amostras dos mamíferos silvestres: Belmonte (Verde); Ilhéus (laranja); Mascote (Rosa); Una (amarelo). 75

SUMÁRIO

DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA-BAHIA	12
Resumo geral	13
General abstract	14
Introdução Geral	15
Objetivo Geral.....	16
Específicos	16
Revisão de Literatura	17
O Gênero <i>Trypanosoma</i>	17
<i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	18
Reservatórios do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Ordem Didelphimorphia	21
Ordem Chiroptera.....	22
Ordem Rodentia	24
Infecção pelo <i>T. cruzi</i> em Rodentia, Chiroptera e Didelphimorfia	25
Métodos de diagnóstico molecular.....	27
Plataforma de sequenciamento de DNA de nova geração (NGS).....	28
Bioma Mata Atlântica	29
Referências Bibliográficas	30
Capítulo 1 – Detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> em mamíferos silvestres no Brasil: Revisão Sistemática e Meta-análise.....	38
Resumo	39
Abstract.....	39
Introdução	40
Métodos	41
Estratégia de busca.....	41
Critérios de Inclusão e Exclusão	42
Extração dos Dados.....	42
Análise Estatística	43
Resultados	43
Referências.....	51
CAPÍTULO 2 – Ocorrência de <i>Trypanosoma cruzi</i> em mamíferos silvestres oriundos da Mata Atlântica - Bahia.....	58
Resumo	59
Abstract.....	59
Introdução	60
Material e Método.....	61
Área de estudo.....	61
Captura e Coleta.....	62
Aspectos éticos.....	63
Processamento das amostras	63

Análise molecular do material biológico	63
Resultados e Discussão	64
Referências.....	68
CAPÍTULO 3 – Protozoários em amostras de tecidos de roedores e marsupiais e da Mata Atlântica-Bahia	71
Resumo	72
Abstract	73
Introdução	73
Material e Método.....	74
Área de Estudo	74
Captura e Coleta.....	75
Extração do DNA total.....	76
Sequenciamento na Plataforma <i>ION Torrent PGM</i>	77
Bioinformática.....	77
Análises Estatísticas	77
Resultados	78
Coleta de mamíferos e composição dos pools de amostras de tecidos.....	78
Sequenciamento do DNA mitocondrial de protozoários.....	78
Conclusão.....	82
Referências.....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
ANEXO A: Preceitos indicados pelo protocolo PRISMA.....	86
ANEXO B: Autorização para coleta de material Zoológico-UESC.....	88
ANEXO C: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da UESC	90
APÊNDICE A: Estratégias de buscas utilizadas para pesquisa de literatura	91

DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-
VOADORES ORIUNDOS DA MATA ATLÂNTICA-BAHIA

Resumo geral

DE ALMEIDA, P.H.A. **Detecção molecular de protozoários em animais silvestres oriundos da Mata Atlântica.** 2020, 92p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia.

A Mata Atlântica é um bioma que apresenta uma grande diversidade de espécies endêmicas, como também a que possui o maior índice de espécies com perigo de extinção, fato este que torna o bioma como um *hotspot* para a preservação da biodiversidade. O desequilíbrio ambiental possui um forte poder na difusão e no aparecimento de doenças parasitárias em mamíferos silvestres, e dentre as parasitoses encontradas tem-se aquelas causadas por protozoários. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as taxas de infecção entre diferentes ordens de mamíferos no Brasil, através da revisão sistemática e meta-análise e conhecer a diversidade de protozoários em pequenos mamíferos oriundos do litoral Sul baiano no Estado da Bahia. Para a revisão foi realizada uma busca nas bases de dados *Pubmed*, *Medline*, *Lilacs*, *Science direct* e *SciELO*, sem filtro de idioma e com filtro de tempo de 2000-2020. Para condução desse processo, adotou-se a ferramenta *StArt*. Com base nos critérios de seleção todos os estudos que relatavam a infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil foram escolhidos. Para análises estatísticas foi utilizada a estatística descritiva e a meta-análise do evento dicotômico com a distribuição binomial, conduzida em Microsoft Excel. Para avaliar a heterogeneidade entre os estudos foi utilizado o cálculo das estatísticas Q e I^2 . Depois de ler todos os resumos e com base nos critérios de seleção, 35 estudos continha informações importantes da infecção em mamíferos silvestres. Entre as nove ordens de mamíferos silvestres identificadas como reservatório para o *T. cruzi*, três dessas ordens apresentaram maior frequência combinada: Chiroptera (55,57%); Carnívora (38,10%) e Primata (27,85%), pelo diagnóstico molecular. A detecção de protozoários foi realizada a partir de amostras de tecidos de mamíferos silvestres das ordens Rodentia e Didelphimorphia, em *pool* de órgãos (coração, encéfalo, pulmão, fígado e baço) de cada animal, que foram macerados e armazenados a -20°C . Para a detecção de *T. cruzi* foi realizada extração de DNA utilizando kit *comercial* e quantificação em *NanoDrop*®, seguida de *nested-PCR* para amplificação de sequências de kDNA com uso dos iniciadores S17 e S18. Dos 153 mamíferos silvestres identificados na ordem Didelphimorphia e Rodentia, foram examinados exemplares de seis e treze espécies de cada ordem, respectivamente. Um *Didelphis aurita* apresentou amplificação de DNA compatível com *Trypanosoma* ssp, correspondendo a 0,65% das amostras examinadas. Para a análise dos *pools* obtidos foi utilizada a técnica de sequenciamento de nova geração a partir da Plataforma *Ion Torrent*, foram retiradas as suspensões de tecidos que compuseram *pools* de até 25 amostras, agrupadas considerando as espécies de mamíferos e o seu local de origem: Una, Ilhéus, Belmonte e Mascote, resultando num total de 15 *pools*. Os *pools* obtidos foram sequenciados na Plataforma *Ion Torrent*, sendo detectados *Plasmodium berghei* e *P. yeolli yeolli* em roedores (*Hylaeamys laticeps* e *Thaptomys nigrita*) e marsupiais (*Marmosa murina*) e *Besnoitia besnoiti* em marsupiais (*Marmosa demerarae*) e roedores (*Akodon cursor*). Nesse estudo, não houve associação entre a espécie de protozoário detectado e o município de origem da amostra, bem como a espécie. O presente estudo permitiu verificar a presença de protozoários em mamíferos silvestres no litoral Sul do Estado da Bahia, utilizando técnicas moleculares. Além disso, a revisão sistemática e meta-análise servirão como base para informar o atual contexto da infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil.

Palavras-chave: Mamíferos Silvestres; Protozoários; *Trypanosoma cruzi*; *nested-PCR*; Sequenciamento de DNA de última geração (NGS); Revisão Sistemática.

General abstract

DE ALMEIDA, P.H.A. **Molecular detection of protozoa in wild animals from Atlantic Forest.** 2020, 92p. Thesis (PhD in Animal Science in the Tropics) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia.

The Atlantic Forest is a biome that presents a great diversity of endemic species, as well as the one that has the highest index of endangered species, a fact that makes the biome a hotspot for the preservation of biodiversity. The environmental imbalance has a strong power in the diffusion and the appearance of parasitic diseases in wild mammals, and among the parasites found there are those caused by protozoa. Thus, the objective of this work was to evaluate the infection rates among different orders of mammals in Brazil, through systematic review and meta-analysis and to know the diversity of protozoa in small mammals from the south coast of Bahia in the State of Bahia. For the review, a search was carried out in the databases Pubmed, Medline, Lilacs, Science direct and Scielo, without language filter and with 2000-2020 time filter. To conduct this process, the StArt tool was adopted. Based on the selection criteria, all studies that reported *T. cruzi* infection in wild mammals in Brazil were chosen. For statistical analysis, descriptive statistics, and meta-analysis of the dichotomous event with binomial distribution were used, conducted in Microsoft Excel. To assess the heterogeneity between the studies, the calculation of the Q and I^2 statistics was used. After reading all the abstracts and based on the selection criteria, 35 studies contained important information on infection in wild mammals. Among the nine orders of wild mammals identified as a reservoir for *T. cruzi*, three of these orders had the highest combined frequency: Chiroptera (55.57%); Carnivorous (38.10%) and Primate (27.85%), due to molecular diagnosis. The detection of protozoa was performed using tissue samples from wild mammals of the orders Rodentia and Didelphimorphia, in an organ pool (heart, brain, lung, liver and spleen) of each animal, which were macerated and stored at -20°C . For the detection of *T. cruzi*, DNA extraction was performed using a commercial kit and quantification in NanoDrop®, followed by nested-PCR for amplification of kDNA sequences using primers S17 and S18. Of the 153 wild mammals identified in the order Didelphimorphia and Rodentia, specimens of six and thirteen species of each order, respectively, were examined. A *Didelphis aurita* showed amplification of DNA compatible with *Trypanosoma* ssp, corresponding to 0.65% of the samples examined. For the analysis of the pools obtained, the new generation sequencing technique was used from the Ion Torrent Platform, the suspensions of tissues that composed pools of up to 25 samples were removed, grouped considering the mammal species and their place of origin: Una, Ilhéus, Belmonte and Mascote, resulting in a total of 15 pools. The pools obtained were sequenced on the Ion Torren Platform, with *Plasmodium berghei* and *P. yeolli yeolli* being detected in rodents (*Hylaeamys laticeps* and *Thaptomys nigrita*) and marsupials (*Marmosa murina*) and *Besnoitia besnoiti* in marsupials (*Marmosa demerarae*) and rodents (*Akodon cursor*). In this study, there was no association between the detected protozoan species and the municipality of origin of the sample, as well as the species. The present study allowed to verify the presence of protozoa in wild mammals on the southern coast of the State of Bahia, using molecular techniques. In addition, the systematic review and meta-analysis will serve as a basis to inform the current context of *T. cruzi* infection in wild mammals in Brazil.

Keywords: Wild Mammals; Protozoa; *Trypanosoma cruzi*; nested-PCR; Next generation DNA sequencing (NGS); Systematic review and meta-analysis.

Introdução Geral

É de fundamental importância estudar a veiculação dos protozoários em ambientes silvestres, pois esses estudos podem facilitar a caracterização dos ciclos enzoóticos e as formas de transmissão de vários parasitos. Atualmente, os estudos que visam investigar a diversidade de parasitos em animais silvestres podem contribuir com informações como: introdução do parasito em determinada região, análises filogenéticas, condições de manutenção em ambiente silvestre e o potencial de transmissibilidade para outros hospedeiros, além do auxílio na elaboração de estratégias de controle, caso este apresente algum interesse médico (LOURENÇO, 2016) ou ecológico.

Diversos mamíferos silvestres têm sido encontrados naturalmente infectados por protozoários. Apesar de relatos relacionados às zoonoses associadas aos animais silvestres, ainda existem muitas questões epidemiológicas, taxonômicas e ecológicas não esclarecidas, pois o crescimento desordenado das grandes cidades proporciona o contato entre os humanos e animais domésticos e silvestres. Este fato é um dos motivos para o aumento de prevalência e incidências de zoonoses. Além disso, pouco se sabe a respeito do desenvolvimento desses parasitos em mamíferos silvestres e seus potenciais vetores.

A Bahia é um dos principais estados que possui polos de turismo nacional e internacional do Brasil. Sua extensa faixa litorânea e as diversas regiões de Unidades de Conservação são determinantes para esse fluxo turístico. Além da população local, muitos desses turistas são atraídos pelas regiões litorâneas e por áreas preservadas do estado como Costa do Dendê, Costa do Cacau e Costa do Descobrimento, resultando na aproximação do ser humano com áreas remanescentes da Mata Atlântica.

Os mamíferos silvestres têm uma alta capacidade de dispersão e adaptabilidade em ambientes domésticos, estudar a participação desses animais na manutenção dos ciclos de vida de protozoários é de grande interesse. O uso de técnicas moleculares pode orientar na elaboração de estratégias de vigilância em saúde e controle de zoonoses.

Objetivo Geral

Conhecer a diversidade de protozoários em mamíferos silvestres do Litoral Sul baiano.

Específicos

- Avaliar as taxas de infecção de *T. cruzi* em diferentes ordens de mamíferos silvestres no Brasil pela revisão sistemática e meta-análise dos dados recuperados;
- Determinar a ocorrência de *T. cruzi* em tecidos de mamíferos silvestres utilizando *nested-PCR*;
- Identificar pelo sequenciamento de segunda geração os protozoários presentes em amostras de tecidos de pequenos mamíferos;

Revisão de Literatura

O Gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família *Trypanosomatidae* que compreende flagelados pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, atualmente classe *Kinetoplastea*. Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides e os diplonemídeos foram o filo *Euglenozoa* (SIMPSON et al., 2006). A classe *Kinetoplastea* que tradicionalmente compreende as subordens *Trypanosomatina* e *Bodonina*, se caracteriza pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria constituída por moléculas de DNA circulares (SIMPSON et al., 2006; STEVENS, 2008).

A família *Trypanosomatidae* apresenta uma grande variedade de hospedeiros desde plantas a animais vertebrados e invertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição nos diferentes continentes. Essa família compreende parasitos monoxênicos, que apresentam apenas um hospedeiro vertebrado, ou heteroxênico, quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros sendo um invertebrado e um vertebrado (SIMPSON et al., 2006; STEVENS, 2008).

Existem cerca de 150 espécies de *Trypanosoma* que foram descritas parasitando classes de vertebrados. Os tripanosomas são parasitos generalistas de sangue de vertebrados, geralmente são transmitidos por vetores (artrópodes e sanguessugas). A maioria das espécies circula apenas no ambiente silvestre e não é patogênica para seus hospedeiros.

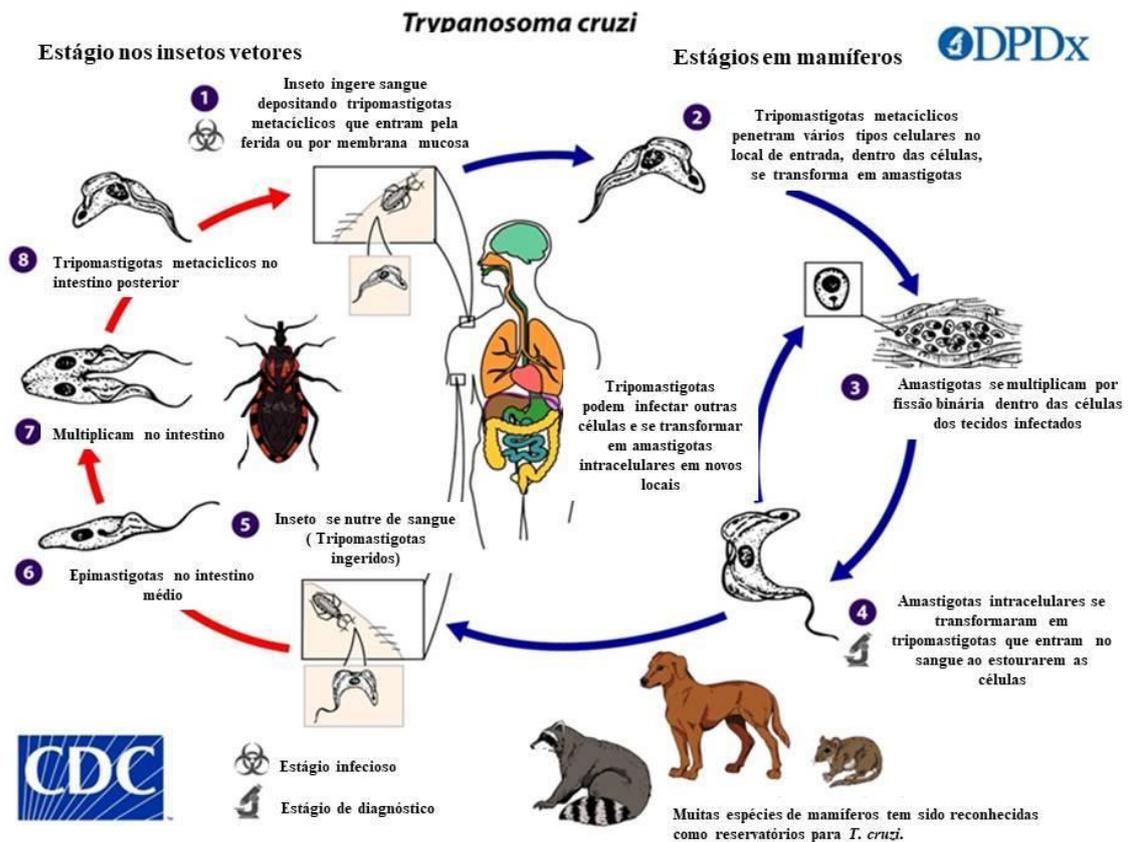
T. rangeli e *T. cruzi* são os únicos tripanosomas encontrados no homem nas Américas (STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006). *T. cruzi* infecta aproximadamente 7,6 milhões de pessoas na América Latina ocasionando sérios problemas digestivos e cardíacos (SHMUNIS, 2007). *T. rangeli* não é considerado patogênico para os seus hospedeiros vertebrados e não existem dados sobre a prevalência de infecções causadas por essa espécie (D' ALESSANDRO e GORE-SARAIVA, 1992, 1999; VALLEJO et al., 2003). Estas duas espécies possuem ampla distribuição nas Américas Central e Sul, com sobreposição não só de áreas geográficas como também dos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

***Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas**

A doença de Chagas (DC) é causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, protozoário de ampla distribuição no continente americano (COURA e VIÑAS, 2010) acometendo cerca de seis a sete milhões de pessoas (WHO, 2015). A transmissão desse parasito ocorre principalmente por triatomíneos hematófagos da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (LENT e WYGODZINSKY, 1979). Hoje estima-se que haja cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* no Brasil (MARTINS-MELO et al., 2014).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e envolve quatro estágios de vida. Os tripomastigotas que circulam no sangue de vertebrados infectados são ingeridos por vetores (barbeiros). No intestino do inseto, os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas. No intestino posterior do barbeiro, os epimastigotas se diferenciam para a forma tripomastigota metacíclica, que será eliminada com as fezes e urina durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado pela lesão da picada ou mucosas. Após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, ocorre a infecção de células próximas ao local da picada. Dentro da célula, os tripomastigotas assumem uma forma ovóide e sem flagelo, chamada amastigota, de multiplicação rápida. O grande número de parasitos provoca o rompimento celular e os tripanossomatídeos entram na corrente sanguínea e no sistema linfático. Nesse momento, eles reassumem a forma flagelada, sendo chamados de tripomastigotas sanguíneos, forma frequente nos vertebrados renovando assim o ciclo de transmissão (BRASIL, 2008).

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Modificado de USA (2019). Centers for Disease Control. DPDx.

A transmissão de *T. cruzi* se dá pelas seguintes formas: (1) contato com as fezes de um inseto vetor ou sangue contendo parasitos viáveis (transmissão natural); (2) transfusões sanguíneas, transmissão congênita, transplante de órgãos, auto-inoculação em atividades laboratoriais; (3) via oral (amamentação, alimentos contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados; ou ingestão de triatomíneos infectados e canibalismo entre diferentes espécies animais) (NAVIN et al., 1985).

Existem três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*. O primeiro é o ciclo doméstico que possui maior importância epidemiológica, pois os seres humanos constituem os principais reservatórios do parasito, além dos gatos e cães. No ciclo silvestre, intervêm os triatomíneos que podem transmitir o parasito a roedores, marsupiais e outros animais silvestres. O terceiro ciclo é o peridoméstico, que envolve mamíferos (roedores domésticos, marsupiais, gatos e cães) que têm livre acesso às residências; além de triatomíneos silvestres, que são atraídos às casas, pela luz e alimento. Este ciclo atua como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre (WHO, 1991).

T. cruzi não é uma espécie homogênea (DEVERA et al., 2003). Quando não havia técnicas moleculares disponíveis, Coura et al. (1966) utilizou o termo “Complexo Cruzi” para designar o protozoário, baseado na variação morfológica, imunológicas, distinta virulência e diferenças nos padrões individual e regional da doença de Chagas. Hoje, com a utilização de marcadores moleculares em estudos de filogenia, as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis unidades discretas de tipificação (DTUs), denominadas TcI a TcV, (ZINGALES et al., 2009), além da TcBat (JANSSEN et al., 2015). As linhagens pertencentes às DTUs TcII, TcVI estão relacionados principalmente com o ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão, enquanto as linhagens pertencentes às DTUs TcI, TcIII e TcIV predominam no ciclo silvestre (LIMA, 2011).

De acordo com Jansen et al., 2005, a infecção por *T. cruzi* é em decorrência de uma cadeia de fatores múltiplos e complexos. Segundo esse mesmo autor, a transmissão do *T. cruzi* em ambientes silvestres está associada em uma teia ecológica complexa de espécies diferentes, onde uma rápida mudança em um dos pontos resulta na emergência do parasito e a formação de um novo cenário enzoótico. *T. cruzi* possui uma habilidade de explorar diferentes tipos de recursos e sua manutenção em diversos reservatórios. Assim, pode ser considerado como um parasito generalista de espécies, sendo que cada espécie hospedeira atua como um filtro biológico diferente, possivelmente selecionando clones diversos do parasito (JANSSEN et al., 2015).

Um reservatório pode ser considerado como um sistema ecológica complexo formado por uma ou mais espécies responsáveis pela manutenção de determinada espécie de parasito na natureza (ASHFORD, 1996). Vários mamíferos atuam como reservatórios para *T. cruzi* (JANSSEN et al., 2015). São exemplos: Didelphimorphia, ordem que contém espécies competentes na manutenção desse parasito, assim como Artiodactyla, Cingulata, Carnivora, Primates, Lagomorpha, Rodentia e Chiroptera.

A doença de Chagas está distribuída de acordo com a distribuição dos vetores triatomíneos associados a essa doença (VILLELA et al., 2009, GURGEL-GONÇALVES et al. 2012). Vários triatomíneos vivem no ambiente silvestres (CARVALHO et al., 1998), contudo algumas espécies são altamente adaptáveis ao ambiente domiciliar (SILVEIRA e DIAS, 2011). Na Bahia já foram registrados as seguintes espécies: *Parabelminus yurupucu*, *Cavernicola pilosa*, *Psammolestes tertius*, *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. domesticus*, *Panstrongylus megistus*, *P. lenti*, *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. diasi*, *Triatoma rubrofasciata*, *T.*

tibiamaculata, *T. sherlocki*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. melanica*, *T. juazeirensis*, *T. infestans*, *T. petrocchiaie*, *T. pseudomaculata*, *T. costalimai*, *T. lenti*, *T. bahiensis*, *T. vitticeps*, *T. melanocephala* (SOUZA et al., 2020). A proximidade de habitats e sítio específico de animais silvestres com triatomíneos podem acarretar a possibilidade de infecção para esses animais.

Para a doença de Chagas ainda não há vacina e sua prevalência está diretamente relacionada às condições habitacionais (casas de pau-a-pique, sapê etc.). Cuidados com a conservação das casas, aplicação sistemática de inseticidas e utilização de telas em portas e janelas são algumas das medidas preventivas que devem ser adotadas, principalmente em ambientes rurais. A melhor forma de prevenção é o combate ao inseto transmissor (LOURENÇO et al., 2016).

Reservatórios do *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um parasito de muitos hospedeiros capaz de infectar dezenas de espécies de mamíferos silvestres e domésticos pertencentes a sete diferentes ordens. Esse flagelado encontra-se distribuído em todas as regiões fitogeográficas do Brasil, sendo encontrado nos mais diversos nichos ecológicos contribuindo, em cada tipo de ecótopo, para formar modalidades distintas de focos naturais de transmissão. Como parasito de animais silvestres, podemos encontrar diferentes espécies de mamíferos sustentando distintos ciclos de transmissão os quais podem estar isolados ou conectados. Este caráter é particular e único para cada localidade (ROQUE e JANSEN, 2014).

Dessa forma alguns mamíferos capazes de manter o parasito na natureza, os vetores a estes associados e alguns estudos mais relevantes em cada uma das três ordens de mamíferos responsáveis pela manutenção e interação do *T. cruzi* em ciclos domésticos, peridomésticos e silvestres da doença de Chagas (ROQUE e JANSEN, 2014). As ordens com maior frequência de infecção são Didelphimorphia, Chiroptera e Rodentia (MARCILI et al., 2009; COURA e JUNQUEIRA, 2012).

Ordem Didelphimorphia

Os marsupiais apresentam a maior diversidade de espécies no continente Australiano, enquanto apenas uma família é reconhecida nas Américas. O gênero *Didelphis* é encontrado

desde o sudeste do Canadá ao Sul da Argentina, sendo o mamífero mais importante como reservatório do *T. cruzi* (BRASIL, 2009). São considerados os principais reservatórios silvestres de *T. cruzi* e *T. rangeli* podendo constituir uma ligação entre os ciclos de transmissão silvestre e doméstica (RAMIREZ, 2012).

A presença em áreas urbanas é um forte indicador de degradação ambiental por influência humana (OLIFIERS et al., 2005). *Didelphis* spp. está associado principalmente ao ambiente arbóreo, mas estes se deslocam por todos os estratos vegetais e podem servir de infecção a triatomíneos terrestres. Também podem adquirir a infecção ao preda um *Panstrongylus geniculatus* no solo e servir de fonte de infecção a *Rhodnius robustos* na copa das palmeiras. Nesses mamíferos são encontrados dois tipos de genótipos do *T. cruzi* o TcI e TcII. Além da via vetorial, seu hábito onívoro favorece que esse mamífero possa adquirir a infecção também por via oral, pela ingestão de triatomíneos ou predação de pequenos mamíferos infectados (ROQUE e JASEN, 2014).

Em um estudo realizado com gambás (*Didelphis albiventris*) no sudeste do Brasil, 12 (57,1%) dos 21 examinados foram positivos para *T. cruzi*. As infecções isoladas com *T. rangeli* e *T. cruzi* foram diagnosticadas, respectivamente, em 58,8 e 8,3% dos gambás. A infecção mista representou 33,3% (RAMIREZ, 2012).

Ordem Chiroptera

Atualmente, a ordem Chiroptera contém pelo menos 1120 espécies descritas e é a segunda maior ordem de mamíferos (SIMMONS, 2005), atrás apenas dos roedores, constituindo um quarto de toda a fauna de mamíferos existente. No Brasil são reconhecidas nove famílias, com 64 gêneros e 167 espécies de morcegos (PAGLIA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014). Essa ordem é cosmopolita, sendo que a maioria das espécies de morcegos encontra-se em regiões tropicais. Esses animais são longevos, vivem em colônias como uma ou mais espécies e de poucos a milhares de indivíduos, sendo raramente solitários (NOWAK, 1991).

Diversos agentes infecciosos estão associados com morcegos (CALISHER et al., 2006), por serem altamente móveis, possuírem ampla distribuição geográfica e comportamento social o que facilita a transmissão de zoonoses na natureza (THOISY et al., 2016). Existem algumas doenças associadas ao morcego como a raiva (THOISY et al., 2016),

as síndromes respiratórias severas (SARS) (MENACHERY et al., 2015; BANERJEE et al., 2019), a hantavirose (OLIVEIRA et al., 2014), o ebola (LEROY et al., 2005), e as tripanossomíases (HAMILTON et al., 2012; ROQUE e JANSEN, 2014).

Dentre os tripanosomatídeos destaca-se o *Trypanosoma cruzi* comumente encontrados infectando morcegos. Esses animais vivem em ocos de árvores, folhas de bananeiras e forros de habitações humanas e construções rurais. Dessa forma, esses mamíferos podem ser importantes reservatórios do parasito, visto que em determinadas áreas são abundantes, adaptam-se bem ao domicílio humano e podem apresentar elevadas prevalências de infecção (ROQUE e JASEN, 2014).

Existem várias vias de infecção, mas a transmissão oral apresenta um papel importante. Morcegos dos gêneros *Carollia*, *Artibeus* e *Molossus* adquiriram a infecção ao se alimentarem de *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados (THOMAS et al. 2007). Já *Phyllostomus hastatus*, espécie com hábitos alimentares generalistas, adquiriu a infecção ao preda um camundongo infectado (THOMAS et al. 2007). Nesse sentido, vale mencionar que mesmo morcegos predominantemente frugívoros como *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp. frequentemente alimentam-se de insetos e podem infectar-se por essa via (GARDNER, 1977).

De acordo com Thomas et al. (2007), os triatomíneos que compartilham o mesmo habitat que morcegos estão os insetos do gênero *Cavernicola* (*C. lenti* e *C. pilosa*), muito frequentes em cavernas, e dos gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius* encontrados em ocos de árvores. *Rhodnius prolixus* mantidos confinados com *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus* foram capazes de realizar repastos sanguíneos completos, o que sugere que essa via também possa ser efetiva para a transmissão do parasito.

Em um estudo realizado em vários biomas no Brasil foram identificados *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii* em 12, 9% dos 1043 morcegos de 63 espécies analisadas (CAVAZZANA, et al., 2010). Ademais, as linhagens TcI- TcI-TcIV e TcBat foram descritos em morcegos de diferentes regiões do Brasil, com vários registros de infecções mistas (LIMA et al., 2015, JANSEN et al., 2015).

Ordem Rodentia

Os roedores formam a maior biomassa de mamíferos em qualquer ecótopo silvestre. Seus mais diversos microhabitats são muitas vezes divididos com triatomíneos, como o *Triatoma* spp. Um aspecto importante é que, dentre os mamíferos, roedores são os principais alvos de predação, o que possibilita a transmissão oral de *T. cruzi*. Sua importância epidemiológica fica evidente se considerarmos que muitas espécies, embora silvestres, frequentemente se aproximam e podem colonizar o ambiente peridomiciliar (ROQUE e JASEN, 2014).

Os roedores cuja participação nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* mais empiricamente comprovados são os caviomorfos do gênero *Thrichomys*. Esse gênero compreende ao menos cinco espécies crípticas distribuídas no Pantanal, Cerrado e Caatinga brasileiros (BONVICINO et al. 2002). De acordo com Roque e Jasen (2014), os estudos envolvendo *T. cruzi* e caviomorfos mostraram a relação parasito-hospedeiro não necessariamente evolui para uma interação harmônica, mas pode evoluir para uma que favoreça a transmissibilidade do parasito, independente das lesões que venha a causar no hospedeiro. Assim, os roedores do gênero *Thrichomys* apresentam um dano cardíaco importante, o que certamente se reflete na sua capacidade de oxigenação dos tecidos. Isso significa que um roedor infectado teria diminuída sua habilidade de fugir dos predadores, predispondo-o a transmitir o parasito a outro mamífero que venha a predá-lo.

Apesar de abundantes em muitos trabalhos, o diagnóstico da infecção em *Mus musculus* é pouco reportado. Outras espécies já encontradas naturalmente infectadas são: *Agouti paca*, *Bolomys lasiurus*, *Calomys expulsus*, *C. callosus*, *Clyomys laticeps*, *Dasyprocta* sp., *Echymis chrysurus*, *E. dasytrix*, *Galea spixii*, *Holochilus brasiliensis*, *Kerodon rupestris*, *Nectomys squamipes*, *Octodon degus*, *Oecomys mamorae*, *Oligoryzomys stramineus*, *Oryzomys capito*, *O. scotti*, *Rhipidomys macrurus*, *Sigmodon hispidus* e *Tylomys mirae*, bem como roedores dos gêneros *Akodon* sp., *Cavia* sp., *Octodontomys* sp. e *Proechimys* spp (ROQUE E JASEN, 2014).

Muitos animais silvestres e domésticos são naturalmente infectados com *T. cruzi*, roedores são um dos grupos que foram consistentemente infectados em diferentes países. De acordo com Gurgel-Gonçalves et al. (2004), nas Américas foram encontradas mais de 50 espécies de roedores infectados pelo *T. cruzi*, sendo 22 no Brasil.

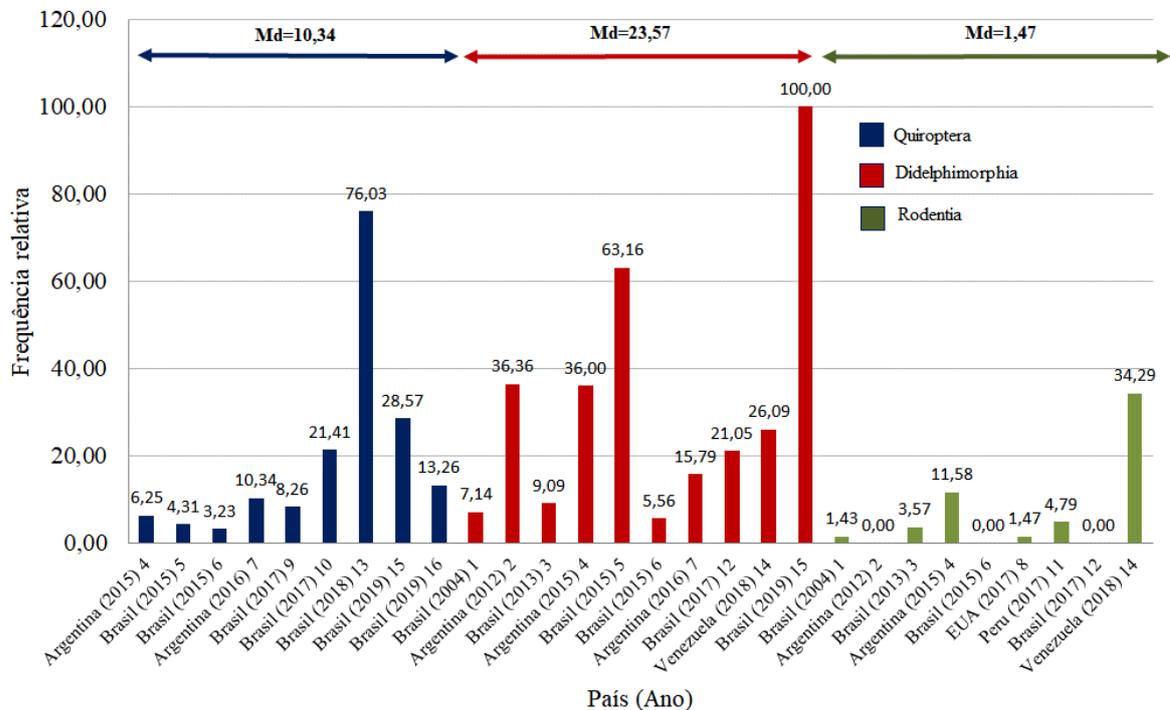
Estudo realizado por Aleman et al. (2017), no Texas, Estados Unidos, com roedores utilizando a técnica PCR em tempo real, dos 131 roedores coletados em áreas degradada pela ação humana, cinco (3,8%) foram positivos para *T. cruzi*, já em relação aos 40 roedores da área silvestre, três (7,5%) foram positivos para *T. cruzi*. Esse estudo demonstrou uma baixa prevalência de infecção desse parasito em roedores.

Infecção pelo *T. cruzi* em Rodentia, Chiroptera e Didelphimorfia

A prevalência e distribuição geográfica de *T. cruzi* em mamíferos silvestres, deve ocorrer em todas as áreas consideradas endêmicas para doença de Chagas, no entanto, as informações publicadas, principalmente em periódicos de larga escala ainda são restritas. A revisão de 18 artigos publicados em revistas internacionais e nacionais que pesquisaram a presença de *T. cruzi* em animais silvestres através da técnica de PCR permite gerar as seguintes conclusões: a mediana de infecção para a ordem Didelphimorphia é 23,57, sendo mais frequentemente encontrados em artigos, seguida pela ordem Chiroptera (Md=10,37). A figura 2 resume os dados de frequência relativa de infecção de *T. cruzi* em três ordens de mamíferos silvestres nestes 18 artigos realizados nas Américas.

Para a ordem Rodentia são encontrados um menor número de referência na literatura nacional e estrangeira. De acordo com Roque e Jasen (2014), a infecção de roedores silvestres por *T. cruzi* é pouco relatada na literatura, o que reflete as limitações na coleta dos animais normalmente restritas às áreas domiciliadas. A maioria das descrições de infecções por *T. cruzi* em roedores ocorrem *Rattus rattus*, espécie sinantrópica abundante na maioria das cidades brasileiras e normalmente associada a *Triatoma rubrofasciata*.

Figura 2. Frequência relativa e intervalo de confiança 95% da presença de *T. cruzi* em mamíferos silvestres das ordens: Chiroptera (azul), Didelphimorfia (vermelho) e Rodentia (verde), segundo o país, ano e citação do artigo publicado.



Observação: A numeração após o ano, no eixo País (Ano) refere-se à identificação do trabalho de origem da referência. Md=mediana.

Fonte: Próprio autor baseado nos artigos de (1) Alvarado-Otegui et al (2012); (2)- Arigibay et al (2016); (3) Cominetti (2011); (4)- Orozoco et al (2015); (5)- Aleman et al (2017); (6) Bento et al (2017); (7)-Da Costa et al (2015); (8) Dario et al (2017); (9) Do Santos et al (2017); (10) Dronzino et al (2019); (11) Galaviz-Silva (2017); (12) Gurgel-Gonçalves et al (2014); (13) Lourenço et al (2018); (14) Orozoco et al (2015); (15) Rangel et al (2015); (16) Tenório et al 2013; (17) Trueb et al (2017); (18) Viettri et al (2018).

Nantes et al. (2019), estudando gambás em fragmentos florestais urbanos localizados no Mato Grosso do Sul, encontraram 32,5% dos 40 gambás infectados por *T. cruzi*, pelo diagnóstico molecular.

Em trabalho realizado com morcegos no Distrito Federal usando a técnica qPCR kDNA foram identificados *T. cruzi* e *T. rangeli* nos morcegos (*Carollia perspicillata*). De acordo com os autores morcegos não devem ser excluídos como potenciais reservatórios para tripanosomatídeos de interesse médico, assim como na participação do ciclo enzoótico desses parasitos (LOURENÇO et al., 2018).

Morcegos das espécies *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Sturnira lilium* e *Artibeus lituratus* capturados em duas áreas de degradação da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, foram encontrados infectados com *Trypanosoma* sp. Dessa forma, os

morcegos da Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro abrigam uma grande diversidade de tripanossomatídeos, mantendo a diversidade dos tripanosomas neste ambiente silvestre (RANGEL et al., 2019). No Paraná no sul do Brasil, a espécie *Artibeus lituratus* foi encontrada infectada por *Trypanosoma* sp. com a taxa de prevalência de 40% (DRONZINO et al., 2019).

Um trabalho realizado no Coquimbo, na região norte do Chile, com roedores das espécies *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Phyllotis darwini* e *Octodon degus* utilizando a PCR em tempo real, dos 71 roedores capturados, 59 (83,1%) foram positivos para *T. cruzi*. Essa elevada prevalência mostra a importância de roedores como hospedeiros de *T. cruzi* (YEFI-QUINTEROS et al., 2018).

Métodos de diagnóstico molecular

A PCR (cPCR) é caracterizada por ser qualitativa, ou seja, mostra a amplificação de uma banda específica de DNA/cDNA, quando a amostra é positiva, de acordo com os iniciadores escolhidos para determinado patógeno. Essa técnica necessita de métodos para a visualização do alvo amplificado, como a eletroforese. A eletroforese consiste na separação de moléculas ionizadas em função de sua carga elétrica e de seu peso molecular. Ela pode ser realizada em diferentes meios de suporte, como gel de poliacrilamida ou de agarose. A escolha do gel a ser utilizado depende dos objetivos e do tamanho dos fragmentos dos ácidos nucléicos que se deseja separar (SAMBROOK E RUSSEL, 2001).

A *nested*-PCR é umas das variantes da PCR, esta tende a aumentar a especificidade e a sensibilidade da PCR, realizando duas amplificações. Nesta técnica as duas amplificações são realizadas com temperaturas de anelamento diferentes. A primeira com iniciadores mais externos, permitindo a amplificação de uma sequência maior de DNA alvo. Em seguida, o produto da PCR é reamplificado com iniciadores mais internos. Essas duas amplificações permitem a diminuição relativa de produtos inespecíficos que podem ocorrer na primeira amplificação, sendo assim uma técnica mais específica (MARCON et al., 2002). A *nested* PCR têm sido empregada para melhorar a detecção do DNA do *T. cruzi*, em amostras de humanos (DUARTE et al., 2014) e animais (SANTANA, 2015).

Entre os marcadores moleculares utilizados no diagnóstico dos tripanossomatídeos, o DNA dos cinetoplastos estão entre os mais estudados. Constituem-se de genes mitocondriais,

organizados nas moléculas de DNA circular denominadas de maxicírculos, que fazem parte da rede enovelada de DNA que constituem o kDNA (DNA do cinetoplasto). Esses genes são excelentes marcadores para identificação de parasitos e estudos populacionais devido à ausência de recombinações (LOURENÇO, 2016). Sequências de kDNA tem sido muito usadas para o diagnóstico molecular de *T. cruzi* e *T. rangeli* em diferentes amostras biológicas (VALLEJO et al., 2012; RAMÍREZ et al., 2015).

Diversos trabalhos utilizam o kDNA para a detecção de *Trypanosoma cruzi* em diversas espécies (LOURENÇO et al., 2018; DRONZINO et al., 2019; RAMIREZ et al., 2015; TRUEB et al., 2018). Na literatura, os marcadores mais utilizados para amplificação do kDNA de *T. cruzi* são denominados como 121/122 e S35/S36 com regiões alvos diferentes.

Plataforma de sequenciamento de DNA de nova geração (NGS)

As tecnologias de sequenciamento de nova geração estão evoluindo rapidamente. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma *454 FLX* da *Roche* e a *Solexa* da *Illumina* (CARVALHO e DA SILVA, 2010).

Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da *Applied Biosystems*, denominada *SOLiD System*, e o *HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing* (tSMS), da *Helicos*. Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento (CARVALHO e DA SILVA, 2010).

Esses sistemas de sequenciamento incluem vários métodos agrupados amplamente como: a separação da fita molde, o sequenciamento, a geração de imagem e as análises de dados. Os protocolos específicos distinguem uma tecnologia de outra e determina o tipo de dados produzidos a partir de cada plataforma. Estas diferenças estão associadas com a qualidade desses dados e com o custo de cada técnica. O NGS produz um grande número de leituras de baixo custo e torna as plataformas úteis para várias aplicações. Isso inclui descoberta de variantes de interesse específicos ou todo o genoma de organismos ou

microrganismos. Além disso, é possível verificar as interações com o meio ambiente e os organismos, além das relações evolutivas (METZKER, 2010).

Entre os marcadores moleculares utilizados no NGS o DNA mitocondrial (mtDNA) está entre os mais estudados. O mtDNA é pequeno e extracromossômico, com cerca de 16,5kb, não sofre recombinação. Diferentemente do DNA nuclear o mtDNA tem uma maior probabilidade de permanecer intacto, perante os processos de degradação, isso porque, o mtDNA possui um número de cópias por célula muito maior que o DNA nuclear. Entretanto, as centenas cópias do mtDNA por célula, juntamente com sua elevada taxa de mutação cria um potencial para heteroplasmia (BAR et al., 2000; LEMBRING, 2013). . O mtDNA por estar ligado a herança materna podem ser usados para resolver as relações que medem períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera questões de filogenia e importância taxonômica.

O desenvolvimento do sequenciamento de última geração (NGS) melhorou bastante o diagnóstico de diversas doenças. A análise sistemática de toda a sequência de mtDNA melhora a sensibilidade de detecção. Entretanto, o sequenciamento do mtDNA pelo NGS requer ferramentas de bioinformáticas e adaptação daquelas desenvolvidas para o DNA nuclear, para a detecção e quantificação de variantes do mtDNA, ou seja, gerenciar os recursos específicos do genoma -mitocondrial, incluindo a heteroplasmia (BRIS et al., 2018).

Essas aplicações trouxeram diversos benefícios em diversas áreas dentre elas, a parasitologia, que em comparação com a microscopia tradicional, o método de detecção molecular permite maior sensibilidade e especificidade, principalmente ao que se refere a diagnóstico de infecção parasitária, em especial quando ocorrem baixos níveis de infecção parasitária, isso porque o NGS é capaz de fornecer partir de dados transcriptômicos, proteômicos e genômicos desses parasitos uma melhor compreensão do seu desenvolvimento, sobrevivência e as interações com seu hospedeiro, permitindo assim uma boa alternativa para novas abordagens quanto aos tratamentos, diagnósticos e controle dos mesmos.

Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é conhecida como uma das regiões com maior riqueza e endemismo de espécies, assim como uma das mais ameaçadas do planeta, um *hotspot* de

biodiversidade (MITTERMEIER et al., 2004; MYERS et al., 2000). No entanto, uma grande parte desse bioma foi devastada.

O histórico de destruição da Mata Atlântica começou com processo de uso da terra, na agricultura, pecuária e exploração de madeira, somado ao crescente aumento populacional (BRASIL, 2004; TABARELLI et al., 2005; LOPES et al., 2011). Assim, já em 1998 a floresta apresentava menos de 9% de sua cobertura original (LOPES et al., 2011). No entanto, a Mata Atlântica ainda abriga mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (TABARELLI et al., 2005). A conservação dos escassos remanescentes depende do engajamento de diferentes setores da sociedade, além de políticas públicas eficazes (CUNHA; GUEDES, 2013; REZENDE et al., 2018).

A biodiversidade é ameaçada pela fragmentação de hábitat (BRASIL, 2004; LOPES et al., 2011). Essa fragmentação cria pequenas populações, cada uma das quais é altamente vulnerável à extinção, já que diferentes espécies requerem uma área mínima de habitat para atender suas necessidades energéticas e sociais (DOBSON et al., 2006).

O Litoral Sul é um dos 27 Territórios de Identidade da Bahia. É o maior território em número de municípios, 26 no total, dentre eles Ilhéus, Una e Mascote, com extensão de 14.664,7 km² cercada de beleza natural ímpar e de um passado de formação socioespacial ligado intrinsecamente à expansão da economia cacaueteira (SANTOS, 2019).

Referências Bibliográficas

- ALEMAN, A; GUERRA, T.; MAIKIS, T. J; MILHOLLAND, M. T.; CASTRO-ARELLANO, I.; FORSTNER, M. R.; HAHN, D. The Prevalence of *Trypanosoma cruzi*, the Causal Agent of Chagas Disease, in Texas Rodent Populations. **Ecology Health**, v. 14, n. 1, p. 130-143, 2017.
- ALVARADO-OTEGUI, J. A.; CEBALLOS, L. A.; OROZCO, M.M.; ENRIQUEZ, G.F.; CARDINAL, M.V.; CURA, C.; SCHIJMAN, A.G.; KITRON V.; GURTLER, R. E. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in rural área in the humid chaco of Argentina, **Acta Tropica**, v. 1, n. 24, p.79-86, 2012.
- ARGIBAY, H.D.; OROZCO, M.M.; VICTORIA CARDINAL, M.; RINAS, M.A.; ARNAIZ, M.; SEGURA, M.S.; GURTLER, R.E. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. **Parasitology**, v.143, n. 5, p. 1358-1368, 2016.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinical Dermatology**, v.14, p. 523-532, 1996.

BANERJEE, A.; KULCSAR, K; MISRA, V.; FRIEMAN, M. ; MOSSMAN K. Bats and Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n.41, 2019.

BÄR, W.; BRINKMANN, B.; BUDOWLE, B.; CARRACEDO, A.; GILL, P; HOLLAND M. *et al.* DNA.Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. **International Journal Legal Medicine**, v. 113, p. 193–196,2000.

BENTO, E.C.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; BATISTA, L.R.; ANVERSA, L.; PEDROSA, A.L.; LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, J.E. Identification of bat trypanosomes from Minas Gerais state, Brazil, based on 18s rDNA and cathepsin targets. **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p.737-746, 2017.

BONVICINO, C.R. OTAZU, I.B.; D' ANDREA, P.S. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). **Cylogenetic Genome Research**, v.97, n.14, p.200-204, 2002.

BRIS, C.; GOUDENEGE, D.; DESQUIRET, V.; CHARIF, M.; COLIN, E.; BONNEAU, D.; AMATI-BONNEAU, P.; LENAERS, G.; PROCACCIO, V. Bioinformatics tools and Databases to asses the pathogenicity of mithochondrial DNA variants in the field of Next Generation Sequencing, **Frontiers in Genetics**, v.9, p.1-11, 2018.

CALISHER, C.H.; CHILDS, J.E.; FIELD, H. E, HOLMES, K.V.; SCHOUNTZ, T. Bats: importante reservoir hosts of emerging viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n. 3, p.531-545, 2006.

CARVALHO, M. S.; SOUZA-SANTOS, R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas Analysis of spatial data in public health: methods, problems, and perspectives. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 361-378, 2005.

CARVALHO, M.C.C.G.; DA SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p. 735-744, 2010.

CAVAZZANA, M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; DA SILVA, F. M.; JUNQUEIRA, Â. C.; VELUDO, H. H.; VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L. B.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitoch2006ondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 3, p. 345-355, 2010.

COMINETTI, M.C.; ANDREOTTI, R., OSHIRO, E. T., DORVAL, M. E.M.C. Epidemiology factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* a Quilombola community, State, of Mato Grosso do Sul, Brazil, **Parasitology**, v.6, n.56, p. 1-12, 2011.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 145-154, 2012.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a New Worldwide Challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: **Biology of Kinetoplastida (Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A., eds.)**, pp. 327-403. Vol.1. Academic Press, London, New York and San Francisco, 1976.

DA COSTA, A.P.; COSTA, F.B.; SOARES, H.S.; RAMIREZ, D.G.; MESQUITA, E.T.K.C.; GENNARI, S.M. MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* chagasi Infection in Wild mammals from Maranhão, State, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n,11, p. 656-66,2015.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. **Trends in Parasitology**. v. 28, p. 437–445, 2012.

DARIO, M. A.; LISBOA, C.V.; COSTA, L.M.; MORATELLI R. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espirito Santo state, Brazil. **PLoS One**, v.12, n.11, p. 1-11, 2017

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife – Threats to Biodiversity and Human Health. **Science's Compass**. v. 287, p.443-449,2000.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

DROZINO, R.N.; OTOMURA, F. H.; GAZARINI, J.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O. *Trypanosoma* Found in Synanthropic Mammals from Urban Forests of Parana Southern Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v.20, n.20,2019.

DUARTE, L.F; FLÓREZ, O; RINCÓN, G; GONZÁLVEZ, C.I. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. **Colombia médica**, v. 45, n. 2, 2014.

GALAVIZ-SILVA, L.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.; ZÁRATE-RAMOS, J.J. MOLINA-GARZA, Z.J. Prevalence infections in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. **Revista Argentina de Microbiología**, v.49, n.3, p.2016-223,2017.

GORTAZAR, C.; DIEZ-DELGADO, I.; BARASONA, J.A.; VICENTE, J.; DE LA FUENTE, J.; BOADELLA, M. The wide side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: a review. **Frontiers Veterinary Science**, v. 1, n. 27, p. 1-12 ,2015.

GURGEL-GONÇALVES R.; GALVÃO C.; COSTA J.; PETERSON A.T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Jornal Tropical Medicine**, v. 2012, p.1-15. 2012.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, R.E.D.; DUARTE, M.A.; PALMA, A.R.T.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J.C. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal Distric of Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p.323-330, 2004.

HALMITON, P.B.; CRUICKSHANK, C.; STEVENS, J.R.; TEXEIRA, M.M.; MATTHEWS, F. Parasites reveal movement of bats between the new and old worlds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, p. 521-526, 2012.

HAMILTON, P.B.; TEXEIRA, M.M.G.; STEVENS, J.R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 28, p.136-141,2012.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Tropica**, v. 151p. 1-15, 2015..

LEMBRING M. **Application of Mitochondrial DNA Analysis in Contemporary and Historical Samples**. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine ,2013; 950. 62 pp.

LENT H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163 ,p. 123-520, 1979.

LEROY, E.M; KUMULUNGUI, B., POURRUT, X.; ROUQUET, P.; HASSANIN, A.; YABA, P.; DÉLICAT, A.; PAWESKA, J.T.; GONZALEZ, J.P.; SWANEPOEL R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. **Nature**; v.438, n.7068, p. 575-6,2005

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ P.A.; TREJO-VARÓN J.A.; CARRANZA J.C.; PINTO C.M.; SERRANO M.G.; BUCK G.A.; CAMARGO E.P.; TEIXEIRA M.M.. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, p. 166-17, 2005.

LIMA, L. Morphological, biological and genetic diversity, and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from Brazil and Mozambique (Africa). **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LISBOA C.V.; PINHO A.P.; HERRERA H.M.; GERHARDT M.; CUPOLILLO E.; JANSEN A.M. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 156, n. 3, p. 314-318, 2008.

LOURENÇO, J.L.M. Ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Distrito Federal, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Zoologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

LOPES, N. S.; MOREAU, M. S.; MORAES, M. E. B. Análise da paisagem com base na fragmentação-caso APA Pratigi, Baixo Sul da Bahia, Brasil. **Revista Eletrônica do Prodepa**, v. 6, n. 1, p. 53-67, 2011.

MAIA DA SILVA F.; MARCILI A.; LIMA L.; CAVAZZANA M. J.R.; ORTIZ P.A.; CAMPANER, M.; TAKEDA G.F.; PAIVA F, NUNES V.L.; CAMARGO E.P.; TEIXEIRA M. M. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Tropica**, v. 109, n. 3, p. 199-207,2009.

- MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenética e padrões ecogeográficos de isolados silvestres. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- MARCON, G.E.B. Detecção do DNA do *Trypanosoma cruzi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes chagásicos crônicos. **Tese (mestrado em Ciências Médicas)**- Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MARQUES, A. L. P. Uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de Chagas: uma abordagem teórico-experimental com foco em qPCR. 2016. 137 f., il. **Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)**—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ N.E; VILLARROEL, R.; VILLARROEL, S.; SÁNCHEZ, Z.; BISIO, M.; PARRADO R.; GALVÃO L.M.C.; CÂMARA A.C.J. ; ESPINOZA B.; ALARCÓN DE NOYA B.; SOSA-ESTANI S; GUHL F, R. I, AZNAR C; BRITTO, C.; YADÓN, Z.E; SCHIJMAN, A. G. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas Disease patients. **Journal of Molecular Diagnosis**, v. 17, n.5 p. 605-1,2014.
- MENACHERY V.D; YOUNT, B. L; DEBBINK, K; AGNIHOTHARAM, S.;GRALINSKI, L.E; PLANTE J.A; GRAHAM R.L; SCOBAY, T;XING-YI G; DONALDSON, E.F; RANDELL, S.H;LANZAVECCHIA, A; MARASCO W.A; ZHENGLI-LI S; BARIC, R.S. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. **Nature Medicine**;v. 10, p.1038, 2015.
- METZKER, M.L. Sequencing Technologies the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. p.31-46, 2010.
- MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509-1528, 2009.
- NANTES, W.A. G; BARRETO, W.T. G; SANTOS F.M; DE MACEDO, G.C; RUCCOA, A.C, ASSISA, W.O; PORFÍRIOA, G.E. O; DE ANDRADE, G.B; JANSEND, A. M; HERRER, H.M. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **IJP: Parasites and Wildlife**,v. 9, p. 16-20, 2019.
- NOGUEIRA, N.R.; DE LIMA, I.P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI A.L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v.10, n. 4, p. 808-82, 2014.
- NOWAK, M.R. **Walker's Mammals of the World**. The Johns Hopkins Press Ltd. 5ed. 642pp, 1991.
- O'DWYER. L. H.; MASSARD, C. L. Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: L.F. **Livros de veterinária**, cap. 2. p.57-67,2002.

OLIFIERS, N.; GENTILE, R.; FISZON, J. T. Relação entre a composição de espécies de pequenos mamíferos e as variáveis antrópicas na Floresta Atlântica Brasileira, **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n.3, p.495-501,2005.

OLIVEIRA R.P.; BROUDE N.E.; MACEDO A.M.; CANTOR C.R.; SMITH C.L.; PENA S.D.J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n. 95, p.3776-3780, 1998.

OLIVEIRA, R.C.; GUTERRES, A.; FERNANDES, J.; D'ANDREA, P.S.; BONVICINO, C.R.; LEMOS, E.R.S. 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. **Viruses**, v. 6, p. 1929–73,2014.

OROZCO, M.M.; PICCINALLI, R.V. MORA, M.S.;ENRIQUEZ, G.F.; CARDINAL, V.G.;GURTLER, M.V. The role of sigmodontine rodents as sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* in the Argentinean Chaco. **Infection, Genetics and Evolution**, p. 1-11, 2019.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2^a Edição VA. 76 p,2012.**

PFEIFFER, D.; ROBINSON, T.; STEVENSON, M.; STEVENS, K. B.; ROGERS, D. J.; CLEMENTS, A. C. **Spatial analysis in epidemiology**. 2008.

RAMÍREZ, J. D.; DUQUE, M. C.; MONTILLA, M.; CUCUNUBÁ, Z. M.; GUHL, F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1743-1750, 2012.

RAMÍREZ *et al.*, Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17,n.5:p.605–615, 2015

RANGEL, D. A.; LISBOA, C. V.; NOVA. E.S, R.L. M.; SILVA, B.A.; SOUZA, R.F.; JANSEN, A.M. R.; ROQUE, A. L.R. Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. 2-17, 2019.

ROQUE, A. L. R; XAVIER, S. C; DA ROCHA, M. G; DUARTE, A. C. M; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 5, p. 742-749, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 3^a ed. 2001.

SANTANA, C.A. Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas**, Universidade de Brasília, 2015.

SANTOS, F.C.B. LISBOA, C.V.; XAVIER, S.C.C.; DARIO, M.A.; VERDE, R.S.; CALOURO, A.M.; ROQUE, L.R.; JASEN, A.M. *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera: Mammalia) from Acre State, Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 6, p. 1-10, 2017.

SCHMUNIS, G. Epidemiology of chagas disease in non-endemic countries the role international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p-75-85, 2007.

SILVEIRA, A.C; DIAS J.C.P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p. 52-63, 2011.

SIMMONS, C; WILSON, D.E. & Reeder, D.M. 2005. Mammals Species of the World. **Baltimore Johns Hopkins University Press**, p. 2181, 2005.

SIMPSON, A. G.; LUKEŠ, J.; ROGER, A. J. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 12, p. 2071-2083, 2002.

SIMPSON, A.G.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The evolution and diversity of Kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.4, p. 168-74, 2006. , .

SOUZA, O.M.F de.; SANTOS, C.G. S dos.; SANTOS, R. F.; LIMA, A.G.; FONSECA, E. O.L. Triatomíneos da Bahia: manual de identificação e orientações para serviço. (Orgs). Salvador /BA Oxente, 2020, p. 208.; il **ISBN 978-65-5100-007-2**.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A, SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomatidae. **Advances Parasitology**, v. 48, pp.1-56, 2006. -

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

STURM, A.; AMIDO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, p. 1287-1290,2006.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TADROS, W.; LAARMAN, J. J. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst- forming eimeriid coccidia. **Advances in Parasitology**, v.20, p.293-468,1982.

TENÓRIO, M.S.; OLIVEIRA E SOUZA, L.; ALVES-MARTIN, M.F.; PAIXÃO, M.S.; RODRIGUES, M.V.; STARKE-BUZETTI, W.A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.P.; LUCHEIS, S.B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. **Veterinary Parasitology**, p.1-9, 2014.

THOISY B; BOURHY H; DELAVAL M; PONTIER D; DACHEUX L; DARCISSAC E; DONATO D; GUIDEZ A; LARROUS F; LAVENIR R; SALMIER A; LACOSTE V; LAVERGNE A. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.1, 2016.

THOMAS, M.E; RASWEILER, Iv J.J; D'Alessandro, A. 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**, v.102, n.5, p.559-565, 2007.

TRUEB, I.;PORTELA, R.D.; FRANKE, C.R.CARNEIRO, I.O.; RIBEIRO JR. G.J.; SOARES, R.P.; BORROUIN-MELO, S.M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp infection in wildlife from urban rain forest fragments in northeast Brazil, **Jounal of wildlife diaseases**, v. 54, n.1, p. 76-84, 2018.

VALLEJO G.A; GUHL F; CARRANZA J.C; MORENO J; TRIANA O; GRISARD E.C.Parity between kinetoplast DNA and mini exon gene sequences support either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infection Genetics & Evolution**, v. 67, p. 1-7, 2003.

VILLELA, M.M.; SOUZA J.M.B.S.; MELO, V.P.; DIAS, J.C.P. Avaliação do Programa de Controle da Doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de. Saúde Pública**, v.25, n.4, p. 907-917,2009.

WAAP, H. VIDAL, R.; SOARES, H.; MARQUES, I; PEREIRA DA FONSECA, I.; FAZENDEIRO, I.; FERREIRA, M.L.; CAEIRO, V.; SHKAP, V.; HEMPHILL, A.; LEITÃO, A. Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 226-33,2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas' disease: second report of the WHO Expert Committee on Chagas' disease**. World Health Organization, 1991.

YEFI-QUINTERO, E; MARTÍN; C.M-S; BACIGALUPO,A; CORREA, J.P; CATTAN, P.E. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 171, 2018.

ZETUN, C. B.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 139-147, 2014.

ZILVERSMIT, M.; PERKINS, S. Plasmodium. **Malaria Parasites**. 05 May 2008. Disponível em: <<http://tolweb.org/Plasmodium/68071>>. Acesso em 11/03/2020.

ZINGALES B.; ANDRADE, S.G; BRIONES M.R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI E. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n.7,p. 1051–1054, 2009.

Capítulo 1 – Detecção de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil: Revisão Sistemática e Meta-análise.

Detecção de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise.

authors ... DE ALMEIDA, Patrícia Hercília Arcanjo ^{1*}; da SILVA, Aristeu Vieira^{2**};

1 – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos. Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil.

2 – Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, Bahia, Brasil

*Bolsista de Mestrado da Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia - FAPESB; **Bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Resumo

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Existem diversas espécies de mamíferos silvestres que atuam como reservatório desse parasito. O objetivo desse estudo foi avaliar as taxas de infecção entre diferentes ordens de mamíferos no Brasil, através da revisão sistemática e meta-análise. Para a revisão foi realizada uma busca nas bases de dados *Pubmed*, *Medline*, *Lilacs*, *Science direct* e *SciELO*, sem filtro de idioma e com filtro de tempo de 2000-2020. Para condução desse processo, adotou-se a ferramenta *StArt*. Com base nos critérios de seleção todos os estudos que relatavam a infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil foram escolhidos. Para análises estatísticas foi utilizada a estatística descritiva e a meta-análise do evento dicotômico com a distribuição binomial foi conduzida utilizando-se uma planilha Microsoft Excel. Para avaliar a heterogeneidade entre os estudos foi utilizado o cálculo das estatísticas Q e I^2 . Após a leitura de todos os resumos e com base nos critérios de seleção, 35 estudos continham informações importantes da infecção em mamíferos silvestres. Entre as nove ordens de mamíferos silvestres identificadas como reservatório para o *T. cruzi*, três dessas ordens apresentaram maior frequência combinada: Chiroptera (55,57%), Carnívora (38,10%) e Primata (27,85%), pelo diagnóstico molecular. Esse é o primeiro estudo de revisão sistemática e meta-análise sobre as taxas de infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Mamíferos silvestres; Taxas de infecção; Revisão Sistemática e meta-análise.

Abstract

Chagas disease is a zoonosis caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). There are several species of wild mammals that act as a reservoir for this parasite. The aim of this study was to evaluate infection rates among different mammalian orders in Brazil, through systematic review and meta-analysis. For the review, a search was carried out in the databases *Pubmed*, *Medline*, *Lilacs*, *Science Direct* and *SciELO*, without language filter and with 2000-2020 time filter. To conduct this process, the *StArt* tool was adopted. Based on the selection criteria, all studies that reported *T. cruzi* infection in wild mammals in Brazil were chosen. For statistical analysis, descriptive statistics were used and the meta-analysis of the dichotomous event with the binomial distribution was conducted using a Microsoft Excel spreadsheet. To assess the heterogeneity between the studies, we due calculation of the Q and I^2 statistics. After reading all the abstracts and based on the selection criteria, 35 studies contained important information on infection in wild mammals. Among the nine orders of wild mammals identified as a reservoir for *T. cruzi*, three of these orders had the highest combined frequency: Chiroptera (55.57%), Carnivora (38.10%) and Primate (27.85%), by

molecular diagnosis. This is the first study of systematic review and meta-analysis on the infection rates of *T. cruzi* in wild mammals in Brazil.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*; Wild mammals; Infection rates; Systematic review and meta-analysis.

Introdução

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Esse parasito possui uma ampla distribuição no continente americano, sendo considerada uma importante infecção parasitária com consequências graves para a Saúde Pública (ZINGALES, 2012). A transmissão ocorre através de triatomíneos hematófagos, transfusão de sangue, transplantes de órgãos, transmissão congênita e ingestão (RASSI et al., 2010).

T. cruzi é encontrado circulando na natureza entre mais de uma centena de mamíferos distribuídos em sete ordens diferentes e dezenas de espécies de vetores (NOIREAU et al., 2009). Esse parasito possui cepas que foram divididas em seis unidades discretas de tipificação (DTUs) denominadas TcI a TcV (ZINGALES et al., 2009), além da TcBat (JASEN et al., 2015).

O papel de diferentes espécies de triatomíneos e mamíferos na transmissão do *T. cruzi* depende de diferentes tipos de ciclos, silvestre, peridoméstico e doméstico (WHO, 2012). Apesar da grande importância epidemiológica do ciclo doméstico na transmissão do *T. cruzi*, hoje há um grande sucesso no controle de triatomíneos por meio de pulverização de inseticida nos países considerados endêmicos para a doença de Chagas (REITHINGER et al., 2009; GUHL, 2009).

No âmbito silvestre, a transmissão é muito mais complexa e as medidas de controle são menos claras (BRITO et al., 2017). Os mamíferos silvestres são capazes de se aproximarem do ser humano, especialmente alguns marsupiais e morcegos, além de reservatórios sinantrópicos como os roedores (MARTINS et al., 1968). A proximidade desses animais com o ciclo doméstico é facilitada pela grande mobilidade desses mamíferos (BRICEÑO-LEÓN, 1990), sobretudo em áreas com o crescimento populacional contínuo e desmatamento em áreas silvestres o que aumenta o contato de mamíferos silvestres, vetores e os seres humanos (WHO, 2002). Além disso, existem registros de surtos da transmissão oral

em áreas rurais e urbanas em país da América do Sul, sugerindo um contato entre os dois ciclos (ANDRADE et al., 2014).

As ordens de mamíferos silvestres com maior frequência de infecção são Didelphimorphia, Chiroptera e Rodentia (MARCILI et al., 2009; COURA e JUNQUEIRA, 2012). Na ordem Didelphimorphia, o gênero *Didelphis* está frequentemente associado à transmissão do *T. cruzi*. O perfil de infecção desses animais por *T. cruzi* apresenta uma característica que os tornam únicos quando comparados aos demais hospedeiros do parasito: apresenta uma alta parasitemia e se adapta facilmente a ambientes degradados. (ROQUE E JANSEN ,2014). Para a ordem Chiroptera (*Carollia perspicillata*, *Artibeus fuliginosus*) e Rodentia (*Akodon spp.*, *Dasyprocta spp.*) já foram relatadas essas espécies como hospedeiros para o *T. cruzi*. Outras ordens silvestres como Cingulata (*Dasybus novencintus*) e Primata (*Ateles spp.*, *Cebus spp.*) também já foram descritas infectadas por *T. cruzi* e com altas taxas de prevalência, enquanto grandes mamíferos das ordens Artiodactyla (subfamílias Bovinae, Caprinae e Suinae) e Perissodactyla (família Equidae) raramente são infectados ou mostram taxas de infecção muito baixas na América do Sul (JANSEN E ROQUE, 2010).

Este estudo teve o objetivo de avaliar as taxas de infecção entre diferentes ordens de mamíferos silvestres no Brasil, sob quais condições ela ocorre, a frequência de relatos na literatura, utilizando-se de uma revisão sistemática e meta-análise.

Métodos

Trata-se de uma revisão sistemática descritiva, baseada nos preceitos estabelecidos pelo modelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (ANEXO A) e meta-análise da frequência de infecção das diferentes ordens de mamíferos estudadas.

Estratégia de busca

A pesquisa dos artigos científicos foi realizada de outubro a novembro de 2020, por dois examinadores. Foram consultadas as bases de dados eletrônicas *PubMed*, *LILACS*, *MEDLINE*, *SciELO* e *Science Direct*, sendo incluídos todos os artigos escritos em português, inglês e espanhol, com filtro de tempo de 2000-2020 (Apêndice 1). Para a condução desse processo, adotou-se a ferramenta StArt - *State of the Art through Systematic*

Review (FABBRI ET AL., 2012) para auxiliar o gerenciamento das fases e também todo processo de condução da Revisão Sistemática (RS).

Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão admitidos foram: (I). Estudos transversais que incluam mamíferos silvestres no Brasil; (II). Artigos completos; (III). Realizados em território brasileiro; (IV) Relatar o número de animais testados; (V). Relatar o número de animais positivos; (VI) Descrever o método de diagnóstico; (VII). Tamanho mínimo de 10 amostras. Já os critérios de exclusão utilizados foram: Tese; Artigos duplicados; Dissertações; Monografias; Capítulo de livros; Livros; Editoriais; Carta ao editor; Publicações em anais; Cartas; Resumo indisponíveis; Estudos publicados antes de 2000.

Extração dos Dados

A seleção inicial foi feita por meio da leitura dos títulos e resumos. Foram selecionados para análise todos os artigos que mencionavam a infecção de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres. Posteriormente, todos os trabalhos com critérios de elegibilidade foram lidos na íntegra, e foram selecionados aqueles que preencheram os critérios de inclusão. Avaliou-se, de cada artigo elegível, os critérios de evidências utilizados para obter informações relevantes. Foram estabelecidos quatro critérios de evidência:

1. O estudo abordou a questão problema claramente?
2. O método de diagnóstico para *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres foi claramente informado e adequado para responder à questão de pesquisa?
3. O período de estudo foi claramente definido?
4. Os mamíferos silvestres foram classificados taxonomicamente?

Assim como processo de seleção, na extração também se utilizou da ferramenta StArt. Em seguida, foi criada uma planilha de extração no Excel para obter as informações dos estudos, tais como: referência, ano do estudo, local, tamanho da amostra, amostras positivas, método de diagnóstico, classificação taxonômica e o bioma de origem dos animais. Para as análises, os mamíferos silvestres foram agrupados em ordem e espécie. Os métodos de

diagnósticos foram classificados em parasitológicos (esfregaço sanguíneo, hemocultura e xenodiagnóstico), sorológicos e moleculares.

Análise Estatística

As estatísticas descritivas são apresentadas como proporção de infecção e intervalos de confiança de 95% (IC 95%), em tabelas de frequência.

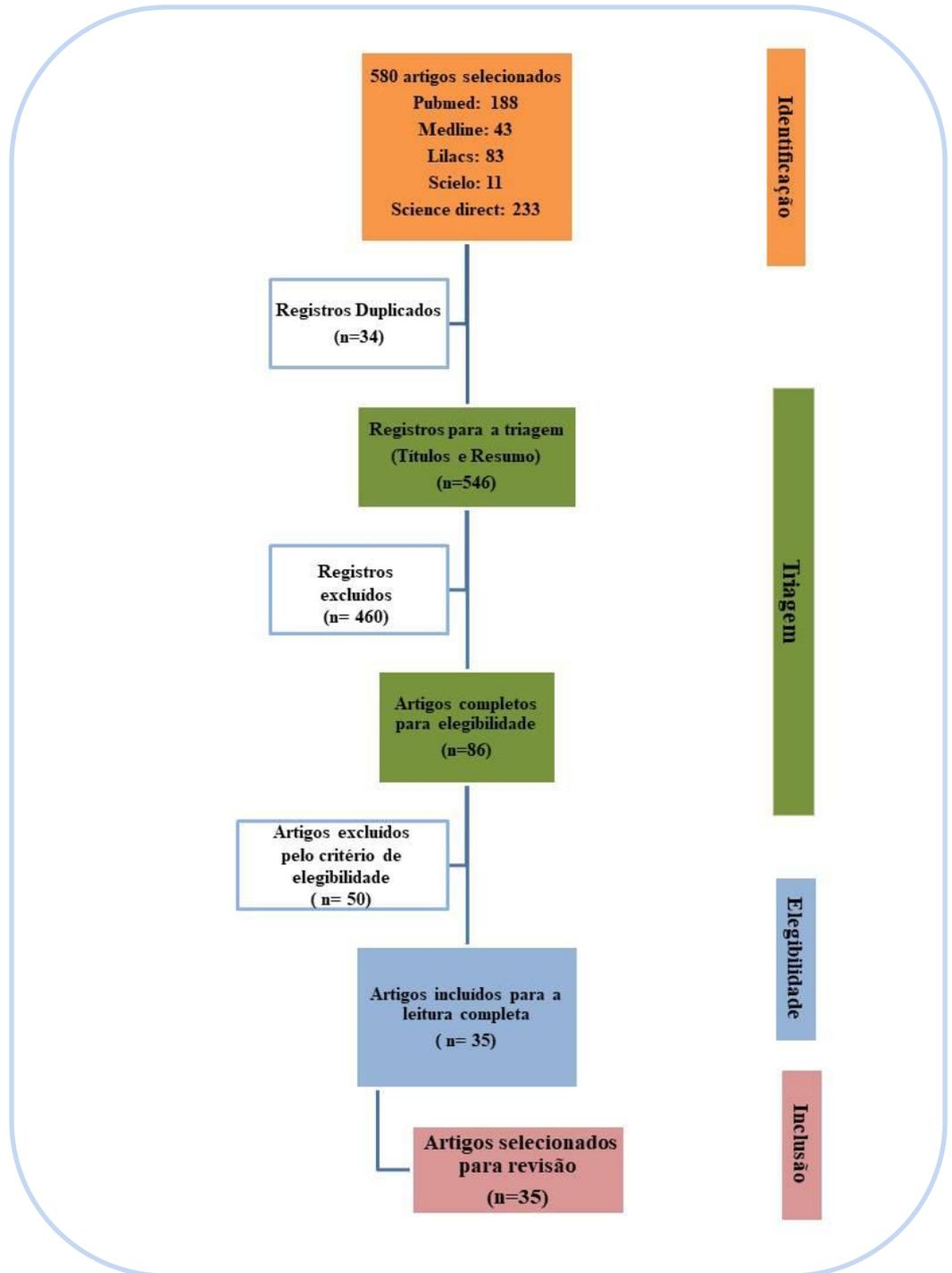
A meta-análise do evento dicotômico (frequência de positividade ao teste diagnóstico) com distribuição binomial foi conduzida utilizando-se uma planilha Microsoft Excel (NEYELOFF et al, 2012). Para avaliar a heterogeneidade entre os estudos foi utilizado o cálculo da estatística Q , utilizando a estatística I^2 para quantificação da heterogeneidade. Nos casos em que a heterogeneidade foi baixa, utilizou-se um modelo de efeitos fixos para o

Por se tratar de um estudo descritivo de revisão de artigos já publicados, não houve necessidade de submissão ao Comitê de Ética. cálculo da proporção de infecção do conjunto dos estudos avaliados; para os casos de alta heterogeneidade, as proporções de infecção do conjunto de estudos foram calculadas em um modelo de efeitos aleatorizados. As frequências de positivos calculadas para o conjunto de artigos avaliados foram denominada frequência combinada. Em todas as análises foram consideradas um nível de significância de 0,05.

Resultados

A Figura 1 demonstra o fluxograma de seleção dos artigos para a revisão. Com as consultas às bases de dados, 580 artigos foram identificados: 188 na base PubMed; 43 na MEDLINE; 83 na LILACS; 11 na SciELO; e na Science Direct 233 artigos. Após a exclusão de 34 artigos duplicados, 546 foram selecionados para triagem. A maior parte dos artigos foi excluída por não abordar a detecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil. Depois de ler todos os resumos e com base nos critérios de seleção, 36 estudos continha informações importantes da infecção em mamíferos silvestres, um artigo foi excluído porque possuía um tamanho amostral inferior a 10. A Tabela 1 mostra a descrição geral dos 35 artigos incluídos nas análises quantitativas.

Figura 1 Fluxograma do processo de busca e seleção para as análises qualitativas e quantitativas de artigos originais sobre a detecção de *Trypanosoma* em mamíferos silvestres no Brasil no período de 2000 a 2020.



Fonte: Próprio autor

Tabela 1. Informações relevantes dos 35 artigos incluídos para as análises quantitativas sobre a infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil.

Referência	Período do estudo	Bioma	Número de animais examinados
Acosta et al. 2014	2014	Mata Atlântica	317
Alves et al. 2016	2010-2012	Pantanal	39
Bahia et al 2016	2013-2014	Amazônico	112
Bezerra et al. 2014	2014	Caatinga	112
Brandão et al. 2014	2014	Caatinga	113
Brandão et al. 2019	2013-2015	Cerrado	144
Brandão et al. 2020	2013-2017	Cerrado	131
Costa et al. 2018	2018	Caatinga	76
Da Costa et al. 2015	2012-2013	Caatinga	131
Da Costa et al. 2016	2012-2013	Cerrado	131
Dario et al. 2016	2012	Mata Atlântica	15
Dronzino et al. 2019	2014-2015	Mata Atlântica	47
Ferreira et al 2017	2017	Cerrado	232
Gurgel-Gonçalves et al. 2004	2004	Cerrado	168
Herrera et al. 2005	1999-2001	Caatinga	289
Jasen et al 2018	1992-2017	Amazônico/ Pantanal/ Mata Atlântica/ Pampa/ Cerrado/ Caatinga	6587
Lisboa et al. 2004	2004	Mata Atlântica	198
Lourenço et al 2018	2015	Cerrado	146
Maia et al 2008	2001-2005	Amazônico	96
McClean et al.2020	2020	Amazônico/ Caatinga/ Mata Atlântica	145
Minuzzi-Souza et al 2016	2012	Cerrado	26
Nantes et al. 2020	2019	Pantanal	68
Olifiers et al 2015	2006-2009	Cerrado	102
Porfirio et al 2018	2018	Pantanal	36
Reis et al.2020	2016-2017	Cerrado	74
Rocha et al.2012	2007-2011	Cerrado	195
Rodrigues et al. 2019	2019	Amazônico/ Mata Atlântica/ Cerrado/ Pantanal/ Pampas	120
Roque et al 2013	2008	Amazônico	87
Santos et al. 2018	2015-2018	Pantanal	106
Santos et al. 2019	2015-2016	Pantanal	279
Trueb et al. 2018	2013	Mata Atlântica	65
Vaz et al. 2007	2004-2005	Mata Atlântica	440
Xavier et al 2014	2014	Amazônico	50
Zetun et al 2014	2004-2005	Mata Atlântica	15

Fonte: Próprio autor

Das sete ordens de mamíferos silvestres descritas neste estudo, cinco apresentaram tamanho suficiente para realizar a meta-análise e calcular a prevalência de infecção de *T. cruzi*. As ordens Artiodactyla e Edentata foram excluídas das análises quantitativas devido ao pequeno número de amostras. Também não foi possível estimar a taxa de infecção para ordem Rodentia utilizando o diagnóstico molecular (Tabela 2).

Nos testes parasitológicos, a ordem Didelphimorphia foi a que apresentou a maior frequência de animais positivos (20,57%; IC95%:16,81-25,21, $I^2= 88,33$, $Q= 17,13$, Valor de $P<0,05$). Nos testes sorológicos a ordem Primatas e Didelphimorphia apresentaram frequência

de 32,07% (IC95%:29,32-34,94, $I^2= 76,06$, Q= 4,18, Valor de $P<0,05$) e 20,40% (IC95%: 19,02-21,71, $I^2= 88,33$, Q=17,13, Valor de $P<0,05$) respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas descritivas (número de animais examinados, N; frequência absoluta de positivos, Fi; frequência relativa de positivos, fi; intervalo de confiança para a frequência relativa de positivos; IC95%) e meta-análise (número de estudos incluídos na análise, NE; frequência combinada de positivos, FC; intervalo de confiança para a frequência combinada de positivos; IC95%; estatísticas I^2 e Q) segundo a natureza do método diagnóstico de *Trypanosoma* e ordem de mamíferos silvestres avaliada, em artigos brasileiros do período de 2000 a 2020.

Diagnóstico/Ordem	Estatística Descritiva				Meta-análise				
	N	P(n)	P(%)	IC95%	NE	FC (%)	IC95%	I^2 (%)	Q
Parasitológico									
Carnívora	610	75	12,30	9,92-15,14	4	11,3	3,0-19,6	91,68	36,06
Chiroptera	378	23	6,08	4,90-8,96	3	6,5	3,7-9,3	8,99	2,20*
Didelphimorphia	347	72	20,75	16,81-25,21	7	22,0	10,8-33,3	89,47	56,98
Edentata	98	5	5,10	2,25-11,39	-	-	-	-	-
Primatas	375	12	3,20	1,85-5,50	3	1,8	0,4-3,1	62,58	5,35*
Rodentia	8052	438	5,44	4,96-5,95	4	5,7	2,8-8,5	77,16	13,14
Total	9860	625	6,34	5,87-6,84	-	-	-	-	-
Sorológico									
Artiodactyla	99	9	9,09	4,90-16,39	-	-	-	-	-
Carnívora	444	54	12,16	9,44-15,53	2	19,5	17,7-21,3	59,72	2,48*
Chiroptera	19	1	5,26	1,23-24,87	-	-	-	-	-
Didelphimorphia	3491	712	20,40	19,02-21,76	3	33,6	16,4-50,8	88,33	17,13
Edentata	15	2	13,33	4,04-38,34	-	-	-	-	-
Primatas	1057	339	32,07	29,32-34,94	2	36,2	22,9-49,6	76,06	4,18
Rodentia	384	19	4,95	3,20-7,60	2	17,6	13,8-21,5	57,45	2,35
Total	5509	1136	20,62	19,57-21,70	-	-	-	-	-
Molecular									
Carnívora	147	56	38,10	30,64-46,16	4	42,17	17,34-6,99	81,24	15,99
Chiroptera	256	142	55,47	50,90-62,95	4	45,8	3,7-87,9	97,12	104,42
Didelphimorphia	249	67	26,91	21,78-32,74	5	28,4	15,7-41,0	58,26	9,58
Edentata	14	6	42,86	21,26-67,71	-	-	-	-	-
Primatas	158	44	27,85	21,45-35,31	3	45,7	2,2-89,2	89,75	19,51
Rodentia	99	2	2,02	0,68-7,03	-	-	-	-	-
Total	923	317	34,34	31,35-37,46	-	-	-	-	-

Obs.: *Valor de $P > 0,05$.

Nos testes moleculares a ordem Chiroptera, Carnívora e Primatas foram encontradas com frequências combinadas de 55,57% (IC95%: 50-90- 62,95, $I^2= 81,24$, Q= 15,99; $P< 0,05$), 38,10% (IC95%: 30,64- 46,16, $I^2= 81,24$; Q= 15,99, $P< 0,05$) e 27,85% (IC95%: 21,45-35,31, $I^2= 89,75$, Q= 19,51, $P<0,05$) respectivamente (Tabela 2).

A exceção das ordens Chiroptera e Primata, no diagnóstico parasitológico, e para a ordem Carnívora no diagnóstico sorológico, todas as outras ordens e métodos diagnósticos avaliados são traduzidos por estudos com alta heterogeneidade, acima de 55% e frequentemente acima de 70%.

Discussão

Essa revisão sistemática obteve 35 estudos que incluíram nove ordens de mamíferos silvestres investigados para a infecção de *T. cruzi* no Brasil, sendo o primeiro registro no país.

Entre as nove ordens de mamíferos silvestres identificadas como reservatório para o *T. cruzi*, três dessas ordens apresentaram maior frequência combinada: Chiroptera (55,57%); Carnívora (38,10%) e Primatas (27,85%), pelo diagnóstico molecular. De acordo com Rodríguez-Monguí et al. (2019), as técnicas moleculares, como as PCRs podem diferenciar espécies e são significativamente mais sensíveis e capazes de detectar valores mais altos de prevalência.

A ordem Chiroptera apresentou maior frequência combinada. Situação semelhante é observada na Colômbia em um estudo de revisão sistemática e meta-análise, onde foi observada uma alta frequência de infecção por *T. cruzi* nessa ordem (RODRÍGUEZ-MONGUÍ et al., 2019). Segundo esses mesmos autores, espécies dessa ordem são reservatórios importantes na transmissão silvestre do *T. cruzi*.

As espécies pertencentes a essa ordem já foram encontradas infectadas por tripanosomas ao redor do mundo (JASEN et al., 2015), dentre os quais o *T. cruzi* (ROQUE E JASEN, 2014). Os morcegos apresentam adaptações morfológicas e fisiológicas para o vôo e uma evolução no seu sistema imunológico, o que permitiu os morcegos hospedar muitas espécies de parasitos, alguns desses com importância na Saúde Pública (BROOK E DOBSON, 2015).

Esses animais podem ser importantes reservatórios para *T. cruzi*, visto que em determinadas áreas são abundantes, adaptam-se ao domicílio humano e podem apresentar elevada prevalência de infecção. A infecção ocorre por diferentes vias, mas a transmissão oral decorrente da ingestão de triatomíneos certamente apresenta um papel importante (ROQUE E JASEN, 2014). Estudos recentes revelam a diversidade do tripanosoma em morcegos (LOURENÇO et al., 20018; DARIO et al., 2016).

Nesses animais, já foram identificadas populações bastante heterogêneas que diferem em diversas características morfológicas, biológicas e moleculares (MILES et al. 2009). Quanto aos isolados pertencentes às DTUs, já foram identificados morcegos infectados pelas linhagens TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcBat, além da presença de infecções mistas (JANSEN et al., 2015), sendo que as DTUs mais frequentes em morcegos (TcI e TcV) estão comumente associados a novos casos de doença de Chagas no Brasil (ZINGALES et al., 2018).

Os carnívoros silvestres já foram encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi*. Esses mamíferos apresentam uma importante biomassa corporal e grande área de deslocamento, aspectos importantes para a dispersão de parasitos. Carnívoros de médio e grande porte são conhecidos como predadores de topo de cadeia e sua alimentação normalmente incluem outros mamíferos menores que podem estar infectados por *T. cruzi*. Embora a transmissão vetorial também ocorra, a via mais comum de infecção desses animais, assim como de qualquer outro predador na natureza, parece ser a via oral pela ingestão de mamíferos infectados (ROQUE E JASEN, 2014).

Nesse trabalho foram avaliados artigos que identificaram as seguintes espécies de carnívora como potenciais reservatório para *T. cruzi*: *Nasua nasua*, *Cerdocyon thous* e *Eira barbara*, entre outros. Essas espécies de carnívora podem apresentar alta parasitemia e que pode ser mantida ao longo do tempo. Esses animais apresentam uma elevada abundância relativa em algumas regiões do Brasil, o que reforça ainda mais a sua relevância como reservatório (HERRERA et al., 2008). Carnívoros das espécies *Conepatus chingana* (zorrilho) na Argentina, *Procyon lotor* (guaxinins) e *Urocyon cinereogenteus* (raposas-cinzentas) na América Central e no Sul dos Estados Unidos são outros exemplos de carnívoros silvestres frequentemente encontrados infectados por *T. cruzi* (ROQUE E JASEN, 2014).

Outro achado importante dessa revisão foi a frequência combinada em mamíferos silvestres da Ordem Primata. Essa ordem inclui famílias Cebidae (micos) e Callitrichidae (sagüis) são comumente encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi*. Endêmicos das Américas, esses primatas ocupam distintos estratos arbóreos e apresentam hábitos alimentares variados, incluindo espécies que se alimentam de invertebrados e pequenos mamíferos, o que favorece a transmissão de *T. cruzi* pela via oral. Seu refúgio noturno em ocos de árvores, muitas vezes compartilhado com triatomíneos, possibilita a infecção vetorial desses animais (ROQUE E JASEN, 2014).

Os animais dessa ordem são importantes hospedeiros silvestres de *T. cruzi* (JASEN et al., 2017) e a transmissão é descrita onde os triatomíneos são encontrados (WILLIAMS et al., 2009; MINUZZI-SOUZA et al., 2016). Existem registros de infecção por *T. cruzi* em primatas neotropicais de vida livre e em cativeiro. Esses estudos são importantes para compreender os danos clínicos causados pela doença de Chagas e entender o papel do hospedeiro na manutenção do parasito (LISBOA et al., 2006; MINUZZI et al., 2016; BAHIA et al., 2016).

A infecção por *T. cruzi* nesses mamíferos apresenta muitos pontos em comuns com a doença de Chagas, tais como a baixa frequência de alterações cardiológicas, rara ocorrência de síndromes megas, e modificações sistêmicas (ROQUE E JASEN et al., 2014). O genótipo TcI associado a doença de Chagas foi encontrado em animais dos gêneros *Aotus*, *Callitrix* e *Cebus* no Brasil, reforçando a transmissão entre ciclos silvestre e doméstico (MARCILLI et al., 2009).

Um fator importante no estudo de primatas neotropicais são os programas de translocação e reintrodução com primatas ameaçados de extinção (LISBOA et al., 2006; MINUZZI-SOUZA et al., 2016), sem que se considere a prevalência e o perfil de infecção por parasitos, como o *T. cruzi*. Assim, esses programas podem desencadear na introdução de mamíferos infectados e promover o estabelecimento de novos ciclos de transmissão (ROQUE E JASEN, 2014).

Diversas espécies de mamíferos silvestres podem desempenhar diferentes papéis na manutenção do parasito em diferentes localidades. A infecção por *T. cruzi* em qualquer espécie de mamífero silvestre é determinado por fatores relacionados ao hospedeiro (espécie, sexo, idade, padrão comportamental), ao parasito (tempo de geração, estratégias de dispersão, características bioquímicas e moleculares das subpopulações) e ao ambiente (stress, coinfeções, disponibilidade de recursos) onde ocorre a interação (ROQUE E JASEN, et al., 2014). De acordo com esses autores, são considerados reservatórios aqueles capazes de infectar e manter o parasito por um tempo determinado na natureza.

Em relação aos métodos de diagnósticos ficou evidente que a heterogeneidade está claramente presente entre os estudos que utilizou diferentes técnicas de diagnóstico, e também em estudos que usaram a mesma técnica. Os testes sorológicos apresentaram maiores diferenças metodológicas quando usado para diagnosticar *T. cruzi* em mamíferos silvestres.

Na imunofluorescência indireta e direta (IFAT), os estudos utilizaram diferentes concentrações de antígenos (SANTOS et al., 2016; VAZ et al., 2016; XAVIER et al., 2014; JASEN et al., 2018). No ELISA também houve diferenças metodológicas especialmente em relação aos tipos de anticorpos conjugados (ALVES et al., 2016; JASEN et al., 2018; MCCLEAN et al., 2020).

Em relação aos testes moleculares por PCR a meta-análise demonstrou alta heterogeneidade entre as ordens Chiroptera (LOURENÇO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019; DRONZINO et al., 2019; SANTOS et al., 2019), Carnívora (ROCHA et al., 2012; OLIFIERS et al., 2015; ALVES et al., 2016; BRANDÃO et al., 2020) e Primatas (BAHIA et al., 2016; MINUZZI-SOUZA et al., 2016; REIS et al., 2020). Embora os autores tenham usados oligonucleotídeos inicializadores diferentes para identificar o DNA do parasito, esse talvez não seja o motivo da heterogeneidade observada nos subgrupos, que pode ser devido a variação na prevalência real de infecção, já que a PCR é um método sensível e específico (RODRÍGUEZ-MONGUÍ et al. 2019).

Nossos resultados demonstram uma alta frequência nas taxas de infecção entre as ordens Didelphimorfia e Edentata. O contato entre espécies de mamíferos silvestres dessas ordens e os humanos podem ser potencialmente importantes (RODRÍGUEZ-MONGUÍ et al. 2019), uma vez que o consumo de carne de caça é um hábito comum das populações rurais do Brasil (SANGENIS et al., 2015), e a transmissão da doença por essa via pode representar um papel epidemiológico mais relevante do que se tem documentado.

Em áreas rurais do Rio de Janeiro demonstrou que o consumo de carne de animais silvestres foi referido por 78% dos moradores e pelos 15 casos de doença de Chagas autóctones. Tatu e gambá, conhecidos como reservatórios de *T. cruzi* foram animais mais citados (SANGENIS et al., 2015; YEO et al., 2005). Assim, os achados desse trabalho têm grande relevância na Saúde Pública, pois este estudo mostra a diversidade de reservatórios que participam do ciclo de *T. cruzi*.

Por fim, este estudo apresenta algumas limitações tais como: uma alta heterogeneidade o que torna mais difícil a obtenção de melhor frequência combinada; tamanho amostral reduzido em alguns estudos selecionados, o que leva a amplos intervalos de confiança (RODRÍGUEZ-MONGUÍ et al., 2019). Outra limitação importante é que nesse estudo ainda não foi realizada a frequência combinada por espécies de mamíferos silvestres avaliadas em

cada artigo, essa análise pode ajudar a compreender a relevância de algumas espécies na manutenção do parasito e risco de transmissão para as populações humanas.

Conclusão

Essa é a primeira revisão sistemática e meta-análise das taxas de infecção por *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil. Os resultados confirmam a presença de infecção por *T. cruzi* em nove ordens de mamíferos silvestres estudadas. As ordens com maior frequência foram Chiroptera, Carnívora e Primata. No entanto, é necessário avaliar as espécies de mamíferos avaliadas para compreender a importância de algumas espécies na manutenção do parasito e risco de transmissão para populações humanas.

Referências

ACOSTA, I. C. L.; DA COSTA, A.P.; GENNARI,S.M.; MARCILI, A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State On Espirito Santo, Brazil. *Vector-borne Diseases, Surveillance, Prevention*, v. 53, n.3, p. 683-693, 2014.

ALVES, M. F.; LIMA, J.S.; ROCHA, F. L.; HERRERA, H.M.; MOURÃO, G.M.; JANSEN, A.M. Complexity and multi-factoriality of *Trypanosoma cruzi* sylvatic cycle in coatis, *Nasua nasua* (Procyonidae), and triatomine bugs in the Brazilian Pantanal. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 378, p. 2-9, 2016.

ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K.J.; DUTRA W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, p. 3-10, 2014.

BAHIA, M.; BARROS, F.N.L.; MAGALHÃES-MATOS, P.C.; GONÇALVES, T.S.; NETO, L. C.; FARIA D.C.L.O.; ROMEIRO, S.A.; MONTEIRO, F.O.B.; GÓES-CAVALCANTE, .G.; SCOFIELD, A. *Trypanosoma cruzi* infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. **American Journal Primatology** , v. 9999, p. 1–6,2016.

BEZERRA, C.M.; BARBOSA, S. E.; SOUZA, R.C.M .; BAREZANI, C.P .; ESTEBAN, R.; GÜRTLER, R.E.; RAMOS JR, A.N.; DIOTAIUTI, L. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the Brazilian Cerrado. **Acta Tropica**, v. 10, n.102, p.1-20, 2017.

BEZERRA, C.M.; CAVALCANTI, L.P.G.;SOUZA, R.C.M , BARBOSA, S.E.; XAVIER, S.C.C.; JANSEN, A. M.; RAMALHO, R.D.; DIOTAIUTI, L. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga área colonised by *Triatoma brasiliensis*. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n.7, p.887-898, 2014.

BRANDÃO, E. M.V.; SAMANTA, C. C. XAVIER, S. C.C.; CARVALHAES, J.G.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS , F.G.; AZEVEDO, F. C.; CÁSSIA-PIRES, R.; , Ana M. JANSEN, A. M.; ROQUE, A.L.R. Trypanosomatids in Small Mammals of na Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in na Anthropogenic Landscape. **Pathogens** , v.8, n.190, p. 6-15, 2019.

BRANDÃO, E. M.V.; XAVIER, S.C.C.; 1 , ROCHA, F. R.; LIMA, C.F.M .; CANDEIAS, I.Z.; Lemos , F.G.; AZEVEDO, F. C.; JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L.R. Wild and Domestic Canids and Their Interactions in the Transmission Cycles of *Trypanosoma Cruzi* and *Leishmania* spp. in an Area of the Brazilian Cerrado. **Pathogens**, v. 9, n. 818, p. 2-19, 2020.

BRICEÑO-LEÓN R . La casa enferma. **Sociologia de la enfermedad de Chagas**. Caracas: BRITO R. N.; GORLA, D. E.; DIOTAIUTI, L.; GOMES, A.C.F.; SOUZA,R. C. M, ABAD-FRANCH, F. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: a multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance Martins AV. Epidemiologia. In: Cançado JR, editor. Doença de Chagas. Belo Horizonte:**PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 35-60, 2017.

BROOK, C.E.; DOBSON, A.P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens, **Trends in Microbiology**, v. 23, n.3, 2015.

COSTA, A. P.; COSTA, F.B.; SOARES, H.S.; RAMIREZ, D.G.; MESQUITA, E.T.K.C.; GENNARI, S.M.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* chagasi Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 11, p.656-666, 2015.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 145-154, 2012.

DA COSTA, A.P.; FERREIRA, J.I.G. S.; DA SILVA, R. E; TONHOSOLO, R.; ARAÚJO, A.C.; GUIMARÃES, M.F.; HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* in Triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões,

Northeastern Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 445-451, 2018.

DARIO, M. A.; RODRIGUES, M. S.; BARROS, J. H. S.; XAVIER, S.C.C.; D'ANDREA, P. S.; ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 477, p. 2-14, 2016.

DE ARAÚJO, V.A.L.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L.R. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 140, p. 455–460.

DROZINO, R.N.; OTOMURA, F. H.; GAZARINI, J.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O. *Trypanosoma* Found in Synanthropic Mammals from Urban Forests of Parana Southern Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v.20, n.20,2019.

FABBRI, S.; HERNANDES, E.; DI THOMMAZO, A.; BELGAMO, A.; ZAMBONI, A.; SILVA, C. “Managing literature reviews information through visualization”. In: **International Conference on Enterprise Information Systems.14th. ICEIS, Wroclaw, Poland, 2012.**

FERREIRA, J.I.G.S.; COSTA, A.P.; Nunes, P.H.; RAMIREZ, D.; FOURNIER, G.F.R.S.; SARAIVA, D.; TONHOSOLO, R.; MARCILII, A. New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. from South American marsupial in Brazilian Cerrado, **Acta Tropica**,v. 10, n.108, p. 1-17, 2017.

GUHL, F. **Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. Biomédica.** n. 2, p.228–34. 2009.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, R.E.D.; DUARTE, M.A.; PALMA, A.R.T.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J.C. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*,v. 46, p.323-330, 2004.

HERRERA, L.; D'ANDREAC, B.P.S. XAVIER, S.C.C.; MANGIA, R.H.; FERNANDES, D.D. JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park ‘Serra da Capivara’ and its surroundings (PiauÍ, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 379-388, 2005.

HODO, C. L.; WILKERSON, G. K.; BIRKNER, E.C.; GRAY, S.B.; HAMER, S.A. *Trypanosoma cruzi* Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. **EcoHealth** , v.15, p. 426–436, 2018.

JANSEN, A.M.; DAS CHAGAS XAVIER, S.C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites Vectors**,v. 11, p. 502, 2018.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Tropica**, v. 151p. 1-15, 2015.

LISBOA, C.V.; MANGIA, R.H.; RUBIÃO, E.; LIMA, N.R.C.; XAVIER, S. C.C.; PICINATTI, A.; FERREIRA, L. F.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 90, p. 97-106, 2004.

LOURENÇO, J. L. M.; MINUZZI-SOUZA, T. T. C.; SILVA, L.R.; OLIVEIRA, A.C.; Mendonça, V.J.; NITZ, N.; AGUIAR, L.M. S.; GURGEL-GONÇALVES, R. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savana, v10. p. 1-29, 2018.

MAIA, F.M.S R.; NAIFF, A.D; Marcili, D.; GORDOC, M.; D’Affonseca Neto, J.F; NAIFF, M.F.; FRANCO, A. M.R.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, S. A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G.; MILES, M.A. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Tropica**, v.107, p.168–173, 2008.

- MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenética e padrões ecogeográficos de isolados silvestres. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- MARTINS, A. V. Epidemiologia. In: Cançado JR, editor. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial, .285-97,1968.
- MCCLEAN, M.C.W.; BHATTACHARYYA, T. MERTENS, P.; MURPHY, N.; GILLEMAN, Q.; GUSTIN, Y, ZEIPPEN, N ., XAVIER, S.C. C, JANSEN, A.M.; MILES, M.A. A lineage-specific rapid diagnostic test (Chagas Sero K-SeT) identifies Brazilian *Trypanosoma cruzi* II/V/VI reservoir hosts among diverse mammalian orders. **Plos One**, v. 10, n. 106, p. 1-13, 2020.
- MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509-1528, 2009.
- MINUZZI-SOUZA, T.T.C.; NITZ, N.; KNOX, M.B.; REIS, F.; HAGSTRÖM, L.; CUBA, C.A.C.; HECHT, M.M.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. **Parasites & Vectors**, v.9, v.39, p.1-6, 2016.
- NANTES, W.A. G; BARRETO, W.T. G; SANTOS F.M; DE MACEDO, G.C; RUCCOA, A.C, ASSISA, W.O; PORFÍRIOA, G.E. O; DE ANDRADE, G.B; JANSEND, A. M; HERRER, H.M. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **IJP: Parasites and Wildlife**,v. 9, p. 16-20, 2019.
- NEYELOFF, J.L.; FUCHS, S. C.; MOREIRA, L.B. Meta-analyses and Forest plots using a Microsoft excel spreadsheet: step-by-step guide focusing on descriptive data analysis. **BMC Research Notes**, v. 5, n.52, p. 2-6, 2012.
- NOIREAU F. Wild *Triatoma infestans* a potential threat that needs to be monitored. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v.104p. 60–64, 2009.
- OLIFIERS, N.; GENTILE, R.; FISZON, J. T. Relação entre a composição de espécies de pequenos mamíferos e as variáveis antrópicas na Floresta Atlântica Brasileira, **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n.3, p.495-501,2005.
- PORFIRIO, G. E.O.; SANTOSA, F.M.; MACEDO, G. C.; BARRETO, W.T.G.; CAMPOS , J.B.V.; MEYERS , A.C.; ANDRÉ, M.R. , PERLES D.,L.; OLIVEIRA , C. E.; XAVIER, S.C.C.; , ANDRADE , G.B.; JANSEN , A.M.; HERRERA, H.M. Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. **IJP: Parasites and Wildlife**, v. 7, p. 389-404, 2018.

RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES,; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, p. 189-198,2002.

RASSI A.; RASSI A.; MARIN-NETO J.A. **Chagas disease**. *Lancet*. p. 1388–402,2010.

REITHINGER, R.; TARLETON, R. L.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap. **BMJ**. v.338, p. 1283, 2009.

REIS, F.C.; MINUZZI-SOUZA, T.T.C.; NEIVA, M.; TIMBÓ, R.V.; MORAIS, I.O.B.; DE LIMA, T.M.; HECHT, M.; NITZ, N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasília Zoo, Federal District, Brazil, **Veterinary Medicine and Science Published by John Wiley & Sons Ltd**, v.6, p.248-256.

ROCHA, F.L; ROQUE, A.L.R.; ARRAIS, R.C.; SANTOS, J.P.; LIMA, V, S.; XAVIER, S.C.C.; CORDEIR-ESTRELA, P.;, D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 160–170,2012.

RODRIGUES, M.S.; LIMA, L.; Xavier, S.C.C.; HERRERA, H.M.; ROCHA, F.L.; ROQUE, A.L.R.; TEIXEIRA, M.M.G.; JANSEN, A.M. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **JP: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171–181, 2019.

RODRÍGUEZ-MONGUÍ, E.; CANTILLO-BARRAZA, O.; PRIETO-ALVARADO, F.E.; CUCUNUBÁ, Z.M. Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* infection rates in vectors and animal reservoirs in Colombia: a systematic review and meta-analysis, **Parasites Vectors**, v. 12, n. 308, p. 1-19, 2019.

ROQUE, A.L.R.; JASEN, AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C., org. **Vetores da doença de chagas no Brasil [online]**. Curitiba: **Sociedade Brasileira de Zoologia**, 2014, pp. 75-87.

SANGENIS, L.H.; SARAIVA, R.M.; GEORG, I.; CASTRO, L.; SANTOS LIMA, V.; ROQUE, A.L. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study, **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n.4, 2015.

SANTOS, F.M.; MACEDO, G.C.; BARRETO, W.T.G.; Oliveira-SANTOS, L. G. R.O.; Garcia, C.M.; MOURÃO, G. M.; Porfírio, G.E. O.; MARINO, E. D.; ANDRE, M.R.; PERLES, L.; OLIVEIRA, C.E.; ANDRADE, G.B.;, JANSEN, A.M.; HERRERA, H.M. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal, **Plos one**, v. 10, p. 1-15, 2015.

SANTOSA, F.M.; BARRETO, W.T.G.; DE MACEDO, G.C.; BARROSE, J.H.S.; XAVIER, S.C.C.; GARCIA, C.M.; MOURÃO, G.; DE OLIVEIRA, J.; RIMOLDI, A.R.; PORFÍRIO,

G.E.O.; ANDRADE, G.B.; PERLESG, L.; ANDRÉ, M.R.; JANSEN, A.M.; HERRERA, H.M. The reservoir system for *Trypanosoma* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) species in large neotropical wetland, **Acta Tropica**, v.199, p. 1-7, 2019.

TRUEB, I.; PORTELA, R.D.; FRANKE, C.R.; CARNEIRO, I.O.; RIBEIRO JR. G.J.; SOARES, R.P.; BORROUIN-MELO, S.M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp infection in wildlife from urban rain forest fragments in northeast Brazil, **Journal of wildlife diseases**, v. 54, n.1, p. 76-84, 2018.

VAZ, V.C. D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*, **Parasitology**, v. 134, p. 1785-1793, 2007.

WHO. Control de la enfermedad de Chagas: Segundo informe del comité de Expertos OMS. Geneva: **World Health Organization**, p. 117, 2012.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal Parasitology**, v.35,n.2, p. 225-233, 2005.

XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A. L.R.; BILAC, D.; DE ARAÚJO, V.A.L.; DA COSTA NETO, S.F.; LOROSA, E.S.; DA SILVA, L.F.C.F.; JANSEN, A.M. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.5, p.1-9, 2014.

ZETUN, C. B.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 139-147, 2014.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B.; MICHAEL, A.; MILES, B.; CAMPBELL, D. A.C. TIBAYRENC, M.D.; MACEDO, A.M. E.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. A. G.; LLEWELLYN, M.S.B.; Lages-Silva, E H.; MACHADO C.R E.; ANDRADE, S.G. I.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12. P.240-253, 2012.

CAPÍTULO 2 – Ocorrência de *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres oriundos da Mata Atlântica - Bahia.

Ocorrência de *Trypanosoma* ssp. em mamíferos silvestres oriundos da Mata Atlântica- Bahia¹

authors ... DE ALMEIDA, Patrícia Hercília Arcaño^{1*}; da SILVA, Aristeu Vieira^{2**};

1 – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos. Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil.

2 – Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

*Bolsista de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia - FAPESB; **Bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Resumo

A doença de Chagas (ou Tripanossomíase americana) é uma zoonose de caráter crônico, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esse parasito pode infectar diversas ordens de mamíferos. Embora a diversidade de roedores e marsupiais na Mata Atlântica da Bahia tenha sido bem estudada, no entanto, pouco se sabe sobre a presença de *Trypanosoma* ssp. e o papel dos roedores e marsupiais na manutenção desse parasito nesta região. Além disso, muitas pessoas são atraídas pelas regiões litorâneas e por áreas preservadas do estado, o que reforça a importância de estudar parasitos que podem potencialmente infectar seres humanos e animais domésticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Trypanosoma* ssp. em mamíferos silvestres oriundos do litoral sul baiano, utilizando a técnica de *nested*-PCR-kDNA no diagnóstico molecular do protozoário. Os órgãos (encéfalo, coração, baço, fígado e rins) de animais coletados nos municípios estudados foram processados com posterior extração de DNA utilizando kit comercial, seguido de *nested*-PCR para amplificação de sequências de kDNA com uso dos iniciadores S17 e S18. Dos 153 mamíferos silvestres identificados na ordem Didelphimorphia e Rodentia, foram examinados exemplares de seis e treze espécies de cada ordem, respectivamente. Um *Didelphis aurita* apresentou amplificação de DNA compatível com *Trypanosoma* ssp, correspondendo a 0,65% das amostras examinadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma* ssp; Mamíferos silvestres; PCR – kDNA; Mata Atlântica.

Abstract

Chagas disease (or American trypanosomiasis) is a chronic zoonosis, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This parasite can infect several orders of mammals. Although the diversity of rodents and marsupials in the Atlantic Forest of Bahia has been well studied, however, little is known about the presence of *Trypanosoma* ssp. and the role of rodents and marsupials in maintaining this parasite in this region. In addition, many people are attracted to coastal regions and preserved areas of the state, which reinforces the importance of studying parasites that can potentially infect humans and domestic animals. Thus, the aim of this work was to investigate the presence of *Trypanosoma* ssp. in wild mammals from the south coast of Bahia, using the *nested*-PCR-kDNA technique in the molecular diagnosis of the protozoan. The organs (brain, heart, spleen, liver and kidneys) of animals collected in the studied cities

¹ Estudo realizado como parte do Projeto Pesquisa Agentes Zoonóticos em Animais Silvestres e vetores associados no Estado da Bahia financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB (Edital- FAPESB- Pedido n° 8259/2014- Termo de Outorga PNE 0001/2014).

were processed with subsequent DNA extraction using commercial kit, followed by nested-PCR for amplification of kDNA sequences using primers S17 and S18. Of the 153 wild mammals identified in the order Didelphimorphia and Rodentia, specimens of six and thirteen species of each order, respectively, were examined. A *Didelphis aurita* showed amplification of DNA compatible with *Trypanosoma* ssp, corresponding to 0.65% of the samples examined.

KEY-WORDS: *Trypanosoma cruzi*; Wild Mammals; Atlantic Forest.

Introdução

Os ecossistemas vêm sendo afetados devido à expansão dos centros e o uso de áreas naturais para agricultura ou pecuária (GRISOTTI, 2010). Essas alterações ecológicas criam desequilíbrios nos ciclos parasito-vida silvestre atingindo humanos em áreas próximas a fragmentos florestais (EPSTEIN e PRICE, 2009). Dessa forma, os mamíferos silvestres podem desempenhar um papel importante na transmissão de zoonoses, mantendo os ciclos de transmissão de parasitos (DE ALMEIDA CURI et al., 2014).

Dentre os parasitos, o *T. cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), pode infectar uma variedade de hospedeiros, possuindo um ciclo de transmissão enzoótica constituído por vetores, humanos, animais domésticos e silvestres.

Mamíferos silvestres das ordens Rodentia e Didelphimorphia são reservatórios de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos. Esses animais possuem uma ampla abundância populacional, alta mobilidade e sinantropismo, assim, esses mamíferos possui um papel importante na distribuição de diversas espécies de patógenos (DE OLIVEIRA et al. 2010; HAMILTON et al. 2012; BROOK e DOBSON 2015; DA COSTA et al. 2015). O ciclo de transmissão do *T. cruzi* em mamíferos silvestres envolvem interações ecológicas altamente complexas, sendo necessária a realização de estudos que avaliem sua dinâmica no conceito de “One Health” que envolvem os seres humanos, animais domésticos, animais silvestres e o ambiente que eles vivem (THOMPSON 2013; PINAZO e GASCON, 2015).

A Mata Atlântica é o segundo maior bioma brasileiro possuindo altos níveis de diversidade de espécies mesmo sofrendo severa fragmentação. Embora a diversidade de roedores e marsupiais na Mata Atlântica da Bahia tenha sido bem estudada, no entanto, pouco se sabe sobre a presença de *Trypanosoma cruzi* e o papel dos roedores e marsupiais na manutenção desse parasito nesta região. Além disso, muitas pessoas são atraídas pelas regiões litorâneas e por áreas preservadas do estado, o que reforça a importância de estudar parasitos que podem potencialmente infectar seres humanos e animais domésticos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Trypanosoma* ssp. em mamíferos silvestres oriundos do litoral sul baiano na Mata Atlântica na Bahia, utilizando a técnica de PCR-kDNA no diagnóstico molecular do protozoário.

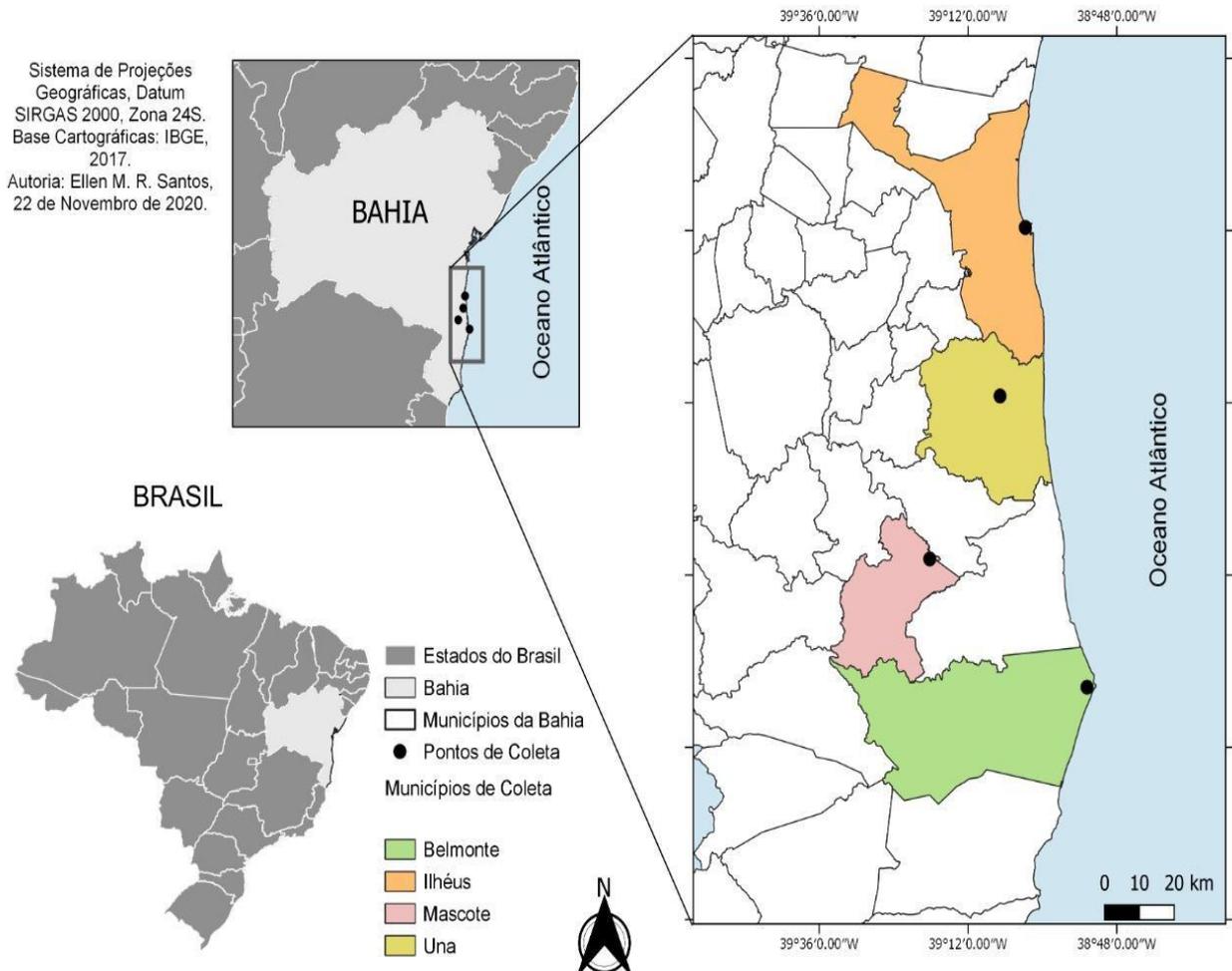
Material e Método

Área de estudo

As coletas foram realizadas na Mata Atlântica no estado da Bahia na região denominada Costa do Cacau, compreendendo uma faixa litorânea de aproximadamente 164 km de extensão, inserida nos municípios de Una (15°11'2.400"O; 39°6'49.446"S), Ilhéus (14°47'34.595"O; 39°2'45.625"O), Mascote (15°33'46.001"O; 39°18'10.001") e Belmonte (15°51'38.160"O; 38°52'47.636"), conforme apresentado Figura 3.

O clima da região é tropical sem estação seca (Azevedo 1972). A média das temperaturas máximas é superior a 24° C e a média das mínimas é de 21° C. Os meses mais quentes são de novembro a março e, os mais amenos, de julho e agosto. No trimestre mais chuvoso, de março a maio, a região apresenta em média um índice pluviométrico de 200 mm/mês, (CEPLAB, 1979). No geral, o índice pluviométrico é superior a 2000 mm/ano e a umidade relativa do ar fica acima de 60% (SEI, 1999b).

Figura 2. Localização dos municípios do Estado da Bahia onde foram coletadas amostras dos mamíferos silvestres: Belmonte (verde); Ilhéus (Laranja); Mascote (Rosa); Una (amarela).



Fonte: Santos (2020).

Captura e Coleta

Para captura dos animais foram utilizadas armadilhas de captura viva dos tipos Sherman (23 a 8 por 9 cm) e tipo Tomahawk (50 a 17 por 17 cm) e armadilhas de interceptação-e-queda (*pitfall*). As armadilhas eram iscadas com uma mistura de fubá, banana, aveia, paçoca e óleo de fígado de bacalhau onde foram monitoradas diariamente.

Para os municípios estudados, houve três sessões de captura entre junho de 2015 e dezembro de 2016, sendo cada período composto por 10 noites consecutivas, totalizando um esforço de captura de 13.020 armadilhas em todo sítio de captura, durante todo o período de estudo.

Para cada espécie coletada foi retirado um casal testemunho, onde foram colhidas as amostras dos órgãos e tecidos. A eutanásia foi realizada a partir da administração de quetamina e xilazina baseado na dose que promoveu a anestesia e posteriormente a morte dos animais, obedecendo aos procedimentos sugeridos pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). Aquelas fêmeas grávidas e em período de lactação não foram coletadas, bem como os jovens também foram evitados ao máximo.

Aspectos éticos

Os procedimentos para a coleta dos exemplares foram realizados seguidos os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Esta pesquisa se enquadrou ao projeto “Pequenos mamíferos não-voadores do Sul da Bahia: conhecendo a mastofauna baiana”, aprovado pelo CEUA-UESC (Processo Nº 003/2013) e Licença ICMBio 17131-4².

Processamento das amostras

O *pool* de órgãos (coração, encéfalo, pulmão, fígado, baço, a depender da disponibilidade destes) teve a massa determinada em balança analítica. Na proporção 1:5, foi adicionado tampão fosfato salino (PBS). As amostras juntamente com o PBS foram maceradas com auxílio do cadinho e pistilo, a suspensão de tecidos obtida foi colocada em tubo Falcon de 15 ml, centrifugadas por 1200 g por dois a cinco minutos, reservando-se 1 ml do sobrenadante para outros estudos. Em seguida, ressuspendeu o sedimento por agitação em vórtex, alíquotando-se volumes de 1,5 ml em microtubos de polietileno em triplicata no congelador a -20°C.

Análise molecular do material biológico

As amostras tiveram o DNA extraído usando o kit comercial *PureLink® Genomic DNA*, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração cada amostra foi armazenada a -20°C até a realização dos procedimentos de PCR. A concentração e a pureza do DNA foram calculadas em equipamento *Nanodrop®* (RIVERA et al., 2015).

² As licenças e autorizações citadas encontram-se na seção Anexos

Para a análise molecular foi realizada uma *nested PCR SSU rRNA*. Primeiramente foi realizada uma amplificação de 520 bp com os *primers* S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC-3') e S12 (5'-GGT TGA 36 TTC CGT CAA CGG AC-3') (ULIANA et al., 1994). A reação da amplificação foi realizada em um volume final de 20µl, contendo 10µl do Super Mix (*Invitrogen*TM), 1µl de cada *primer*, 6µl de água *Mili-Q* e 2µl de DNA. Foram incluídos controles positivos de *T. cruzi* e branco (amostra sem DNA). As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler*TM e seguiram o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por um minuto, 58°C por um minuto, 72°C por um minuto; e uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Em seguida, 3µl do produto adquirido foi reamplificado em um seguimento de 480 bp com os primers S17 (5'-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3') e S18 (5'-TCG GGC GGA TAA AAC CC-3') (ULIANA et al., 1991). As mesmas condições das reações e ciclo foram mantidas na *nested PCR*. Foram utilizados o mesmo controle negativo e controle positivo.

Alíquotas de 4,0 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 3,0 µL de solução de azul de bromofenol e 1,0 µL de gel red e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 2 % em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A corrida foi realizada a 120 voltz por 50 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema digital L-Pix image (versão 1.21) Loccus Biotecnologia.

A frequência relativa de resultados positivos à PCR foi calculada a partir do total de amostras examinadas, independente da ordem, gênero ou espécie avaliada.

Resultados e Discussão

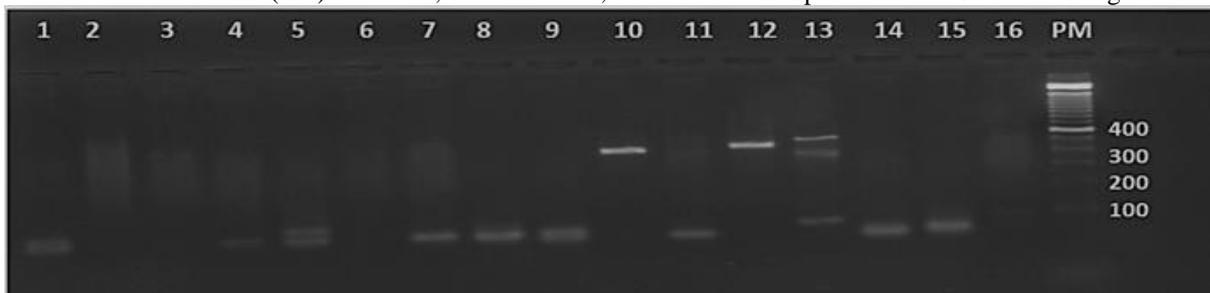
A análise molecular foi realizada para investigação de *Trypanosoma* ssp. em tecidos de diferentes órgãos (encéfalo, coração, pulmão, baço ou/e fígado) de 153 mamíferos silvestres identificados, sendo seis espécies da ordem Didelphimorfia e treze espécies da ordem Rodentia (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos mamíferos silvestres segundo a ordem, gênero e espécies capturados e examinados para infecção de *Trypanosoma cruzi*, nos municípios de Belmonte, Ilhéus, Una e Mascote na Bahia, Brasil, 2020.

Reservatórios	Número de animais
Didelphimorfia	
<i>Marmosops incanus</i>	4
<i>Didelphis aurita</i>	1
<i>Marmosa murina</i>	14
<i>Monodelphis americana</i>	3
<i>Marmosa demerarae</i>	1
<i>Monodelphis sp</i>	3
Total	26
Rodentia	
<i>Akodon cursor</i>	9
<i>Nectomys squamipes</i>	1
<i>Hylaeamys laticeps</i>	61
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	19
<i>Thaptomys nigrita</i>	7
<i>Rattus rattus</i>	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	7
<i>Necomys lasiurus</i>	9
<i>Oecomys Catherine</i>	2
<i>Trichomys sp</i>	1
<i>Blarinomys breviceps</i>	1
<i>Euryoryzomys sp.</i>	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	8
Total	127
Total de mamíferos	153

A amostra de *Didelphis aurita* examinada apresentou amplificação compatível para *T. cruzi* (Figura 4), representando a única amostra positiva. Dessa forma, a frequência geral de infecção por *Trypanosoma ssp.* em mamíferos silvestres foi baixa (0,65%).

Figura 3. Imagem do gel de agarose corado com Bioed da nested PCR para a amplificação de 480 bp da região minicírculo KDNA utilizando os primers S17 e S18 a partir de órgãos de mamíferos silvestres. (PM) marcador; 1-11 amostras; 12 e 13 controles positivos 14-16 controles negativos.



Fonte: Próprio autor.

A taxa de infecção que encontramos foi relativamente baixa (0,65%) considerando-se a totalidade de espécies examinadas. Na Mata Atlântica e na Amazônia os gêneros *Didelphis* spp. *Philander* spp., apresentaram altas taxas de hemoculturas positivas. Além disso, no semi-árido do Nordeste o gênero *Didelphis* spp. atua como um importante reservatório para *T. cruzi*

(JASEN et al., 2018). Em outros trabalhos foram relatadas taxas de infecção entre 19% a 92% para o gênero *Didelphis* spp. estudados em diferentes regiões da América do Sul e Central (SCHWEIGMANN et al., 1999; RAMIREZ et al., 2002).

Em uma análise realizada em Navegantes, Santa Catarina, que apresenta a Mata Atlântica como bioma predominante, *Didelphis* spp. foi o principal reservatório de *T. cruzi*, com 93% dos 14 animais estudados positivos (ROQUE et al., 2008).

O gênero *Didelphis* tem um papel significativo como reservatório de *T. cruzi*. Essa espécie de marsupial é comumente encontrada infectada por esse parasito em virtude das suas características como: sinantropismo, viver em forros de casas e outros abrigos do domicílio e peridomicílio, e sobrevivendo de restos alimentares do ser humano (JASEN, 2015; OLIFIERS et al., 2005). Além disso, essa espécie de gambá possui parasitemia de longa duração para *T. cruzi*, assim, essa espécie se torna um importante elo de transmissão de *T. cruzi* entre os ciclos silvestres e peridomésticos, mesmo em regiões onde colônias de triatomíneos são incomuns (DIOTAIUTI et al., 1995; RAMIREZ et al., 2002).

No presente trabalho não houve infecção de *T. cruzi* nos roedores avaliados. Um cenário semelhante ocorreu em outros biomas brasileiros, onde houve baixas taxas gerais de infecção por esse parasito. Essa baixa taxa de positividade foi notável no Cerrado com 3,7% dos testes sorológicos e 0,7% de hemocultura positivas e na Mata Atlântica, com 0,35%. (JANSEN et al., 2018). De acordo com esses autores, existem duas hipóteses para baixa frequência de *T. cruzi* em roedores silvestres: os animais infectados não resistem à infecção e morre; ou os roedores não estão expostos à infecção nas regiões do Cerrado. Esses achados foram semelhantes no que foi observado no Pantanal (RADEMAKER et al., 2009), sugerindo que os roedores desempenham um papel secundário no ciclo de transmissão de *T. cruzi* em comparação com outras espécies de mamíferos silvestres (JASEN et al., 2018).

Em um estudo com 65 animais silvestres provenientes de fragmento de floresta urbana na Bahia, sendo 58% de marsupiais (38/65), 34% (22/65) de *Didelphis* e 25% (16/65) de *Micoureus*, a infecção foi detectada por PCR. Oito animais foram positivos, representados por apenas um gênero: *Didelphis* sp. 12% (8/65) os outros animais estudados foram negativos para a presença de *T. cruzi*. A presença de *T. cruzi* em *Didelphis* capturados em fragmentos de floresta urbana reforça a ideia que este parasito esteja circulando entre vetores e mamíferos silvestres em fragmentos de floresta no interior da cidade de Salvador (TRUEB et al.,2015).

Na mata Atlântica, na cidade Maringá no estado do Paraná, em uma área considerada endêmica para doença de Chagas, verificou-se um distinto cenário enzoótico, em que os marsupiais (*Didelphis albiventris*) foram à espécie mais infectada 12 (100%), em comparação /com os morcegos (*Artibeus lituralis*) 10 (40%). Todas as infecções em *Didelphis* era pela linhagem do Tipo TcII, pertencente ao ciclo silvestre (DRONZINO et al., 2019).

Sabe-se que, o ciclo de transmissão silvestre é muito mais complexo do que o assumido até o momento. Em diferentes ecótopos uma variedade de tripanosomatídeos podem infectar mamíferos silvestres e vetores. Consequentemente, as taxas de infecções são determinadas por diversos fatores, tais como a presença de vetores infectados e reprodução dos triatomíneos, condições que sofrem a influência de características ambientais (ZETUN et al., 2014).

O ensaio molecular por PCR para detecção da presença de DNA de *T. cruzi*, além de mais sensível, tem se mostrado específico para este parasito. O kDNA é considerado como um alvo bastante eficaz para a detecção de DNA de *T. cruzi* através da PCR tanto em sangue como em tecido (ANDRADE et al, 2002). Em diversos estudos experimentais têm sido utilizado o PCR-kDNA, tanto para comprovar a infecção quanto para monitorar a cura dos animais tratados devido a sua alta sensibilidade e especificidade para *T. cruzi* (TESTON et al. 2013, MARGIOTO et al. 2016, ZANUSSO JUNIOR et al. 2018)

Esse marcador possui uma alta sensibilidade e especificidade para *T. cruzi*, no entanto, seu uso é limitado ao gênero *Trypanosoma*, quando aplicado à detecção do parasito de mamíferos silvestres (DRONZINO et al., 2019), pois esses animais estão expostos a uma ampla variedade de *Trypanosoma* spp., sendo que muitos ainda não foram catalogados ou mesmo descobertos (LOPES et al., 2018).

O PCR-kDNA é uma técnica de baixo custo e requer uma pequena quantidade de tecidos. Dessa forma, essa técnica tem se mostrado de grande importância no monitoramento da infecção permitindo que estratégias de isolamento mais eficientes sejam usadas em locais onde há ciclos ativos de *Trypanosoma* spp. (DRONZINO et al., 2019).

Conclusão

Entre os roedores e marsupiais avaliados, DNA compatível com *T. cruzi* foi obtido do único *Didelphis aurita* examinado.

Referências

- BROOK C.E.; DOBSON A. P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in Microbiology**, v.23, p.172-180, 2015.
- DA COSTA, A.P.; COSTA, F.B., SOARES, H.S.; RAMIREZ, D.G.; MESQUITA, E.T.K.C.; GENNARI, S.M. MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* chagasi Infection in Wild mammals from Maranhão, State, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n,11, p. 656-66,2015.
- DE ALMEIDA CURI, N.H.C.; DE OLIVEIRA, P.A.M.; MASSARA, R.L., MARCELINO, A.P.; RIBEIRO, A.A.; PASSAMANI A, M., DEMÉTRIO, G.R.; CHIARELLO, A.G. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic forest fragments, **Plos One**, v.9, p-1-10,2014.
- DE OLIVEIRA, M.L.; FERREIRA, R.M.; GOMES, M. P. Estudo populacional de gambá's, *Didelphis albiventris* (Mammalia, Didelphidae), em um pequeno fragmento florestal. **Mastozoologia Neotropical**, v.17, p.5.-18,2010.
- DIOTAIUTI, A, S.; PEREIRA, C. F; LOIOLA, A.J.; FERNANDES, J.C.; SCHOFIELD, J.P.; DUJARDIN, J.C.P.; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in áreas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.9, p.443-448,1995.
- DROZINO, R.N.; OTOMURA, F. H.; GAZARINI, J.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O. *Trypanosoma* Found in Synanthropic Mammals from Urban Forests of Parana Southern Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v.20, n.20,2019.
- EPSTEIN, J.H.; PRICE, J.T. The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals, **Mount Sinai Journal of Medicine**, v.76, p.448-455, 2009.
- GRISOTTI, M., Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões **Ciência e Saúde Coletiva**, v.15, p.1095-1104, 2010.
- HAMILTON, P.B.; TEXEIRA, M.M.G.; STEVENS, J.R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the ‘bat seeding’ hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 28: p-136-141, 2012.
- JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Tropica**, v. 151p. 1-15, 2015.
- JANSEN, A.M.; DAS CHAGAS XAVIER, S.C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites Vectors**, v. 11, p. 502, 2018.
- LOPES, C.M.T. MENNA-BARRETO, R.F.S. PAVAN, M.G.; PEREIRA, M.C. S, ROQUE, A.L.R. *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.

MARGIOTO TESTON, A.P.; PAULA DE ABREU, A.; GRUENDLING, A.P.; BAHIA M.T. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v.166, p.44–50, 2016.

OLIFIERS, N.; GENTILE, R.; FISZON, J. T. Relação entre a composição de espécies de pequenos mamíferos e as variáveis antrópicas na Floresta Atlântica Brasileira, **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n.3, p.495-501,2005.

PINAZO, M. J.; GASCON J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Tropica**,v.151, 2015.

RADEMAKER, V.; HERRERA, H.M. RAFFEL, T.R.; D'ANDREA, P.S.; FREITAS, T.P.; ABREU, U.G. What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. **Acta Tropica**, v. 111, p.102–107, 2009.

RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA E.; ALVARENGA-FRANCO F.; MATOS A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES B. Abstract high prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, p.189-198,2002

RIVERA, M. G.; HERRERA, L.; MOROCOIMA, A.; AGUILAR, C. M.; GÁRATE, T.; LÓPEZ, M.; LARES, M.; VIETTRI, M.; FERRER, E. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* TcI isolates from rural and urban areas of Venezuela. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 52, n. 1, p. 23, 2015.

ROQUE, A.L.R.; XAVIER, S.C.C.; ROCHA, M.G.; DUARTE, A.C.; D'ANDREA, P.S.; Jansen, A. M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.742–749, 2008.

STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular Biochemical Parasitology**. v. 33 , n.3, p. 205-214, 1989.

TESTON, A.P.; MONTEIRO, W.M. REIS, D.; BOSSOLANI, G.D.; In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Tropical Medicine International Health**; v.18, p. 85–95,2013

THOMPSON RC. Parasite zoonoses and wildlife: One Health, spillover and human activity. **Internacional Journal Parasitology**, v. 43, p.1079–1088, 2013.

TRUEB, I.;PORTELA, R.D.; FRANKE, C.R.CARNEIRO, I.O.; RIBEIRO JR. G.J.; SOARES, R.P.; BORROUIN-MELO, S.M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp infection in wildlife from urban rain forest fragments in northeast Brazil, **Jounal of wildlife diaseases**, v. 54, n.1, p. 76-84, 2018.

ULIANA, S.R.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, p. 324–330,1994.

ZANUSSO JUNIOR, G.; MASSAGO, M. KIAN D.;TOLEDO, M. J.O.. Efficacy of essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with *Trypanosoma cruzi* IV. **Experimental Parasitology**, v.185,p. 92–97,2018.

ZETUN, C. B.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 139-147, 2014.

CAPÍTULO 3 – Protozoários em amostras de tecidos de roedores e marsupiais e da Mata Atlântica-Bahia

Protozoários em amostras de tecidos de roedores, marsupiais e morcegos da Mata Atlântica-Bahia

authors ...

ALMEIDA, Patrícia Hercília Arcanjo^{1*}; da SILVA, Aristeu Vieira^{2**}; NUNES, Márcio Roberto Teixeira³; CARDOSO, Jedson Ferreira³; LEMOS, Poliana da Silva³

1 – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos. Avenida Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil.

2 – Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana. Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

*Bolsista de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia - FAPESB; **Bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

3- Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.

Resumo

A Mata Atlântica possui uma grande riqueza de espécies endêmicas, e as intensas mudanças ambientais exercem uma forte influência na propagação e no surgimento de zoonoses em mamíferos silvestres neste bioma. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar por sequenciamento de segunda geração (NGS), a infecção natural por protozoários em mamíferos silvestres em quatro municípios do Estado da Bahia. A detecção dos parasitos foi realizada a partir de amostras de tecidos de mamíferos silvestres da ordem Rodentia e Didelphimorphia em que foi selecionado um conjunto de órgãos de cada animal (contendo coração, encéfalo, pulmão, fígado e/ou baço) que foi macerado e armazenado a -20°C. A partir da composição de cada amostra presente desses animais, foram retiradas as suspensões de tecidos que compuseram *pools* de até 25 amostras, agrupadas considerando as espécies de mamíferos e o seu local de origem: Una, Ilhéus, Belmonte e Mascote, resultando num total de 15 *pools*. Os *pools* obtidos foram sequenciados na Plataforma *Ion Torrent*, sendo detectados *Plasmodium berghei* e *P. yeolli yeolli* em roedores (*Hylaeamys laticeps* e *Thaptomys nigrita*) e marsupiais (*Marmosa murina*) e *Besnoitia besnoiti* em marsupiais (*Marmosa demerarae*) e roedores (*Akodon cursor*). Nesse estudo, não houve associação entre a espécie de protozoário detectado e o município de origem da amostra, bem como a espécie de mamífero e a ordem. Trata-se do primeiro relato da detecção destes protozoários em pequenos mamíferos silvestres no Brasil.

Palavras-chaves: *Plasmodium*; *Besnoitia*; Sequenciamento de segunda geração (NGS), mamíferos silvestres.

Abstract

The Atlantic Forest has a great wealth of endemic species, and the intense environmental changes have a strong influence on the propagation and on the appearance of zoonoses in wild mammals in this biome. Thus, the objective of the present study was to evaluate by second generation sequencing (NGS), the natural infection by protozoa in wild mammals in four municipalities in the State of Bahia. The detection of the parasites was carried out using tissue samples from wild mammals of the order Rodentia and Didelphidia, in which a set of organs from each animal (containing heart, brain, lung, liver and / or spleen) was selected and macerated and stored. at -20°C. From the composition of each present sample of these animals, the suspensions of tissues that made up pools of up to 25 samples were removed, grouped considering the species of mammals and their place of origin: Una, Ilhéus, Belmonte and Mascote, resulting in a total of 15 pools. The pools obtained were sequenced on the Ion Torrent Platform, with *Plasmodium berghei* and *P. yeolli yeolli* being detected in rodents (*Hylaeamys laticeps* and *Thaptomys nigrata*) and marsupials (*Marmosa murina*) and *Besnoitia besnoiti* in marsupials (*Marmosa demerarae*) and rodents (*Akodon cursor*). In this study, there was no association between the species of protozoa detected and the municipality of origin of the sample, as well as the species of mammal and the order. This is the first report of the detection of these protozoa in small wild mammals in Brazil.

KEY-WORDS: *Plasmodium*; *Besnoitia*; Next Generation DNA Sequencing (NGS); Wild animals.

Introdução

A Mata Atlântica é um bioma de elevada biodiversidade (CÂMARA et al., 2005). Das 658 espécies de mamíferos encontrados no Brasil, 250 estão presentes na Mata Atlântica, sendo que 55 são encontrados exclusivamente neste bioma (REIS et al., 2006). Este bioma foi incluído no cenário mundial como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade (MYERS, 2000). Dentre os grupos de animais que ocupam a Mata Atlântica, tem-se um dos mais diversos que são os pequenos mamíferos não voadores, os quais possuem um papel de grande importância ecológica para este ecossistema.

A degradação de um ecossistema desempenha uma forte influência na difusão e no surgimento de doenças parasitárias, sendo estas zoonóticas ou não, onde tais mudanças, resultantes de ocorrências naturais ou desencadeadas por interferência humana, podem alterar o equilíbrio ecológico que por consequência pode elevar a ocorrência de agentes patogênicos nos vetores e em seus hospedeiros silvestres (LALLO et al., 2009).

Pequenos mamíferos não voadores foram implicados nos ciclos de transmissão de muitos patógenos transmitidos por vetores, incluindo os protozoários do filo Apicomplexa. Dessa forma, a caracterização das infecções por parasitos no ambiente silvestre e a compreensão dos padrões de prevalência podem revelar os riscos de doenças emergentes,

especialmente quando a um desequilíbrio ecológico como resultado da invasão humana nos habitats da vida selvagem (DASZAK et al., 2001; KEESING et al., 2010) e mudanças climáticas (DASZAK et al., 2000; BARRETT et al., 2013).

Os métodos tradicionais de identificação de parasitos a partir da sua morfologia e morfometria vêm sendo utilizado com frequência, porém este possui limitações a nível taxonômico (ANDERSON et al., 2009). Assim, visando adotar medidas mais eficazes vem sendo utilizadas técnicas moleculares capazes de proporcionar uma melhor identificação das espécies, como é o caso da utilização das técnicas de sequenciamento de segunda geração (NGS). Sendo assim, este trabalho teve por finalidade identificar pelo sequenciamento de última segunda geração os protozoários presentes em amostras de tecidos de pequenos mamíferos oriundos da Mata Atlântica da Bahia.

Material e Método

Área de Estudo

As coletas foram realizadas na Mata Atlântica no estado da Bahia na região denominada Costa do Cacau, compreendendo uma faixa litorânea de aproximadamente 164 km de extensão, inserida nos municípios de Una (15o11'2.400"O; 39o6'49.446"S), Ilhéus (14o47'34.595"O; 39o2'45.625"O), Mascote (15o33'46.001"O; 39o18'10.001") e Belmonte (15o51'38.160"O; 38o52'47.636"), conforme apresentado Figura 5.

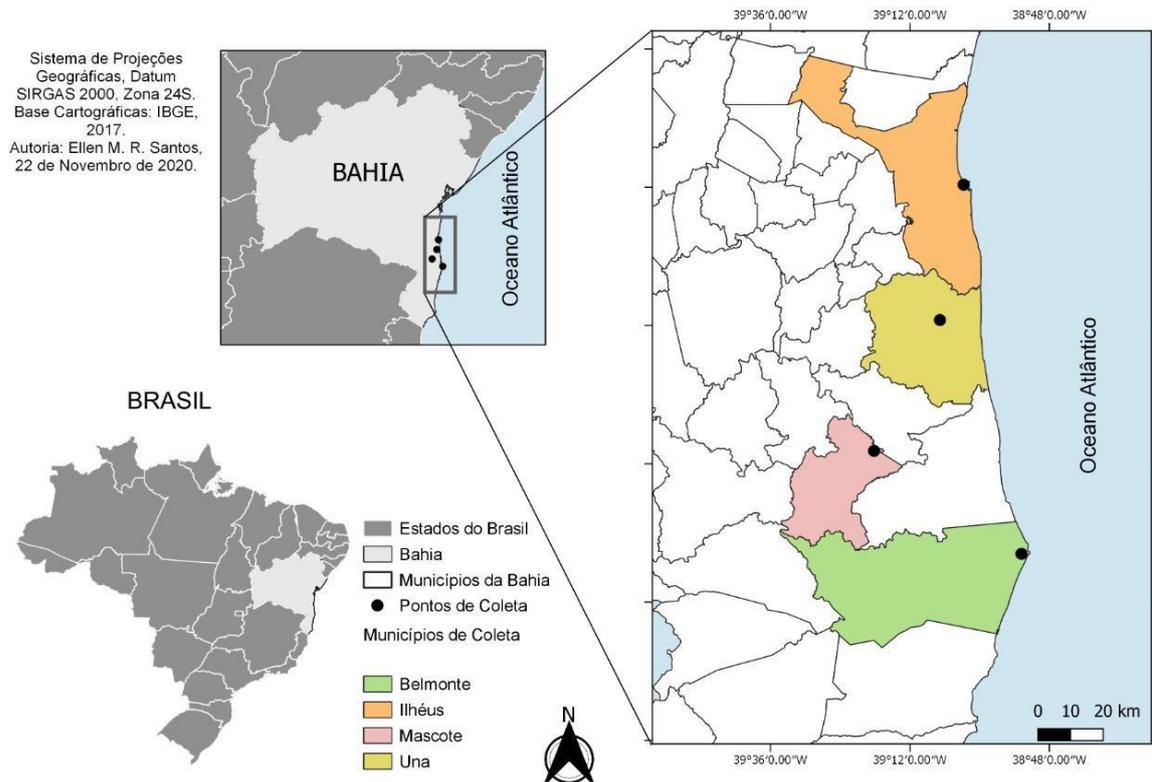


Figura 4. Localização dos municípios do Estado da Bahia onde foram coletadas amostras dos mamíferos silvestres: Belmonte (Verde); Ilhéus (laranja); Mascote (Rosa); Una (amarelo).

O clima da região é tropical sem estação seca (AZEVEDO, 1972). A média das temperaturas máximas é superior a 24° C e a média das mínimas é de 21° C. Os meses mais quentes são de novembro a março e, os mais amenos, de julho e agosto. No trimestre mais chuvoso, de março a maio, a região apresenta em média um índice pluviométrico de 200 mm/mês. No geral, o índice pluviométrico é superior a 2000 mm/ano e a umidade relativa do ar fica acima de 60% (SEI, 1999B).

Captura e Coleta

Para captura dos animais foram utilizadas armadilhas de captura viva dos tipos Sherman (23 a 8 por 9 cm) e tipo Tomahawk (50 a 17 por 17 cm) e armadilhas de interceptação-e-queda (*pitfall*). As armadilhas eram iscadas com uma mistura de fubá, banana, aveia, paçoca e óleo de fígado de bacalhau onde foram monitoradas diariamente.

Nos municípios estudados, houve três sessões de captura entre junho de 2015 e dezembro de 2016, sendo cada período composto por 10 noites consecutivas, totalizando um

esforço de captura de 13.020 armadilhas em todo sítio de captura, durante todo o período de estudo.

Para cada espécie coletada foi retirado um casal testemunho, onde foram colhidas as amostras dos órgãos e tecidos. A eutanásia foi realizada a partir da administração de quetamina e xilazina baseado na dose que promoveu a anestesia e posteriormente a morte dos animais, obedecendo aos procedimentos sugeridos pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). Aquelas fêmeas grávidas e em período de lactação não foram coletadas, bem como os jovens também foram evitados ao máximo.

Os procedimentos para a coleta dos exemplares foram realizados seguidos os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Esta pesquisa se enquadrou ao projeto “Pequenos mamíferos não-voadores do Sul da Bahia: conhecendo a mastofauna baiana”, aprovado pelo CEUA-UESC (Processo N^o 003/2013) e Licença ICMBio 17131-4³ (ANEXO B).

O *pool* de órgãos (coração, encéfalo, pulmão, fígado, baço, a depender da disponibilidade destes) teve a massa determinada em balança analítica. Na proporção 1:5, foi adicionado tampão fosfato salino (PBS). As amostras juntamente com o PBS foram maceradas com auxílio do cadinho e pistilo, a suspensão de tecidos obtida foi colocada em tubo Falcon de 15 ml, centrifugadas por 1200 g por dois a cinco minutos, reservando-se 1 ml do sobrenadante para outros estudos. Em seguida, ressuspendeu o sedimento por agitação em vórtex, aliquotando-se volumes de 1,5 ml em microtubos de polietileno em triplicata no congelador a -20°C.

Extração do DNA total

O DNA foi extraído a partir de 180 mg de tecido animal. O tecido foi macerado (lise mecânica) no equipamento *TissueLyser II (Qiagen)*. A seguir as amostras foram incubadas por três horas a 55°C. Por fim, o lisado foi aliquotado e o DNA extraído de forma automatizada no equipamento *iPrep™ Purification Instrument - Thermo Fisher Scientific*. Foi utilizado o *iPrep ChargeSwitch gDNA Tissue Kit - Thermo Fisher Scientific*, para extração de DNA total, conforme as recomendações do fabricante, com quantificação do DNA extraído no *Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher)*.

³ As licenças e autorizações citadas encontram-se na seção Anexos

Sequenciamento na Plataforma ION Torrent PGM

Para a plataforma *Ion Torrent PGM (ThermoFisher Scientific)* foram construídas bibliotecas genômicas de 200 pb pelo kit *IonXpress™ Plus Fragment Library Kit* e do equipamento *AB libraryBuilder System (ThermoFisher Scientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a construção das bibliotecas, as amostras foram amplificadas por PCR em emulsão, no equipamento *Ion One Touch (ThermoFisher Scientific)* e o sequenciamento foi realizado com o *Kit Ion 318TM Chip Kit v2*.

Bioinformática

Após o sequenciamento foram realizadas as montagens dos fragmentos, ou seja, determinada a ordem exata dos nucleotídeos do genoma a ser trabalhado. Para isso, a partir das leituras resultantes foi realizado o método *De Novo*, usando algoritmos *IDBA-UD v.1.1.3* (PENG et al., 2012), para se obter a formação dos *contigs* e *supercontigs*.

O resultado obtido nas montagens dos *contigs* foram comparados através da ferramenta *Blastx* implementado no *Diamond v.0.9.24* (BUCHFINK et al., 2015), contra o banco de dados de sequencias de proteína curadas e que fornecem um elevado nível de anotação tais como a descrição da função de uma proteína, a sua estrutura de domínio, as modificações pós-traducionais, onde foi considerado um valor estatístico (Valor de P) de 0,0001 (KERFELD, SCOTT, 2011).

Análises Estatísticas

A associação entre o resultado do sequenciamento (espécie de protozoário) e a ordem, espécie e local de coleta dos mamíferos foi verificada pelos testes Exato de Fischer ou G de Williams, no programa EpiInfo (DEAN et al, 2011) considerando-se significativos aquelas associações com Valor de P < 0,05 e tendência a associação quando o valor de P < 0,10.

Resultados

Coleta de mamíferos e composição dos pools de amostras de tecidos

Amostras de tecidos de 159 pequenos mamíferos, organizados em 15 *pools*, foram avaliadas. No município de Una foram avaliados seis *pools*, cinco *pools* em Belmonte. Para Ilhéus e Mascote, foram avaliados *dois* pools de tecidos, conforme resumido na Tabela 4.

Tabela 4. Composição dos *pools* de amostras de tecidos de mamíferos selvagens segundo o número de amostras, a ordem e espécie do mamífero e a localidade de coleta. Feira de Santana, 2020.

Identificação do <i>pool</i>	Número de Amostras	Ordem	Espécie	Município
PI01	8	Didelphimorphia	<i>Marmosa demerarae</i>	Una
PI02	6	Didelphimorphia	<i>Marmosa murina</i>	Belmonte
PI03	19	Didelphimorphia	<i>Marmosa murina</i>	Una
PI04	9	Rodentia	<i>Hylaeamys laticeps</i>	Belmonte
PI05	17	Rodentia	<i>Hylaeamys laticeps</i>	Belmonte
PI06	26	Rodentia	<i>Hylaeamys laticeps</i>	Una
PI07	5	Didelphimorphia	<i>Didelphis aurita</i>	Una
PI08	5	Didelphimorphia	<i>Gracilinanus agilis</i>	Belmonte
PI09	5	Didelphimorphia	<i>Marmosa sp.</i>	Belmonte
PI10	10	Rodentia	<i>Hylaeamys laticeps</i>	Ilhéus
PI11	8	Didelphimorphia	<i>Marmosa murina</i>	Ilhéus
PI12	18	Rodentia	<i>Akodon cursor</i>	Una
PI13	13	Rodentia	<i>Hylaeamys laticeps</i>	Una
PI14	05	Rodentia	<i>Thaptomys nigrita</i>	Mascote
PI15	05	Rodentia	<i>Thaptomys nigrita</i>	Mascote

Sequenciamento do DNA mitocondrial de protozoários

Após as etapas de montagem, extensão e verificação de erros de montagem, foram gerados *contigs* totais para os quinze *pools* de amostras de Ilhéus, Una, Mascote e Belmonte, onde 43 *contigs* tiveram *matches* com sequências de DNA mitocondrial de espécies de parasitos depositadas no banco de proteínas não redundantes do NCBI. Ao total, nos quatro municípios, foram identificados *contigs* com *matches* pertencentes a três espécies de protozoários diferentes (Tabela 5).

Tabela 5. Espécie de protozoário sequenciado, número de contigs distribuídos por cada espécie de parasito detectado, número total de contigs por amostra e o número de acesso no Blastx, oriundos do litoral Sul da Bahia, 2020

Identificação do <i>pool</i> de amostras positivas	Espécie de mamífero	Protozoário sequenciado	Nº de contigs	Nº total de contigs	Nº de acesso no Blastx
PI02	<i>Marmosa demerarae</i>	<i>Besnoitia besnotii</i>	3	768	XP_029214942.1
PI06	<i>Hylaeamys laticeps</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	2	1717	BW38363.1
PI06	<i>Hylaeamys laticeps</i>	<i>Plasmodium yoelli yoelli</i>	2	1717	EAA20381.1
PI11	<i>Marmosa murina</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	2	1010	SW38361.1
PI11	<i>Marmosa murina</i>	<i>Plasmodium yoelli yoelli</i>	4	1010	EAA20381.1
PI12	<i>Akodon cursor</i>	<i>Besnoitia besnoiti</i>	6	4373	XP_029214941.1
PI15	<i>Thaptomys nigrita</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	2	861	SBW38362.1
PI15	<i>Thaptomys nigrita</i>	<i>Plasmodium yoelli yoelli</i>	2	861	EAA20175.1
PI09	<i>Marmosa sp.</i>	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	9	2587	SBW38362.1
PI09	<i>Marmosa sp.</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	4	2587	SBW38362.1
PI08	<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>Besnoitia Besnotii</i>	2	447	XP_029214941.1
PI13	<i>Hylaeamys laticeps</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	1	862	SBW38362.1
PI14	<i>Thaptomys nigrita</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	1	445	SBW38362.1
PI14	<i>Thaptomys nigrita</i>	<i>Plasmodium yoelii yoelli</i>	1	445	EAA19788.1

DISCUSSÃO

O presente estudo registra pela primeira vez a presença de parasitos do gênero *Plasmodium* e *Besnoitia* em pequenos mamíferos não voadores no Brasil. O gênero *Plasmodium* foi identificado em duas espécies de roedores (*Hylaeamys laticeps* e *Thaptomys nigrita*). Entre as espécies de *Plasmodium* que são capazes de infectar os roedores são: *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. vinckei* e *P. yoelii* (STEPHENS et al., 2012), duas espécies de *Plasmodium* foram identificadas neste estudo: *P. yoelli yoelii* e *P. berghei*. Esse gênero de parasito também foi detectado em uma espécie de marsupial (*Marmosa murina*), ainda não existem relatos na literatura sobre a infecção de *P. yoelli* e *P. berghei* nessa espécie de mamífero.

A malária é uma doença transmitida por mosquitos causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (DÉCHAMPS et al., 2010). Este gênero compreende muitas espécies que infectam uma grande variedade de grupos de vertebrados, incluindo pássaros, répteis e mamíferos (BOUNDENGA et al., 2016, 2017; YOTOKO E ELISEI, 2006). Em mamíferos,

além dos parasitos que infectam humanos, existem aqueles que infectam roedores (*Plasmodium Berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium yoelii*). O encontro desses parasitos em roedores pode ser utilizado para explorar muitos aspectos da biologia dos agentes da malária e suas interações com seus hospedeiros (LACRUE et al., 2011; STEPHENS et al., 2012).

As quatro espécies que infectam naturalmente roedores murídeos africanos são comumente utilizadas em estudos de vários aspectos da malária em laboratório (PERKINS; SARKAR; CARTER, 2007). Esses modelos murinos são a primeira opção quando são necessárias evidências in vivo preliminares no estudo da eficiência de drogas antimaláricas, respostas de candidatos à vacina, adaptações do ciclo de vida frente a desafios de medicamentos ou vacinas (CARLTON, et al., 2002).

Vários aspectos do mecanismo da malária grave ainda necessitam de esclarecimentos, e são objetos de intensos estudos em laboratório. Por exemplo, as evidências obtidas a respeito da fisiopatologia da malária cerebral, uma importante complicação com risco à vida que afeta principalmente crianças de dois a seis anos na África e adultos do sudoeste da Ásia, foram baseadas no uso de modelos roedores, em experimentos utilizando infecções por *P. yoelii* e o *P. berghei*, que causam em ratos síndromes cerebrais que possuem numerosas similaridades com a condição humana (HUNT, et al., 2006). Em outro estudo, camundongos infectados com *Plasmodium berghei* teve sucesso na transmissão congênita, que é outra complicação que merece atenção, demonstrando que essa espécie infectando esses roedores de laboratório pode ser um bom modelo para o estudo da patogênese dessa doença (ADACHI, et al., 2000).

A infecção natural de *P. yoelii* e *P. berghei* em roedores murídeos está limitada à bacia do Congo: Camarões, África Central República, Congo, República Democrática do Congo e Nigéria (CULLETON, 2005). Um estudo recente realizado em Uganda, Quênia, Zâmbia e Moçambique não detectou nenhuma infecção em roedores silvestres, confirmando a ausência ou raridade dessas espécies de *Plasmodium* fora da bacia do Congo (LUTZ et al., 2016).

No Brasil não há registro desses parasitos em mamíferos das ordens Rodentia e Didelphimorphia, entretanto, é possível atribuir a infecção desses pequenos mamíferos ao ciclo de transmissão no qual, o gênero *Anopheles* participa como vetor, sendo este comum na região estudada, assim, foi detectado o DNA mitocondrial das espécies de *Plasmodium berghei* e *Plasmodium yoelii yoelii*.

Besnoitia besnoiti é parasito intracelular obrigatório (POLLS, 1960), responsável por causar a besnoitiose bovina. Esse gênero de parasito compreende quatro espécies que infetam grandes animais (*B. besnoiti*, *Besnoitia caprae*, *Besnoitia tarandi* e *Besnoitia bennetti*) e seis espécies que afetam pequenos animais (*Besnoitia darlingi*, *Besnoitia jellisoni*, *Besnoitia wallacei*, *Besnoitia oryctofelisi*, *Besnoitia akodoni* e *Besnoitia neotomofelis*) (ELLIS et al., 2000; SCHARES et al., 2009). As espécies de *Besnoitia* distinguem-se, sobretudo pela especificidade do hospedeiro intermediário (FERREIRA, 1985). De acordo com Waap et al. (2008), as espécies pertencentes a este gênero podem parasitar bovinos, equídeos, cervídeos, gambás, coelhos, roedores e lagartos.

B. besnoiti tem um ciclo de vida heteroxênico, tendo os bovinos domésticos e selvagens como hospedeiros intermediários. O hospedeiro definitivo ainda não foi identificado, embora o papel do gato doméstico tenha sido sugerido para outras espécies de *Besnoitia*. O ciclo de vida completo ainda é desconhecido e as vias de transmissão não foram totalmente determinadas (GREGORY et al., 2018).

Apesar do ciclo ainda ser desconhecido os dados epidemiológicos sugerem um papel importante na transmissão ser por contato direto (coito), por transmissão mecânica através de artrópodes hematófagos ou iatrogenicamente pela utilização de agulhas quando do desenvolvimento de ações de rebanho (vacinações, controle de ectoparasitas, testes intradérmicos com tuberculina). No entanto, mais estudos são necessários para se confirmar a hipótese da transmissão pela cobertura. O papel dos ruminantes selvagens e roedores como reservatórios do parasita permanece a ser elucidado (ALVAREZ- GARCÍA et al., 2013).

Com isso, a presença de DNA de *B. besnoiti* em marsupiais(permite considerar um indicativo de proximidade desses animais com artrópodes hematófagos ou ainda uma proximidade desses mamíferos com fezes de gatos domésticos, já que não há registro da presença da presença desse parasito em mamíferos da ordem Didelphimorphia.

O presente trabalho traz informações a respeito da presença de DNA de protozoários em pequenos mamíferos silvestres avaliados servindo de alerta para as prováveis interferências que as parasitoses podem estar provocando na dinâmica populacional desses pequenos mamíferos, sendo possível verificar a similaridade de parasitos encontrados nos municípios estudados, podendo assim questionar as possíveis suspeitas a respeito dos indicativos dos possíveis fluxos destes animais entre os ambientes naturais e antropizados.

Além disso, a utilização do sequenciamento de segunda geração para o diagnóstico nos animais possibilitou a identificação de três espécies de parasitos presentes nas amostras analisadas, sendo registradas essas espécies pela primeira vez na literatura brasileira. Entretanto, essa técnica ainda apresenta desvantagens, como o custo elevado, a presença de DNA e RNA contaminante do hospedeiro, entre outras. Apesar disso, a técnica ainda se encontra em fase de desenvolvimento, como o refino das etapas de bancada e com a inclusão de novas etapas de enriquecimento da amostra.

Deste modo, estudos mais detalhados e a utilização de barcodes específicos para protozoários são necessários para se definir as espécies de *Plasmodium* e *Besnoitia* existentes nos hospedeiros silvestres e distribuição geográfica no Estado da Bahia, assim como a importância e as consequências do parasitismo nesses animais.

Conclusão

DNA mitocondrial de *P. berghei*, *P. yeolli yeolli* e *B. besnoiti* foram encontrados em roedores e marsupiais capturados na Mata Atlântica no Estado da Bahia. Trata-se do primeiro relato desses parasitos em pequenos mamíferos silvestres no Brasil.

Referências

- ADACHI, M.; YUDA, M.; ANDO K. ; SAKURAI, M.; CHINZEI, Y. Scant parasitemia in BALB/c mice with congenital malaria infection. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p.1030-1034, 2000.
- ALVAREZ-GARCÍA, G.; FREY, C.F.; MORA, L.M.O.; SCHARES, G. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. **Trends in Parasitology**, v. 29, n., p. 407-415, 2013.
- BARRETT, M.A.; BROWN, J.L. JUNGE R.E.; YODER, A.D. Climate change, predictive modeling and lemur health: assessing impacts of changing climate on health and conservation in Madagascar. **Biological Conservation**, v.157 n. 409, p. 422, 2013.
- BOUNDENGA, L.; MAKANGA, B.; OLLOMO, B.; GILABERT, A.; ROUGERON, V.; MVE-ONDO, B.; ARNATHAU, C.; DURAND, P.; MOUKODOUM, N.D.; OKOUGA, A.P.; DELICAT-LOEMBET, L.; YACKA-MOULE.; RAHOLA. N. Haemosporidium Parasites of Antelopes and Other vertebrates from Gabon, central Africa. **PloS One**, v.10, p. 1-13, 2016.
- BRADLEY, C.A.; ALTIZER, S. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 2 p. 95-102, 2006.
- BUCHFINK ,B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 2, n. 1, p. 59–60, 2015

- CÂMARA, I. G, State of the Hotspots - Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas - Breve história da Conservação da Mata Atlântica. Parte II, Cap. VI. p. 31. Belo Horizonte, 2005.
- CARLTON, J.M. ANGIUOLI, S.V.; SUH, B.B.; KOUIJ, T.W.; PERTEA, M.; SILVA, J.C.; ERMOLAEVA, M.D.; ALLEN, J.E.; SELENGUTT, J.D.; KOO, H.L. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelli yoelli*, **Nature**, p. 419-512.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A. HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v.78, n.2, p.103- 116, 2001.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, p. 443-449,2000.
- DÉCHAMPS, S.; MAYNADIER, M.; WEIN, S.; GANNOUN-ZAKI, L.; MARÉCHALL, E.; VIAL, H. J. Rodent and nonrodent malaria parasites differ in their phospholipid metabolic pathways. **Journal of Lipid Research**, v.51, p. 81-96.
- ELLIS, J. T.; HOLMDAHL, O. J. M.; RYCE, C.; NJENGA, J. M.; HARPER, P. A. W.; MORRISON, D. A. Molecular Phylogeny of *Besnoitia* and the Genetic Relationships Among *Besnoitia* of Cattle, Wildebeest and Goats. **Protist**, v.151, n. 4, p.329–336,2000.
- FERREIRA, M. L. *Besnoitiose bovina*. Aspectos Anatomo-Clínicos. Maputo, R.P Moçambique: **Tipografia Minerva Central**. 1985
- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Atlantic forest hotspots status: an overview. in GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. pp. 3-11. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C, 2003.
- GREGORY, L.; FRANÇA, V.P.; CORTES, H. *Besnoitiose bovina: revisão de literatura*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.12, n.3, p.165-173, 2018.
- HUNT, N. H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I. M.; MIU, J.; BALL H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 569-582, 2006.
- KEESING, F.; BELDEN, L.K.; DASZAK, P., DOBSON, A. HARVELL, C.D.; HOLT, R.D. HUDSON, P. JOLLES, A.; JONES, K.E.; MITCHELL, C.E.; MYERS, S.S. BOGICH, T., OSTFELD, R.S. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v.468, p.647-652, 2010.
- LACRUE, A.N.; SCHEEL, M.; KENNEDY, K.; KUMAR, N.; KYLE, D.E. Effects of artesunate on parasite recrudescence and dormancy in the rodent malaria model *Plasmodium vinckei*. **PLoS one**, v.6, p. 266-289, 2011.

- LALLO, M. A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E.F. Ocorrência de Giardia, Cryptosporidium e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.5, 2009.
- LUTZ, H.L.; PATERHANS, B.D.; PETERRHANS, J.C.K.; STANLEY, W.T.; WEBALA, P.W.; GMOSKE, T.P.; HACKETT, S.J.; STANHOPE, M.J. Diverse sampling of east African haemosporidians reveals chiropteran origin of malaria parasites in primates and rodents. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 99, p.7-15, 2016.
- KERFELD, C.A.; SCOTT, K.M. Using BLAST to teach “E-value-tionary” concepts. **PLoS Biology**, v. 29, n.2, 2011
- MYERS N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853- 858, 2000.
- PENG, Y.; LEUNG, H.C.M.; YIU S.M.; CHIN, F.Y.L. IDBA UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v, 28, n. 11, p. 1420–1428, 2012.
- PERKINS, S.L.; SARKAR, I.N.; CARTER, R. The phylogeny of rodent malaria parasites: simultaneous analysis across three genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p.74-83, 2007.
- POLS, J. W. Studies on bovine Besnoitiosis with special reference to the aetiology. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 28 p.3-16, 1960.
- REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, p. 437, 2006.
- SCHARES, G.; BASSO, W.; MAJZOUB, M.; CORTES, H. C. E.; ROSTAHER, A.; SELMAIR, J.; GOLLNICK, N. S. First in vitro isolation of Besnoitia besnoiti from chronically infected cattle in Germany. **Veterinary Parasitology**, v.163, n. 4, p. 315–322, 2009
- STEPHENS, R.; CULLETON, R.L.; LAMB, T.J. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.2, p. 73-82, 2012.
- YOTOKO, K.; ELISEI, C. Malaria parasites (Apicomplexa, Haematozoa) and their hosts: is there an evolutionary cost for the specialization?. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.44, p. 265-275, 2006.
- WAAP, H.; GASPAR, J.; LOBO, M. L.; MATOS, O. Detection of DNA belonging to the genus Besnoitia in water. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.103, n.565-566, p. 90-92, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu verificar a presença de protozoários em mamíferos silvestres no litoral Sul do Estado da Bahia, utilizando técnicas moleculares. Além disso, a revisão sistemática e meta-análise servirão como base para informar o atual contexto da infecção de *T. cruzi* em mamíferos silvestres no Brasil. Os resultados aqui apresentados chamam atenção para a necessidade de novas investigações, para que muitas questões em suspenso possam ser respondidas.

Vale ressaltar, também, que o objetivo inicial desse trabalho era realizar a qPCR para tipificação das espécies de *T. cruzi* e *T. rangeli* utilizando os primers S36 e S67 e a utilização de um *barcode* específico para protozoários para realização do NGS no Instituto Evandro Chagas no Estado do Pará. No entanto, essas atividades foram suspensas devido ao atual cenário de pandemia no Brasil e ao isolamento social como forma de combate ao COVID 19, prejudicando sobremaneira o estudo aprofundando da fauna de protozoários em pequenos mamíferos da Mata Atlântica da Bahia.

ANEXO A: Preceitos indicados pelo protocolo PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	39
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	39
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	40
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	41
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	41
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	42
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	42
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	42
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	42
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	42
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	43
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	43
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	43
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	43

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	43
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	43
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	Figura 1
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	Tabela 1
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	45
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	Tabela 2
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	Tabela 2
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	45
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	45
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	49
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	50
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	51
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	51

ANEXO B: Autorização para coleta de material Zoológico-UESC



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 17131-4	Data da Emissão: 06/06/2013 10:40
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Martín Roberto del Valle Alvarez	CPF: 842.503.215-68
Nome da Instituição : UESC - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ	CNPJ: 40.738.999/0001-95

Observações e ressalvas

1	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.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exige o pesquisador titular 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.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 277/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	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.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
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 e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	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 www.mma.gov.br/cgen .
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

1	O pesquisador estrangeiro Martín Roberto del Valle Alvarez possui vínculo empregatício efetivo com instituição científica brasileira. Dispensado de autorização do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.
---	--

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Didelphimorphia, Lagomorpha, Cingulata, Chiroptera, Rodentia
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UESC - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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).

Código de autenticação: 22176617



Página 1/2

APÊNDICE A: Estratégias de buscas utilizadas para pesquisa de literatura

Tabela1. Estratégias de buscas utilizadas para pesquisa de literatura em outubro e novembro de 2020.

Base de dados	Descritores	Números de títulos	Filtro
Scielo	(trypanosomiasis) OR (trypanosoma cruzi) AND (transmission) OR (cycle) OR (reservoir) OR (mammals) AND (brazil) AND year_cluster:("2001" OR "2008" OR "2000" OR "2004" OR "2005" OR "2011" OR "2012" OR "2014" OR "2018")	26	2000-2020
PubMed	(((((Trypanosoma cruzi) OR (trypanosomatids)) AND (mammals)) AND (wild)) AND (Brazil)	188	2000-2020
LILACS)) tw:((Chagas Disease OR Enfermedad de Chagas OR Doença de Chagas OR Trypanosomiasis OR Tripanosomiasis OR Tripanossomíase OR Trypanosoma cruzi)))AND (tw:(Brazil)) AND tw:(transmission OR transmisión OR transmissão OR Disease e Doenças OR mammals OR mamíferos	83	2000-2020
Medline	Trypanosomatids or trypanosoma cruzi and mammals and brazil trypanosoma cruzi and mammals and brazil	50	2000-2020
Science Direct	Trypanosomatids or trypanosoma cruzi and mammals and brazil	233	2000-2020
Total		580	