

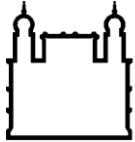
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS DE ÁREAS FLORESTAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO.

DIANA AZEREDO RANGEL

Rio de Janeiro
Março 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Diana Azeredo Rangel

TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS DE ÁREAS FLORESTAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO

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

Orientador: Dr. André Luiz Rodrigues Roque

RIO DE JANEIRO

Março 2017

Rangel, Diana Azeredo.

Tripanosomatídeos em morcegos de áreas florestais com diferentes níveis de antropização na Mata Atlântica do Rio de Janeiro. / Diana Azeredo Rangel. - Rio de Janeiro, 2017.

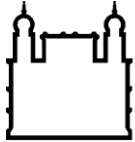
xv, 103 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 82-96

1. Morcegos. 2. Mata Atlântica. 3. Leishmania. 4. Trypanosoma. 5. Crithidia mellificae. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Diana Azeredo Rangel

TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS DE ÁREAS FLORESTAIS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA DO RIO
DE JANEIRO

Orientador: Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Aprovada em: 20/03/2017

EXAMINADORES:

Dr^a. Cláudia Masini D'ávila Levy (presidente) – IOC/FIOCRUZ

Dr^a. Luciana Lima – USP

Dr. Carlos Eduardo Lustosa Esberard – UFRRJ

Dr^a. Patrícia de Azambuja Penna – IOC/FIOCRUZ

Dr. Cléber Galvão Ferreira – IOC/FIOCRUZ

RIO DE JANEIRO

Março 2017

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Margarete Azeredo e José Rangel, que cuidaram de mim e me ensinaram a tentar ser uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus irmãos, Daiana, José Antônio e Moises pela amizade e carinho.

Ao sistema público de educação do Brasil, representado nos nomes dos respectivos governantes de cada etapa de estudo por que passei. Alguns desses governantes foram cruciais nos degraus alcançados.

Agradeço aos membros dessa banca, que gentilmente aceitaram compartilhar seus conhecimentos para uma melhor versão da minha dissertação: Dr^a Cláudia Levy, Dr^a Luciana Lima, Dr. Carlos Esberard, Dr^a Patrícia Azambuja e a Dr. Cléber Galvão.

À chefe do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Dr^a. Ana Jansen, por ter tido paciência em me responder nos e-mails antes da seleção e por esses dois anos de aprendizado. Ao meu orientador Dr. André Roque por ter me apresentado com este projeto, do qual me orgulho de ter participado. Agradeço ainda por ter estado ao meu lado nas horas em que mais precisei, pelos ensinamentos, pelos momentos de sabedoria e diálogo e, principalmente, pela confiança em mim depositada para executar o projeto desse trabalho.

À todos do LABTRIP (Pavilhão Rocha Lima) que de alguma forma me auxiliaram na construção dessa dissertação. Alguns nomes, no entanto, precisam ser citados: Marina Rodrigues, Bruno Alves, Marcos Lima, Carlos e Dr^a Cristiane Varella. Muito obrigada pela presença de vocês em momentos importantes desse projeto.

Ao meu colaborador Dr. Ricardo Moratelli pela colaboração, atenção e recepção na EFMA. Aos seus alunos Roberto Novaes, Renan Souza e André Siqueira pela dedicação e atenção às minhas dúvidas e necessidades tanto na REGUA quanto na EFMA. Agradeço também à Fernanda Alves pela ajuda no campo e no processamento das amostras, na EFMA. Valeu!

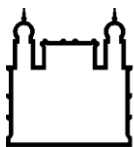
Agradeço à Alessandra Filgueiras pela grande amizade, parceria e por tantas vezes ter me ajudado a encontrar determinados reagentes no laboratório do Pavilhão Rocha Lima! À Renata Pires pelos ensinamentos e pelas risadas durante o café no Lauro Travassos! Ao companheiro Diego Basilio pelas tardes de géis e PCRs, também no pavilhão Lauro Travassos.

Agradeço ainda ao Nicholas Locke, sua esposa Rachel Locke e a todos os funcionários da Reserva Ecológica de Guapiaçu. Muito obrigada pela recepção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro. Ao IOC / FIOCRUZ Campus Manguinhos por toda a estrutura de ensino, oportunidades e suporte para os campos.

E por último, não menos importante, à pessoa que esteve comigo em todos os momentos nesses dois anos. Muito obrigada, Weverthon Machado, por ser acima de tudo, um amigo. Agradeço também à sua família pela força e tudo que fizeram por mim até aqui.

Uma vida só.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS DE ÁREAS FLORESTAIS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

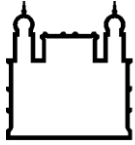
Diana Azeredo Rangel

Tripanosomatídeos (família Trypanosomatidae) são organismos unicelulares distribuídos mundialmente infectando invertebrados e vertebrados e incluem parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, de grande importância em saúde pública. Os morcegos estão entre os hospedeiros mais antigos destes parasitos e constituem o único grupo de mamíferos com capacidade de voo. A grande capacidade de mobilidade, a longevidade, o hábito alimentar bastante eclético na maioria das espécies e a adaptação aos diversos ambientes, inclusive os sinantrópicos, fazem destes animais potenciais reservatórios (e dispersores) de espécies de tripanosomatídeos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as taxas de infecção por tripanosomatídeos em morcegos provenientes de áreas com diferentes níveis de preservação na Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Morcegos foram capturados, utilizando redes de neblina, na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), uma área com alto nível de preservação, e na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA), que possui elevado grau de interferência antrópica. Nos 181 morcegos capturados, foram realizados: (i) exame direto em sangue; (ii) cultura de sangue e fragmentos de pele, baço e fígado; e (iii) diagnóstico molecular frente a infecção por *Leishmania* sp. utilizando como alvo um fragmento de kDNA destes parasitos.

Nossos resultados mostraram que a REGUA e a EFMA possuem riqueza de espécies de morcegos similar (15 e 14 espécies, respectivamente). As espécies mais comuns em ambas as áreas foram *Carollia perspicillata* (n=54 e 29), e *Artibeus lituratus* (n=18 e 16), além de *Sturnira lilium*, também abundante na REGUA (n=18). Dos 181 morcegos analisados, 24 (13%) foram positivos no hemocultivo (um deles também no exame a fresco), mas nenhuma cultura de outros tecidos foi positiva. O sequenciamento e análise filogenética utilizando o alvo 18S SSU revelou infecção por *T. dionisii* em 13 indivíduos (54%), sendo dois destes com infecção mista por *T. cruzi*. Outros 3 morcegos apresentaram

infecção simples por *T. cruzi* e 4 apresentaram sequências similares a outras de tripanosomas de morcegos neotropicais ainda não identificados. Pela primeira vez detectamos a presença de *Crithidia mellificae*, um parasito monoxeno, infectando um mamífero, o morcego nectarívoro *Anoura caudifer*. A taxa de infecção por *Leishmania* em ambas as áreas foi similar (20% e 15%), sendo a infecção diagnosticada predominantemente em pele (14,4%). A fauna de quirópteros e a diversidade dos tripanosomatídeos a eles associados não diferiram significativamente entre as áreas, reforçando a grande capacidade que esses animais têm de adaptar-se aos ambientes com diferentes níveis de antropização.

Palavras - chave: Morcegos; Mata Atlântica; Antropização; *Crithidia mellificae*; *Trypanosoma*; *Leishmania*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TESE (em inglês)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN *Biologia Parasitária*

Diana Azeredo Rangel

Trypanosomatids (Trypanosomatidae family) are unicellular organisms that are widely distributed worldwide and infect both vertebrate and invertebrate hosts. Within this family, it is included the causative parasites of Chagas Disease and Leishmaniasis. Bats are considered the oldest hosts of these parasites and are the only mammals with flight capacity. Some of their characteristics, like mobility, longevity, variety of food habits and adaptation to different environments, including peridomestic ones, make them important reservoirs (and dispersers) of trypanosomatids species. Here we focused on assessing the infection by trypanosomatids in bats from two different areas of Rio de Janeiro State: Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), a highly preserved area, and Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA), an area with high human interference. The following analyses were carried out on 181 bats: i) fresh blood examination, ii) hemoculture and culture of skin, spleen and liver fragments; and iii) molecular diagnosis for infection by *Leishmania* spp. using the kDNA fragments. Our results showed that REGUA and EFMA have similar richness of bat species (15 and 14 species, respectively). The most frequent bat species in both areas were *Carollia pispicillata* (n=54 and n= 29), and *Artibeus lituratus* (n= 18 and 16) and the species *Stunira liliium* was also abundant in REGUA (n=18). Of the 181 analyzed bats, 24 (13%) had positive hemoculture (including one bat which also had positive fresh blood test), but no culture of tissue frag-

ments was positive. The sequencing and phylogenetic analysis using the 18S SSU gene as target showed infection by *T. dionisii* in 13 bats (54%), two of them with mixed infection by *T. cruzi*. Three other bats had single infection by *T. cruzi* and 4 had sequences which were similar to sequences of neo-tropical bats' trypanosomes that have yet to be identified. For the first time we detected infection by *Crithidia mellificae*, a monoxenic parasite, in a mammal. This parasite was isolated from a nectarivorous bat, *Anoura caudifer*. The infection by *Leishmania* was similar for both studied areas (20% and 15%). The skin was the most infected tissue (14,4%). The fauna of chiropterans and their parasite diversity were not significantly different between REGUA and EFMA. This can reinforce the great capacity of bats to adapt to different levels of preservation.

Keywords: Bats; Atlantic Forest; Anthropization; *Crithidia mellificae*; *Trypanosoma*; *Leishmania*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Complexo de espécies reconhecidos em <i>Leishmania</i> sp.....	12
Figura 2 - Foto aérea da Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), no município de Cachoeiras de Macacu/RJ, destacando os três pontos de captura de morcegos.	26
Figura 3 - Foto aérea da Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA), no município do Rio de Janeiro/RJ, destacando os três pontos de captura de morcegos	26
Figura 4 - Locais de coleta de morcegos nos 3 pontos de captura, na Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA) e Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA).....	28
Figura 5 - Riqueza e abundância de morcegos capturados em 4 expedições científicas para cada uma das áreas: Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).....	42
Figura 6 - Curva de acumulação de espécies capturadas na Reserva Ecológica de Guapiaçu/RJ e Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica/RJ.....	44
Figura 7 - Foto representativa do gel de Agarose 2% da segunda etapa da reação de PCR utilizando como alvo 18S SSU nas amostras de morcegos com hemoculturas positivas	50
Figura 8 - Foto representativa do gel de Agarose 2% do produto de PCR 18S SSU purificado.....	51
Figura 9 - Árvore filogenética para o gene 18S pelo método <i>Máxima Verossimilhança</i> com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros (K2 + G).	55
Figura 10 - Árvore filogenética para o gene 18S, para disposição de DTUs, utilizando o método <i>Máxima Verossimilhança</i> com base na matriz de distância Kimura 2- parâmetros.	56
Figura 11 - Árvore filogenética para o gene gGAPDH com o método <i>Neighbor- joining</i> , utilizando matriz de distância Kimura 2- parâmetros	57

Figura 12 - Árvore filogenética para o gene gGAPDH utilizando o método de <i>Máxima Verossimilhança</i> , com base na matriz de distância de Tamura – Nei (TN 93 + G)	58
Figura 13 – Foto representativa de um gel de poliacrilamida 8% contendo amostras de pele de morcegos provenientes da EFMA testados frente a infecção por <i>Leishmania</i> sp. através da reação de PCR utilizando como alvo um fragmento do kDNA destes parasitos.	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura para as subpopulações de <i>Trypanosoma cruzi</i> , de acordo com Zingales e colaboradores (2009).....	9
Tabela 2 – Distribuição das espécies de morcegos capturadas por área [Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA)] e por ponto de amostragem (1, 2 ou 3).	43
Tabela 3 – Distribuição do número de indivíduos coletados por área e ponto em relação aos seus hábitos alimentares. O número de espécies diferentes é apresentado entre parênteses.	45
Tabela 4 – Distribuição das espécies coletadas na REGUA em cada expedição	46
Tabela 5 – Distribuição das espécies coletadas na EFMA em cada expedição	46
Tabela 6 – Taxa de positividade por culturas de sangue em morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA), dividido por ponto de amostragem (1, 2 ou 3).....	47
Tabela 7 - Taxas de infecção em relação ao hábito alimentar do hospedeiro observada através da cultura de sangue de morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).....	48
Tabela 8 – Número de registro, localização e espécie de morcegos com hemocultivos positivos na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA), indicando o meio de cultura em que foi observada a positividade, o sucesso de isolamento e o resultado da caracterização molecular.	52
Tabela 9 – Prevalência da infecção por <i>Leishmania</i> sp. em morcegos capturados em diferentes pontos (1, 2 ou 3) na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).....	59
Tabela 10 – Distribuição da infecção por <i>Leishmania</i> sp. em tecidos e espécies de morcegos na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).....	60

Tabela 11 – Taxas de infecção por <i>Leishmania</i> sp. em tecidos e espécies de morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).	62
Tabela 12 – Taxas de infecção por <i>Leishmania</i> sp. em morcegos de diferentes hábitos alimentares capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).....	63

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tripanosomatídeos	1
1.2 Gênero <i>Trypanosoma</i> sp.	2
1.3 O clado <i>T. cruzi</i>	5
1.4 <i>T. cruzi</i> e suas distintas DTUs e TcBat.....	7
1.5 Gênero <i>Leishmania</i> spp.....	11
1.6 Morcegos	14
1.6.1 <i>Biologia Geral</i>	14
1.6.2 <i>Infecção por Trypanosoma spp. em morcegos</i>	16
1.6.3 <i>Infecção por Leishmania spp. em morcegos</i>	19
1.7 Bioma Mata Atlântica	20
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Áreas estudadas e pontos de coleta	25
4.2 Captura dos morcegos	29
4.3 Identificação dos morcegos	29
4.4 Procedimentos no campo com os morcegos	30
4.5 Diagnóstico Parasitológico	32
4.5.1 <i>Exame a fresco</i>	32

4.5.2 Acompanhamento das culturas	32
4.5.3 Extração Fenol – Clorofórmio	33
4.5.4 PCR para o gene 18S rRNA.....	34
4.5.5 PCR para o gene gGAPDH.....	35
4.5.6 Eletroforese em gel de agarose	35
4.5.7 Purificação de DNA	36
4.5.8 Sequenciamento e análises das sequências.....	36
4.5.9 Análise filogenética	37
4.6 Diagnóstico molecular frente à infecção por parasitos do gênero Leishmania.....	38
4.6.1 Extração de DNA.....	38
4.6.2 PCR com alvo para o kDNA de <i>Leishmania sp.</i>	39
4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	39
4.7 Análise estatística	40
4.8 Aspectos éticos	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Quiropterofauna analisada	41
5.2 Exame a fresco	47
5.3 Infecção em amostras de sangue e caracterização molecular	47
5.4 Análise molecular da infecção pelo gênero <i>Leishmania</i>	58
6 DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO A - Resultados alcançados através do Blast das sequências obtidas com gene 18s SSU e gGAPDH, com sequências já depositadas no Genbank.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tripanosomatídeos

Os Tripanosomatídeos compreendem organismos eucariotos flagelados unicelulares do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, Ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae. Os Kinetoplastídeos possuem uma estrutura denominada cinetoplasto, que consiste no DNA circular mitocondrial (kDNA). Esses organismos possuem apenas uma mitocôndria, e essa organela se estende por todo o corpo do parasito (Vickerman e Preston, 1976). A posição dessa estrutura em relação ao núcleo varia nos diferentes estágios evolutivos e é, portanto, uma das características observadas no momento do diagnóstico morfológico. Até o momento esses flagelados podem apresentar, de acordo com a espécie do parasito, estágio e condições do ambiente, as seguintes formas evolutivas: amastigota, epimastigota, tripomastigota, promastigota, coanomastigota, endomastigota, paramastigota, opistomastigota, e esferomastigota (Wallace, 1966; Wallace *et al.*, 1983; D'ávila-Levy *et al.*, 2015).

Os membros da família Trypanosomatidae são parasitas obrigatórios que infectam plantas, várias espécies de invertebrados e todas as ordens de vertebrados (Stevens, 2008). Podem apresentar um ciclo de vida monoxeno, quando completam seu ciclo em apenas um hospedeiro (invertebrado); ou heteroxeno, quando necessitam de duas espécies para completar seu ciclo de vida, um hospedeiro invertebrado (geralmente inseto) e outro que pode ser um hospedeiro vertebrado ou uma planta. Os gêneros tidos como associados somente a insetos, apesar de alguns deles já terem sido encontrados em outros organismos, são: *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Wallacemonas*, *Sergeia*, *Strigomonas*, *Angomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Blechomonas*, *Paratrypanosoma*, *Kentomonas*, *Lotmaria*, *Lafontella*, *Jaeinimonas* e *Novymonas* (Wallace, 1966; Vickerman e Preston, 1976; Wallace *et al.*, 1983; Camargo, 1999; Merzlyak *et al.*, 2001; Svobodova *et al.*, 2007; Votýpka *et al.*, 2014, 2013; Borghesan *et al.*, 2013; Flegontov *et al.*, 2013; Kostygov *et al.*, 2014, 2016; Schwarz *et al.*, 2015; Yurchenko *et al.*, 2016). As espécies de tripanosomatídeos heteroxenos são: *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Phytomonas*. Este último alberga espécies de parasitos que infectam plantas

através de hemípteros fitófagos, sendo um grande problema econômico para na agricultura (Camargo, 1999).

De acordo com os estudos mais aceitos atualmente, os tripanosomatídeos monoxênicos teriam sido originados de um protozoário de vida livre, que então teria sido ingerido por um inseto, se estabelecendo no intestino deste. Os parasitas heteroxênicos que conhecemos hoje teriam surgido após o processo evolutivo de hematofagia por insetos hematófagos, fazendo então com que os grupos de vertebrados se tornassem infectados por esses protozoários (Hamilton, Gibson e Stevens, 2007; Deschamps *et al.*, 2011; Flegontov *et al.*, 2013). Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* compreendem os parasitas heteroxenos que infectam várias espécies de mamíferos e são responsáveis por parasitoses de grande importância médica e veterinária tanto no Velho como no Novo Mundo.

1.2 Gênero *Trypanosoma* sp.

O gênero *Trypanosoma* reúne tripanosomatídeos flagelados, sempre parasitos, que são transmitidos às diversas classes de vertebrados (aves, anfíbios, mamíferos, répteis, peixes) através de insetos hematófagos, tais como espécies hemípteras [como as da sub-família Triatominae (barbeiros) e família Cimicidae (percevejos de cama)], moscas, mosquitos (Diptera), pulgas (Siphonaptera), além de sanguessugas (classe Clitellata) e carrapatos (Parasitiforme) (Hamilton, Gibson e Stevens, 2007).

De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, consequentemente a sua forma de transmissão, os tripanossomas são classificados em duas grandes seções: Salivaria e Stercoraria (Hoare, 1972). A primeira seção reúne tripanossomas de origem africana, além de *Trypanosoma rangeli*, que são transmitidos pela saliva. As espécies de origem Africana, tais como *Trypanosoma brucei* (subgênero *Trypanozoon*) e *T. congolense* (subgênero *Nannomonas*) têm como vetor biológico espécies de moscas hematófagas do gênero *Glossina*. O vertebrado se torna infectado quando, ao se alimentar, o parasito na forma de tripomastigota é inoculado juntamente com a saliva do inseto vetor. A espécie *T. brucei*, e suas subespécies *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* estão envolvidas como agentes da tripanosomíase africana

ou doença do sono. Esses parasitos se mantêm nos hospedeiros vertebrados através da troca periódica de proteínas de superfície (VSG), evadindo com sucesso do sistema imune do hospedeiro. As espécies *T. vivax* e *T. congolense* (Subgênero *Duttononela* e *Nannomonas*, respectivamente), além do *T. brucei brucei* estão envolvidas na doença do gado chamada nagana ou tripanosomiose bovina, sendo que a espécie *T. vivax* pode ser transmitida de forma biológica ou mecânica (Morrison *et al.*, 2009). *Trypanosoma evansi* e *T. equiperdum* são transmitidas mecanicamente, sendo que a primeira por espécies da família Tabanidae, causando a Surra ou Mal de cadeiras, e segunda através do coito e apenas entre equinos (Desquesnes *et al.*, 2013; Camargo *et al.*, 2015).

A seção Stercoraria reúne os sub-gêneros: (i) *Herpetosoma*, que tem como espécie-tipo *T. lewisi*, e infecta principalmente roedores, embora recentemente tenha sido descrito também infectando primatas (Maia da Silva *et al.*, 2010); (ii) *Megatrypanum*, que incluem espécies que infectam todas as classes de vertebrados e inclui o *T. theileri* que é um parasito associado à ruminantes; e (iii) *Schizotrypanum*, onde encontramos *T. cruzi*, espécie multi hospedeira que infecta diversas ordens de mamíferos, além de várias outras espécies deste subgênero atualmente associadas primariamente aos morcegos (Vickerman, 1976). Antigamente, tripanosomas eram classificados sempre pela região de origem, hospedeiros, morfologia, sintomatologia (quando aplicável) e ciclo de vida, quando conhecido (Hoare, 1972). As primeiras caracterizações eram resultados de estudos baseados em testes sorológicos e infecção experimental. Alguns anos depois, na década de 70, foram surgindo os primeiros ensaios bioquímicos, que identificavam proteínas imunogênicas solúveis e de superfície (Bagster e Parr, 1973). Tais estudos eram mais frequentes em espécies de tripanosomas patogênicos, como os agentes da doença do sono, *T. brucei*, e da doença de Chagas, *T. cruzi*.

O cenário começa a mudar no final da década de 80 com a inovação das técnicas moleculares e as reações em Cadeia da Polimerase – PCR (Mullis *et al.*, 1986), as quais possibilitam a amplificação de milhares de cópias do fragmento de DNA estudado usando uma Taq polimerase estável, o que possibilitou um grande avanço na identificação taxonômica de parasitos. Nessa década a grande maioria das descrições de tripanosomas provenientes de morcegos limitavam-se apenas à denominação como *T. cruzi*-like (Marinkelle,

1982), dada a semelhança observada entre todas as espécies do subgênero *Schizotrypanum*. Apenas na última década os estudos de genes alvos e o uso da técnica de sequenciamento para identificação taxonômica se tornaram mais acessíveis. Os primeiros trabalhos de identificação de *Trypanosoma* de morcegos baseados em sequenciamento de produtos amplificados datam de 1999 (Stevens *et al.*, 1999). Esses avanços nos ajudam nas inferências sobre identificação de novas espécies e (re)classificação filogenética. Como consequência, também promovem a descoberta da grande diversidade de tripanossomas de morcegos fazendo com que constantemente tenhamos que remontar o grande quebra-cabeça que envolve origem, ciclo de transmissão, reservatórios, evolução desse grupo de parasitos (Hamilton *et al.*, 2008; Hamilton e Jamie R. Stevens, 2010).

Atualmente, os resultados obtidos com as técnicas de sequenciamento são essenciais para o estudo da diversidade de tripanosomatídeos, integrando-se à taxonomia clássica (morfológica e biológica). No caso da identificação de espécies do gênero *Trypanosoma*, dois genes estão entre os mais utilizados em análises filogenéticas: o gene codificador da subunidade menor do ribossomo, SSU rRNA, e o gene codificador da enzima Gliceraldeído 3- Fosfato desidrogenase, gGAPDH (Hamilton *et al.*, 2004; Stevens, 2008).

O gene ribossômico nos tripanosomatídeos possui 3 moléculas de RNAs maduras: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior) (Dietrich *et al.*, 1993). A subunidade maior é dividida em dois fragmentos de RNAs de alto peso molecular: 24 α e 24 β e, mais quatro fragmentos menores: S1, S2, S4, S6. Já a subunidade menor (18S) é constituída de oito regiões conservadas (U1-U8) e por nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández *et al.*, 1990). A grande utilização deste gene está atribuída à maior disponibilidade de sequências depositadas em bancos de dados e por também apresentar regiões variáveis e não variáveis que possibilitam a diferenciação entre espécies distintas.

O gene GAPDH codifica para uma proteína com função enzimática que atua no processo de obtenção de energia através da degradação da glicose. Nos tripanosomatídeos existem dois genes: o gGAPDH, que codifica a enzima presente no glicossomo e o gene cGAPDH que codifica uma enzima encontra-

da no citosol (Michels *et al.*, 1986; Kendall *et al.*, 1990). É um gene bastante conservado nos tripanosomatídeos, apresentando baixa taxa de evolução.

O gênero *Trypanosoma* é monofilético e possui um agrupamento em três cladogramas principais: (i) o clado *T. cruzi*, que inclui as espécies *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. dionisii* (Europa e América do Sul) e tripanosomas até então encontrados apenas em morcegos, como *T. c. marinkellei* (América do Sul) *T. vespertillionis* (Europa e América do Sul), *T. livingstonei* (Lima *et al.*, 2013), *T. erneyi* (Lima *et al.*, 2012), e *T. wauwau* (América do Sul) (Lima, Espinosa-Álvarez, Pinto, *et al.*, 2015). *T. noyesi* (Botero *et al.*, 2016) foi recentemente introduzido no clado embora seja oriundo de um marsupial; (ii) Clado *T. brucei*, que inclui os tripanosomas de mamíferos, advindos da África, e (iii) Clado aquático, que inclui os parasitos descritos em peixes e anuros. Outros 4 cladogramas já foram propostos, os quais se ajustam de acordo com as abordagens filogenéticas aplicadas: (iv) Clado de tripanosomas de répteis; (v) Clado *T. theileri*; (vi) Clado de tripanosomas de aves; e (vii) Clado *T. lewisi*, que corresponde a espécies do subgênero *Herpetosoma* (Stevens, Dover e Gibson, 1999; Hamilton *et al.*, 2009; Hamilton e Jamie R. Stevens, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010; Fermino *et al.*, 2013; Yurchenko *et al.*, 2016)

1.3 O clado *T. cruzi*

O clado *T. cruzi* alberga, além da espécie *T. cruzi* que infecta os morcegos e outros mamíferos desde sul dos Estados Unidos até sul da América do Sul, tripanosomas presentes em outras espécies de mamíferos, e também espécies de tripanosomas que foram descritos somente em morcegos. São descritas, até o momento, 18 espécies para este clado, sendo as mais conhecidas: (i) *T. cruzi marinkellei*, subespécie de *T. cruzi*, e encontrado na América Central e na América do Sul; (ii) *T. dionisii*, espécie tida como restrita a morcegos, mas que foi recentemente encontrado em tecido cardíaco humano (Dario *et al.*, 2016), e é encontrada no Velho e Novo Mundo, apresentando cepas muito relacionadas entre si, sugerindo um movimento de hospedeiros entre os locais de infecção de aproximadamente 3,2 a 5,0 milhões de anos (Hamilton *et al.*, 2012); (iii) *T. erneyi*, descrito em morcegos africanos; e (iv) *T. vespertillionis*, descrito em morcegos da Europa e América do Sul. Estudos filogenéticos mais

recentes que incluíram espécies de *Schizotrypanum* presentes em morcegos levaram à proposta da hipótese *Bat-seeding* (Hamilton, Teixeira e Stevens, 2012), na qual as espécies de tripanosomas desse clado, incluindo *T. cruzi*, provavelmente descendem de um tripanosoma ancestral comum parasito de morcegos.

Além disso, novos estudos sugerem que o clado *T. cruzi* pode ser dividido em três subclados: (i) um contendo os isolados de *T. rangeli*; (ii) outro que inclui o *T. conorhini*, parasito de *Rattus rattus*, e outros tripanosomas provenientes de morcegos africanos, morcegos europeus e macacos africanos; e (iii) um terceiro que agrupa as espécies *T. cruzi*, *T. cruzi marinkelai*, *T. dionisii* e *T. erneyi*, entre várias outras do subgênero *Schizotrypanum* (Hamilton, Teixeira e Stevens, 2012; Lima *et al.*, 2012, 2013; Lima, Espinosa-Álvarez, Pinto, *et al.*, 2015).

T. c. marinkelai é uma subespécie de *T. cruzi* e, portanto, mais próximo evolutivamente que as demais espécies. Tem como vetores triatomíneos do gênero *Cavernicola*, intimamente associado a ambientes como cavernas e telhados de folha de palmeiras, os quais são locais preferidos dos morcegos.

T. dionisii, espécie também muito próxima filogeneticamente da anterior (Hamilton 2007) possui os mesmos estágios evolutivos descritos para *T. cruzi*, bem como a capacidade de invadir células não fagocíticas de mamíferos e formar ninhos de formas amastigotas e pseudocistos (Oliveira *et al.*, 2009). Este parasito também alterna seu ciclo de vida nas formas epimastigota e formas tripomastigota metacíclica no hospedeiro invertebrado e formas tripomastigota sanguíneas e formas amastigotas no mamífero, compartilhando com *T. cruzi* alguns epítomos (Oliveira *et al.*, 2013). Estas espécies, no entanto, diferem no perfil de moléculas de superfície, pois ativam vias de sinalização intracelular distintas, e *T. dionisii* não usa o aminoácido Prolina para a produção de ATP, por exemplo (Maeda *et al.*, 2012). No que diz respeito ao vetor, ele é descrito associado às espécies da família Cimicidae (percevejos de cama). Embora ainda seja associado somente à infecção em morcegos, Dario e colaboradores (2016) recentemente mostraram a presença de *T. dionisii* em tecido cardíaco humano.

Recentemente, Lima e colaboradores em 2012 e 2013 descreveram *Trypanosoma erneyi* e *Trypanosoma livingstonei* em morcegos africanos. Em

2015, Lima e colaboradores descreveram *Trypanosoma wauwau*, encontrado em morcego neotropical e evolutivamente posicionado na base do clado, muito próximo dos tripanossomas australianos. Em 2016, *Trypanosoma noyesi* e *Trypanosoma teixeirae*, este último descrito em raposas voadoras *Pteropus scapulatus*, também foram incluídos no clado *T. cruzi* (Barbosa *et al.*, 2016; Botero *et al.*, 2016)

1.4 *T. cruzi* e suas distintas DTUs e TcBat

T. cruzi tem capacidade de infectar todas as ordens de mamíferos nas Américas e distribui-se do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. No homem, é o agente etiológico da doença de Chagas, doença parasitária que ainda permanece na lista das doenças negligenciadas do mundo e afeta milhões de pessoas nos países endêmicos (WHO, 2016).

Seu ciclo se inicia quando tripomastigotas circulantes (que estão no sangue) são ingeridos pelo vetor (invertebrado) num repasto sanguíneo realizado em um hospedeiro vertebrado infectado. Após o contato com intestino do inseto, ele se diferencia em formas epimastigotas, ocorrendo em seguida a multiplicação do parasita no intestino médio. No intestino posterior ocorre a diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico que é a forma infectante, não replicativa (Telleria e Tibayrenc, 2017). Ao realizar um novo repasto no hospedeiro vertebrado, as formas infectantes são eliminadas pelas fezes contaminadas do vetor, e podem entrar na corrente sanguínea do hospedeiro através do local da picada ou alguma outra lesão na pele (transmissão contaminativa). A transmissão do *T. cruzi* também pode ocorrer por via oral, que se dá pela ingestão do parasito, seja em algum alimento, ou hospedeiro (inseto ou mamífero) infectado. Outras formas de transmissão incluem a congênita; por transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Estas últimas três vias tem maior ocorrência em países não-endêmicos, como os países da Europa, onde há grande número de imigrantes (Coura, 2015).

T. cruzi tem como vetor biológico os insetos pertencentes à ordem Hemiptera, principalmente os da subfamília Triatominae. Apesar de a via contaminativa ser considerada como a “via clássica” da infecção em humanos, esta provavelmente não é a via de infecção mais importante no ambiente silvestre.

A via congênita, apesar de já descrita em morcegos *Molossus molossus* (Añez, Crisante e Soriano, 2009), também não é comumente reportada em animais silvestres (Jansen, Xavier e Roque, 2017).

Ao contrário das demais vias, a transmissão pela via oral parece ser a mais eficiente para o sucesso da dispersão do parasito no ambiente silvestre, além de ser, provavelmente, também a mais antiga (Roque *et al.*, 2008). Assim, a chance de exposição ao parasito pela via oral depende do tipo de alimentação do mamífero (o quanto ele inclui insetos ou outros mamíferos em sua dieta, por exemplo) e as relações tróficas que ele possui. Desde 2006, quando o Brasil foi considerado livre da transmissão intradomiciliar por *Triatoma infestans*, vários surtos da Doença de Chagas foram detectados em diferentes regiões, a grande maioria deles relacionada à infecção pela via oral. Esta pode acontecer pelo contato com fezes do barbeiro infectado, por alimentos (frutas, geralmente) infectados pelas fezes, ou por ingestão de carnes cruas (Dias *et al.*, 2008; Roque *et al.*, 2008; Nóbrega *et al.*, 2009; Souza-Lima *et al.*, 2013).

T. cruzi apresenta uma extrema variabilidade genética, a qual pode ser agrupada em subpopulações ou, como vem sendo conhecido mais recentemente, em Unidades Discretas de Tipagem, do inglês *Discrete Typing Units*, ou DTUs. Assim, em 2009 foi proposto um consenso sobre a nomenclatura do *T. cruzi* baseado nas diferentes DTUs. Atualmente são reconhecidas 6 DTUs (TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, e TcVI), além do TcBat, que é uma DTU inicialmente descrita como restrita à morcegos, mas que já foi encontrada infectando humanos (Zingales *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2014b) (Tabela 1). Todas as DTUs já foram descritas ocorrendo no Brasil. Elas se distribuem diferentemente, e isso está associado aos fatores ecológicos que por sua vez estão intimamente relacionados aos hospedeiros vertebrados e invertebrados e o meio ambiente onde estão inseridos.

Tabela 1 - Nomenclatura para as subpopulações de *Trypanosoma cruzi*, de acordo com Zingales e colaboradores (2009).

Nomenclatura atual	Abreviação	Antigo agrupamento
<i>T. cruzi</i> I	Tc I	<i>T. cruzi</i> e DTU I
<i>T. cruzi</i> II	Tc II	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	Tc III	Z3/Z1 ASAT; Z3-A, DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	Tc IV	Z3; Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	Tc V	Z2; rDNA ½; clonet 39 e DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI	Tc VI	Z2; Zimodema B e DTU IIe

Adaptado de Brandão (2016)

A DTU TcI é um dos genótipos parentais, e é aquele mais bem distribuído e o mais encontrado no meio silvestre no Brasil e em outros países das Américas. Esse genótipo possui uma alta diversidade e teria divergido há pelo menos 3 milhões de anos. Os eventos de recombinação genética de TcI teriam favorecido a dispersão dessa DTU através dos seus vários hospedeiros (Brenière, Waleckx e Barnabé, 2016).

A outra DTU parental, TcII, apesar de ser menos frequente em comparação com a TcI, também possui distribuição por todo o país. Já foi reportada em roedores, marsupiais, carnívoros, primatas e quirópteros. Estudos mostram que a DTU TcII não é tão encontrada como a TcI no meio silvestre, e que possivelmente essas duas DTUs usam estratégias diferentes de transmissão (Brenière, Waleckx e Barnabé, 2016).

Sobre os genótipos TcIII e TcIV, a teoria atualmente mais aceita é que se originaram de um primeiro processo de hibridação entre TcI e TcII (Sturm *et al.*, 2003). No Brasil, embora ainda raros, têm uma grande distribuição na natureza. A infecção por essas DTUs tem sido descrita no ambiente silvestre, e casos de infecção em humanos, especialmente em populações que vivem em contato íntimo com o meio silvestre, já foram registrados nos países: Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela e Guatemala.

As linhagens TcV e TcVI têm origem de um segundo processo de hibridação, ocorrido entre populações de parasitos das DTUs TcII e TcIII. Ainda raras no ambiente silvestre, sua distribuição tem sido predominantemente relacionada a casos humanos.

O genótipo TcBat foi descrito pela primeira vez por Marcilli e colaboradores (2009), e até recentemente descrito como um genótipo associado apenas a morcegos. Nas análises filogenéticas em vários trabalhos, esse genótipo é muito próximo do genótipo TcI, e isso traz inferência sobre a origem da espécie *T. cruzi*, visto que ela é a única do subgênero *Schizotrypanum* que não é associada apenas a quirópteros. Esse genótipo já foi encontrado no Brasil nos biomas Pantanal, Mata Atlântica e Amazônia. Além do Brasil também já descrito no Equador, Panamá e recentemente na Colômbia e em humanos (Ramírez *et al.*, 2014b).

Infecções mistas ainda são pouco reportadas, e provavelmente sua prevalência ainda é subestimada. Quando ocorrem, a maior parte das infecções mistas são relacionadas a infecções por TcI e TcII (Jansen, Xavier e Roque, 2015). Em infecções avaliadas em todos os biomas do Brasil, foi verificado que nos mamíferos com infecção mista era possível visualizar: em primeiro lugar infecção TcI + TcII, em segundo lugar, DTU TcI + TcIV e em terceiro TcI+TcIII/TcIV (Jansen, Xavier e Roque, 2015).

Recentemente, um estudo filogenético com sequências dos genes mitocondriais *CytB* (citocromo b) e *COII* (citocromo oxidase II) revelou agrupamento das subpopulações de *T. cruzi* em apenas três tipagens mitocondriais, sugeridas como: mtTcI, mtTcII e mtTcIII. O genótipo TcBat apresentou maior proximidade com mtTcI, porém ainda formando um grupo separado. Além dos genes mitocondriais, os autores também realizaram análises de sequências do gene nuclear *Gpi* (glicose- 6- fosfato isomerase), o que resultou num posicionamento menos robusto e questionável das sete subpopulações de *T. cruzi*. Porém, os autores afirmam que a tipagem utilizando genes nucleares são importantes para detecção do fluxo gênico (Barnabé *et al.*, 2016). Essa é uma nova proposta para a tipagem das subpopulações de *T. cruzi*, porém a abordagem adotada pela maioria dos grupos de pesquisa ainda é das DTUs de I a VI, mais a TcBat.

1.5 Gênero *Leishmania* spp

O gênero *Leishmania* alberga mais de 30 espécies de parasitos multi hospedeiros transmitidos por insetos flebotomíneos (Diptera: Phlebotomidae) dos gêneros *Lutzomyia* (nas Américas) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) através da picada. Possui duas formas evolutivas: promastigota, que é a forma encontrada no hospedeiro invertebrado (vetor) e amastigota, encontrada no hospedeiro vertebrado. O ciclo heteroxeno se inicia quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas no hospedeiro vertebrado pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. O parasito é fagocitado por células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, em especial), onde se aloja no vacúolo parasitóforo do mesmo. Quando outra fêmea se alimenta desse hospedeiro, ele pode ingerir células infectadas por formas amastigotas junto com o sangue do hospedeiro. Dentro do intestino do flebotomíneo, o parasito se multiplica e se diferencia em formas promastigota (WHO, 2016).

Atualmente, o gênero *Leishmania* está dividido nos subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Este último reúne parasitos de répteis descritos no Velho Mundo e que, até o momento, não são reconhecidos como de importância médica.

Assim como no gênero *Trypanosoma*, os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados com relação ao desenvolvimento no hospedeiro intermediário (vetor). Sendo assim, temos:

- i) Seção Hipopilária, a qual reúne parasitos que se desenvolvem na porção posterior do intestino do inseto vetor. Nessa seção estão os parasitos do subgênero *Sauroleishmania*;
- ii) Seção Peripilaria, agrupa parasitos com desenvolvimento no intestino posterior, mas que migram para o médio e anterior. Nessa seção estão os parasitos do subgênero *Viannia* e também alguns do subgênero *Sauroleishmania*;
- iii) Seção Suprapilaria que reúne os parasitos que se desenvolvem na porção anterior e média do intestino no inseto vetor. Nessa seção estão os parasitos do subgênero *Leishmania*.

Os subgêneros e as espécies do gênero *Leishmania* estão organizados em “complexos”, de acordo com a contribuição de cada espécie na epidemiolo-

gia das Leishmanioses e também formas clínicas dessa doença. São ao todo oito complexos e eles estão dispostos na figura 1. Dos complexos listados, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis* são de importância médica.

Figura 1- Complexo de espécies reconhecidos em *Leishmania* sp.

Subgêneros	<i>Leishmania (Leishmania)</i>				<i>Leishmania (Viannia)</i>			
Complexos	<i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. naiffi</i>
Espécies	<i>L. infantum</i> ; <i>L. archibaldi</i> ; <i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i> ; <i>L. aethiopica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. amazonenses</i> ; <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. enrietti</i> <i>L. aristidesi</i> ; <i>L. garnhami</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. naiffi</i>

Noyes, 1998, Cupolillo et al., 2000; Fraga et al., 2010; Lainson, 2010; Schonian et al., 2010

Reproduzido de (Brandão, 2016)

No Novo Mundo são descritas até o momento as seguintes espécies e distribuição geográfica: *L. (Viannia) braziliensis*, América Central e Sul até a Argentina; *L. (V.) peruviana*, encosta dos Andes; *L. (V.) guyanensis*, países norte da América do Sul, incluindo norte do Brasil (estado Amazonas); *L. (V.) panamensis*, América Central e parte da América do Sul; *L. (V.) lainsoni*, estado do Pará; *L. (V.) shawi*, região amazônica; *L. (V.) naiffi*, também na região amazônica; *L. (Leishmania) mexicana*, México e América Central; *L. (L.) amazonensis*, América Central e norte do Brasil, com casos também no litoral; *L. (L.) pifanoi*, Venezuela; *L. (L.) venezuelensis*, na Venezuela; *L. (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*), mais de trinta países do mundo, incluindo o Brasil, além de outras espécies que são filogeneticamente mais próximas de *Endotrypanum* do que de *Leishmania*: *L. (L.) enrietti*; *L. colombiensis*; *L. equatoriensis*; *L. hertig*; *L. deanei*; *L. aristidesi*; *L. garnhami*; *L. forantini* (Cupolillo et al., 2000).

No Brasil, são 6 as espécies envolvidas nos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que abrange as leishmanioses cutâneas e as mucocutâneas. *L. braziliensis*, possui como vetor as espécies *Lu. whitmani*, *Lu. wellcome*, *Lu. intermedia*. Seu ciclo ocorre predominantemente em ambientes de

mata, entre animais silvestres, embora nos últimos anos tenha ocorrido em ambientes urbanos por causa da degradação da mata. *L. amazonensis* tem como espécies vetoras *Lu. flaviscutellata*, e *Lu. olmeca*, espécies associadas ao ambiente silvestre. *L. guyanensis* tem como vetor *Lu. anduzei*, *Lu. umbratilis* e *Lu. whitmani*. *L. naiffi* tem como vetor as espécies *Lu. squamiventris*, *Lu. paraenses* e *Lu. ayrozai*, espécies que possuem elevado grau de antropofilia. *L. shawi*, cuja espécie vetora é *Lu. whitmani*, e é encontrada na região norte do país. Por fim, *L. lainsoni* tem como vetor a espécie *Lu. ibiquitalis* e é também restrita à região amazônica. Dessas espécies, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* são os principais agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil (Marlow *et al.*, 2013).

A leishmaniose tegumentar se caracteriza por formar uma lesão (única ou não), iniciada no local da picada do flebotomíneo. A leishmaniose mucocutânea forma uma lesão inicial, geralmente afetando a área nasal, na região do septo. Essa lesão está associada quase sempre à espécie *L. braziliensis* e seu tratamento é bem mais difícil em comparação à forma cutânea da doença (Rey, 2008).

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou Calazar é causada pelas espécies *L. infantum* (= *L. chagasi*), que é encontrada no Velho e Novo Mundo, e *L. donovani* que é encontrada apenas no Velho Mundo. Os principais vetores no país são *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* e *Lu. migonei*. A doença é caracterizada por causar aumento do baço e fígado pelo fato dos parasitos se alojarem preferencialmente no sistema fagocítico mononuclear desses órgãos.

Em relação aos seus hospedeiros silvestres, marsupiais já foram encontrados infectados por *L. infantum* (Corredor *et al.*, 1989), *L. amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1991), e *L. braziliensis* (Quaresma *et al.*, 2011); mamíferos da ordem Pilosa (Tamanduás e Preguiças) já foram encontrados infectados por *L. infantum* (Araujo *et al.*, 2013), *L. amazonensis* (Mimori *et al.*, 1989), *L. guyanensis* (Lainson, Shaw e Póvoa, 1981), e *L. shawi* (Lainson *et al.*, 1989). Tatus são descritos como hospedeiros de *L. guyanensis* (Lainson *et al.*, 1979) e *L. naiffi* (Naiff *et al.*, 1991). Roedores compreendem a ordem de mamíferos onde já foi encontrada a maior diversidade de espécies de *Leishmania*: *L. infantum* (Travi *et al.*, 1998), *L. amazonensis* (Arias *et al.*, 1981), *L. guyanensis* (Lainson, Shaw e Póvoa, 1981), *L. braziliensis* (Quaresma *et al.*, 2011), *L. me-*

xicana (Wynsberghe, Van *et al.*, 2000), *L. shawi* (Cássia-Pires *et al.*, 2014), *L. naiffi* (Cássia-Pires *et al.*, 2014). Carnívoros silvestres já foram reportados infectados por *L. infantum* (Figueiredo *et al.*, 2008), *L. amazonensis* (Telleria *et al.*, 1999), *L. braziliensis* (Buitrago *et al.*, 2011). Primatas não humanos são descritos como hospedeiros de *L. amazonensis* (Herrer, Christensen e Beumer, 1973), e *L. braziliensis* (Herrer e Christensen, 1976). Já na ordem Chiroptera, já foram reportadas infecções por *L. amazonensis* (Savani *et al.*, 2010), *L. mexicana*, *L. infantum* (Oliveira *et al.*, 2015) e *L. braziliensis* (Shapiro *et al.*, 2013).

1.6 Morcegos

1.6.1 Biologia Geral

Os morcegos compreendem a segunda maior ordem de mamíferos (Chiroptera), com distribuição cosmopolita, mais de 1.300 espécies em 20 famílias, sendo os únicos mamíferos com capacidade de voo (Fenton e Simmons, 2014). A classificação desses animais era organizada em duas subordens: Microchiroptera e Megachiroptera. Com base na morfologia, os megaquirópteros eram os morcegos restritos ao Velho mundo e sem ecolocação laringeal; microquirópteros eram os morcegos com ecolocação laringeal, presentes tanto no Velho como no Novo Mundo. Porém, acordo com filogenias moleculares recentes, os morcegos foram reorganizados em duas sub-ordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (Teeling *et al.*, 2002; Lei e Dong, 2016). Sendo assim, a subordem Yangochiroptera é composta pelas famílias antes pertencentes à subordem Microchiroptera, enquanto a subordem Yinpterochiroptera é composta pelas famílias Rhinolophidae, Rhinopomadidae, Megadermatidae e Pteropodidae (Teeling, 2009).

De modo geral, os morcegos da subordem Yangochiroptera possuem maior atividade durante a noite, que é quando saem para procurar alimento, sobretudo os que comem insetos, momento em que estes estão mais disponíveis. Para isso, a maioria deles usa um sistema sofisticado de percepção do ambiente: a ecolocação. A ecolocação se baseia na emissão de sons de alta frequência (inaudíveis por humanos) e o eco que retorna permite que eles con-

sigam perceber os obstáculos para evitá-los, assim como para detectar suas presas. No Brasil são reconhecidas 178 espécies, distribuídas em 68 gêneros e 9 famílias (Nogueira *et al.*, 2014). Das espécies listadas em todo o Brasil, 78 delas são listadas para o estado do Rio de Janeiro, distribuídas em 8 famílias. Isso equivale a 69% da riqueza de espécies de morcegos da Mata Atlântica e 45% das espécies do Brasil (Peracchi e Nogueira, 2010; Paglia *et al.*, 2012)

Os morcegos possuem alimentação bastante eclética, com seis tipos de hábitos alimentares. Em relação à dieta, os morcegos constituem o grupo de maior diversidade ecológica em comparação aos demais vertebrados terrestres (Fenton e Simmons, 2014) sendo divididos em dois grandes grupos: os que se alimentam de material de origem animal e os que se alimentam de material de origem vegetal. Os que se alimentam de material de origem animal se dividem em morcegos que se alimentam em vertebrados, seja apenas de sangue (hematófagos) ou do animal inteiro, como os piscívoros (que se alimentam de peixes), carnívoros (que se alimentam de pequenos vertebrados) e insetívoros. Já no grupo dos que se alimentam de plantas há os que se alimentam de néctar/pólen (nectarívoros), os que comem frutos (frugívoros) e folhas (Wilson, 1997).

Os morcegos juntamente com as aves desempenham papéis ecológicos similares como dispersores de sementes e polinizadores. Eles se complementam no papel que desempenham: as aves têm uma dieta mais variada e, portanto, a diversidade de espécies que dispersam é maior, enquanto os morcegos se concentram em alguns gêneros de plantas, como: *Cecropia* e *Ficus*, por exemplo. Morcegos, no entanto, são os principais agentes de dispersão em locais degradados, fazendo o reflorestamento através da dispersão de espécies de plantas pioneiras, como palmito juçara, manacás, jacarandás, embaúba, dentre outras espécies. Além disso, algumas espécies conseguem se adaptar muito bem a locais peridomiciliares e de grande interferência humana, ocupando até mesmo centros urbanos. Uma das principais características dos morcegos é sua elevada longevidade, a qual varia dependendo da espécie. A espécie *Carollia perspicillata*, por exemplo, vive pelo menos 10 anos. A maioria das espécies de morcegos neotropicais vive entre 10-25 anos (Wilson, 1997). Para algumas espécies, no entanto, há relatos de longevidade ainda maiores:

33 anos para *Myotis lucifugus* e 40 anos para *M. brandtii* (Wilson, 1997; Seim *et al.*, 2013; Gager *et al.*, 2016)

1.6.2 Infecção por *Trypanosoma* spp. em morcegos

Embora ainda provavelmente subestimada, a diversidade de espécies de tripanosomas infectando morcegos é alta. Mais de 70 espécies de morcegos já foram descritas infectados por espécies do gênero *Trypanosoma* na África, Ásia, Europa, Austrália e nas Américas, em infecções simples ou mistas (Hoare, 1972; Molyneux e Stiles, 1991; Barnabe, Brisse e Tibayrenc, 2003; Lisboa *et al.*, 2008; Cottontail, Wellinghausen e Kalko, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010; Hamilton, Teixeira e Stevens, 2012; Lima *et al.*, 2012, 2013; Silva-Iturriza *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2014a).

Na Austrália, por exemplo, o primeiro tripanosoma descrito em morcego foi o *T. pteropi*, isolado de raposa voadora (*Pteropus gouldii*) em 1913 (Thompson, Godfrey e Thompson, 2014). Outras espécies descritas em morcegos da Austrália são *T. hipposideri* (encontrada infectando *Hipposideros bicolor albanensis*) (Mackerras e Mackerras, 1959), *T. vegrandis* (Thompson *et al.*, 2013), e *T. teixeirae* infectando *Pteropus scapulatus* (Barbosa *et al.*, 2016). Nas Américas, as primeiras detecções da infecção por tripanosoma em morcegos datam no início do século XX (Cartaya, 1910).

O subgênero *Tejeraia* já foi descrito infectando morcegos com a espécie *T. rangeli* ocorrendo no Panamá e na Colômbia (Cottontail, Wellinghausen e Kalko, 2009; Ramírez *et al.*, 2014a). No Brasil, também já foi descrito tanto em infecções simples quanto mistas com *T. cruzi* (Lisboa *et al.*, 2008; Maia da Silva *et al.*, 2009). Outras espécies classificadas como *T. lewisi*-like e, portanto, supostamente pertencentes ao subgênero *Herpetosoma*, também já foram descritas infectando morcegos: *T. aunawa* em *Miniopterus tristis*, na África, e *T. lineatum* em *Platyrrhinus lineatus* na Venezuela. Estas identificações, no entanto, não foram ainda corroboradas por análise molecular.

O subgênero *Trypanozoon* também já foi descrito infectando morcegos. Herrera e colaboradores (2004) verificaram infecção de *T. evansi* em morcegos frugívoros e insetívoros no Pantanal. Além disso, as espécies hematófagas de morcegos, quando infectadas por *T. evansi*, apresentam grande importância

epidemiológica uma vez que podem atuar como vetores deste parasito, visto que o mesmo pode ser transmitido pela saliva do morcego durante um repasto sanguíneo. As espécies do subgênero *Megatrypanum* já descritas em morcegos são *T. pifanoi*, *T. pessoai* e *T. leonidasdeanei* (Deanei e Sugay, 1963; Marinkelle e Duarte, 1968; Zeledón e Rosabal, 1969).

A infecção em morcegos pelas espécies do subgênero *Schizotrypanum*, que alberga, dentre outros parasitos, o agente etiológico da doença de Chagas nas Américas, é descrita tanto no Velho como no Novo Mundo. Segundo Hamilton e colaboradores, esta distribuição mundial é resultado de processos de migração desses animais entre o Velho e Novo Mundo há aproximadamente 5 milhões de anos (Hamilton *et al.*, 2012). À exceção de *T. cruzi*, estão incluídos nesse subgênero espécies de *Trypanosoma* de morcegos que também são capazes de infectar células de mamíferos e formar pseudocistos *in vitro*, embora *T. dionisii* tenha sido recentemente encontrado em tecido cardíaco humano (Dario *et al.*, 2016). As espécies deste subgênero têm morfologia muito similar, sendo essencial a aplicação de abordagens moleculares para a identificação taxonômica. Cabe ressaltar que, por conta disso, várias descrições de tripanosomas destes hospedeiros foram por anos sendo referidos apenas como isolados *T. cruzi*-like.

T. dionisii já foi descrito em morcegos da Europa e das Américas (Suriname, Colômbia e Brasil) e se desenvolve em barbeiros da família Cimicidae, mais especificamente na espécie *C. pipistrelli*, sendo este um possível vetor deste parasito (Gardner e Molyneux, 1988). No Brasil, *T. dionisii* já foi descrito em todos os biomas, infectando quatro das nove famílias de morcegos descritas no país: Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae e Noctilionidae.

T. c. marinkellei, subespécie de *T. cruzi*, foi descrita em morcegos do Panamá, Colômbia, Bolívia, Equador e Brasil. Experimentalmente não se conseguiu infectar células de camundongos e, mesmo sendo uma subespécie de *T. cruzi*, não confere imunidade à infecção por *T. cruzi* (Baker *et al.*, 1978; Cavazzana *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2015). Sua transmissão está associada com as espécies de barbeiros do gênero *Cavernicola*. A espécie *Cavernicola pilosa* é preferencialmente encontrada em ambientes compartilhados com morcegos, tais como cavernas e cavidades em árvores, favorecendo o ciclo deste parasito na natureza (Pinto *et al.*, 2015).

A espécie *T. vespertilionis*, já foi encontrada na Europa, Ásia, América e África; *T. hedricki* e *T. myoti*, na América do Norte; *T. erneyi* foi descrito recentemente em morcegos africanos pertencentes aos gêneros *Tadarida* e *Mops* (família Molossidae). Em 2013, Lima e colaboradores descreveram *T. livingstonei*, também em morcego africano. Recentemente, o morcego da espécie *Pteronotus parnellii*, capturado em Rondônia foi diagnosticado com uma nova espécie de tripanosoma: *T. wauwau*.

No continente americano, infecções por *T. cruzi* em quirópteros já foram descritas em: Panamá (TcBat), Colômbia (Tc I, TcIII, Tc IV e TcBat), Venezuela (Tc I e TcBat), Suriname (Tc II), Argentina (Tc II), Equador (TcBat) e nos Estados Unidos (TcI) (Cottontail, Wellinghausen e Kalko, 2009; García *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2014b; Pinto *et al.*, 2015; Lima, Espinosa-Álvarez, Pinto, *et al.*, 2015; Costa, da *et al.*, 2016; Argibay *et al.*, 2016; Hodo *et al.*, 2016). No Brasil, *T. cruzi* já foi descrito em morcegos de 7 famílias nos biomas Pantanal, Amazônia e Mata Atlântica: Phyllostomidae, Vespertilionidae, Thyropteridae, Noctulinidae, Emballonuridae, Mormoopidae e Molossidae (Marcili, A *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010; Costa, da *et al.*, 2016). Em relação às DTUs, já foram encontradas infectando estes animais no Brasil: TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcBat, além de infecções mistas por TcI+TcIV, TcI+TcII, TcI+TcIII/TcIV, e TcI+TcIII/TcIV (Jansen, Xavier e Roque, 2015).

Os morcegos parecem ter um importante papel nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*. Morcegos podem desempenhar um papel muito importante na dispersão de *T. cruzi* (e outros parasitos), pois eles conseguem facilmente circular entre o ambiente silvestre e antrópico. Estudos já mostraram que estes animais podem compartilhar espaço com barbeiros, os quais podem se alimentar em morcegos (Thomas, Rasweiler IV e D'Alessandro, 2007; Marcili, A *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2015). Esses triatomíneos são encontrados em folhas de palmeiras, ocos de árvores e também podem circular a noite entre as casas, que são lugares muito frequentados por colônias de morcegos. Transmissão congênita, embora raramente reportada em mamíferos silvestres, já foi verificada para *Molossus molossus* na Venezuela, onde tanto a fêmea quanto o feto apresentaram positividade para exame parasitológico e molecular (Añez, Crisante e Soriano, 2009).

1.6.3 Infecção por *Leishmania spp. em morcegos*

As descrições de infecção em morcegos por espécies do gênero *Leishmania* vêm sendo reportadas mais frequentemente na última década. O primeiro registro de infecção por esse parasito nesta ordem foi feito por Mutinga em (1975). Ele detectou, pelo método de sorologia, anticorpos de *L. donovani* em morcegos do Quênia. Depois Morsy (1987) também detectou o contato entre esses mamíferos e o parasita no Egito. Lima e colaboradores em 2008 confirmaram a infecção natural em morcegos ao isolar *L. infantum* em sangue de *Carollia perspicillata* (frugívoro) na Venezuela. Desde então outros grupos de pesquisa atentaram para a possibilidade de mamíferos dessa ordem também serem considerados como potenciais reservatórios de espécies de *Leishmania*, dadas as características importantes para dispersão e manutenção do parasito, como sua habilidade de locomoção e longevidade (Roque e Jansen, 2014). Além disso, seu comportamento de circular por diferentes áreas numa mesma noite e de se estabelecer em forros de casas para descanso, facilitam sua exposição aos vetores de *Leishmania sp.* Lampo e colaboradores (2000) comprovaram que flebotomíneos podem usar morcegos de várias famílias como fonte de alimentação, através de experimentação com *Lu. longipalpis*.

No Brasil, Savani e colaboradores (2010) detectaram nas espécies *Molossus molossus* e *Glossophaga soricina* infecção (simples) tanto por *L. infantum* e *L. amazonensis*. As espécies *M. rufus*, *Eumops auripendulus*, *E. glaucinus*, *Myotis nigricans*, *Artibeus lituratus*, *Sturnira lilium*, e *Nyctinomops laticaudatus* infectadas por *L. amazonensis*, numa região sem casos de Leishmaniose Visceral reportada e com casos raros de Leishmaniose cutânea. Em 2013, no Mato Grosso do Sul, houve a primeira detecção de morcegos de uma área não urbanizada infectados com a espécie *L. braziliensis*, e dois indivíduos apresentaram lesões na pele (Shapiro *et al.*, 2013). Em 2015, infecção por *L. infantum* em um indivíduo de *P. parnellii* (insetívoro) foi detectada no Maranhão (Costa, da *et al.*, 2015). Nesse mesmo ano, no México, *L. (L.) mexicana* foi detectada através de PCR em coração, fígado, baço e pele das espécies de morcegos *Ch. godmani*, *Glossophaga commissarisi*, *G. soricina*, *Sturnira lilium* e *Artibeus lituratus*, que inclusive apresentou lesão na pele, com confirmação da presença de *L.(L.) mexicana* (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015). Oliveira e colabora-

dores (2015) diagnosticaram a infecção em morcegos capturados somente em áreas urbanas endêmicas para Leishmaniose Visceral no estado de São Paulo. Dos 488 morcegos analisados, 117 estavam infectados, com maior porcentagem de infecção na pele. Os morcegos estavam infectados pelas espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* e um indivíduo apresentou infecção com as duas espécies. A infecção natural por *Leishmania* sp. em morcegos do Velho Mundo foi confirmada com isolamento nas espécies *Cardiodema cor* e *Nycteris hispida* com *L. tropica* e *L. major*, respectivamente (Kassahun *et al.*, 2015).

Esses estudos mostram que os morcegos estão inseridos no ciclo de transmissão de diferentes espécies de *Leishmania*, podendo potencialmente atuar como reservatórios, dependendo sempre de outros fatores que compõem a paisagem, como por exemplo ocorrência de outros animais domésticos ou silvestres, vetores, pressão antrópica, entre outros.

1.7 Bioma Mata Atlântica

Este bioma constitui um complexo de fisionomias vegetais e se estende por 17 estados do Brasil: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí. Existe ainda uma pequena parte na Argentina e Paraguai (SOS-Mata Atlântica, 2017). Quando os portugueses chegaram ao Brasil, a Mata Atlântica se estendia por mais de 1.300.000 Km². Nos dias atuais, restam apenas 8.5% de toda a área de vegetação. Isso se deve, em especial, aos fatores resultantes da ação do homem, tais como a pecuária, agricultura, corte para lenha, carvão vegetal e principalmente à construção de cidades. É importante mencionar que pelo menos 70% da população brasileira habita em áreas situadas onde originalmente se distribuía a Mata Atlântica (Oliveira, 2005). O bioma possui algumas famílias de vegetais típicas, como bromélias e orquídeas (epífitas), ipês, jacarandás, e palmito Jussara.

Dentre as várias fisionomias da Mata Atlântica, as principais são floresta de encosta e floresta semidecídua. Na floresta semidecídua, existe uma estacionalidade climática, com época do ano bem definida com estações seca e chuvosa. Está presente em maior parte no interior da Mata Atlântica. Já a flo-

resta de encosta, também denominada tecnicamente pelo IBGE Floresta Ombrófila Densa é úmida o ano todo e também multiestratificada, que é a que predomina no estado do Rio de Janeiro. Na mata de encosta estão associados alguns ecossistemas, como o manguezal, floresta de restinga, dentre outros. Dentro florestas ombrófilas densas temos as de terras baixas (< 50 m de elevação), submontanas (50–500 m) e montanas (500–1500 m) (Veloso, Filho e Alvez, 1991).

A Mata Atlântica tem alta diversidade de espécies e é considerada um *hotspot* mundial, com maior índice de biodiversidade e endemismo, sendo ao mesmo tempo a mais ameaçada (Myers *et al.*, 2000). De acordo com Costa *et al.* (2000), a Mata Atlântica concentra a maior diversidade de mamíferos do mundo e, dentre 904 espécies de mamíferos listadas na América do Sul, 229 se encontram na Mata Atlântica e 73 são endêmicas do bioma. Além disso, especula-se que muitas espécies já foram extintas em decorrência da redução do bioma sem que tenham sido descritas. O resultado desta eliminação de muitas populações é a perda da biodiversidade do bioma (Morellato e Haddad, 2000; Oliveira-Filho e Fontes, 2000).

Dentre alguns dos muitos mamíferos de médio e grande portes que podemos encontrar nesse bioma estão: *Dasyopus novencintus* (tatu-galinha), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá mirim), *Alouatta guariba* (bugio), *Nasua nasua* (quati), *Puma concolor* (onça parda), *Cuniculus paca* (paca), *Dasyprocta leporina* (cutia), *Pecari tajacu* (porco do mato), *Didelphis aurita* (gambá), além dos marsupiais *Marmosops incanus* e *Philander frenatus* e roedores *Blarinomys breviceps* e *Trinomys graciosus* (Carvalho, Oliveira e Pires, 2014). Em relação à ordem Chiroptera, já foram listadas pelo menos 113 espécies, distribuídas em 8 famílias para este bioma (Paglia *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Os morcegos conseguem voar por longos trechos numa só noite à procura de alimento e desempenham papéis ecológicos importantes. Além de possuírem grande potencial de mobilidade, a ocorrência de algumas espécies em determinados fragmentos é comumente influenciada pelo tipo de vegetação. Isso traz consigo alteração na configuração das espécies que são comuns em florestas secundárias e borda de floresta, como *Carollia pespicillata* e espécies do gênero *Artibeus*, descritas inclusive em ambientes com diferentes níveis de preservação. No entanto, outras espécies são mais vulneráveis a mudanças, como as espécies carnívoras.

Cabe lembrar que infectando morcegos há centenas de espécies de bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos, só para citar alguns grupos de parasitos que também compõem a biodiversidade de uma determinada área. É frequentemente reportada a influência que os hospedeiros sofrem em decorrência de alterações ambientais numa área, bem como o nível de preservação da mesma. Raras vezes, no entanto, são consideradas as alterações na microfauna de parasitos que decorrem das alterações ambientais. Mudanças na paisagem de um local podem resultar na mudança na composição da fauna de quirópteros, que por sua vez, também podem alterar a sua fauna de parasitos.

No Brasil, vários trabalhos descrevem infecções em morcegos por *Trypanosoma cruzi* (além de outras espécies de *Schizotrypanum*) e espécies do gênero *Leishmania*, reforçando a inserção desses mamíferos nos ciclos silvestres de transmissão destes parasitos. Embora saibamos que o bioma Mata Atlântica, mais especificamente o estado Rio de Janeiro, possui uma grande diversidade de espécies de morcegos, pouco se sabe sobre a diversidade de tripanosomatídeos que circulam nestes animais, e nem em que grau essa relação está configurada ao nível de preservação. Por isso, nossa hipótese é que embora a REGUA e a EFMA apresentem perfis similares na riqueza e diversidade de quirópteros, a circulação de diferentes espécies de tripanosomatídeos pode ser influenciada pelos diferentes níveis de preservação que há entre tais áreas. Este estudo pretende expandir o conhecimento sobre a diversidade de tripanosomatídeos circulando entre os morcegos no estado do Rio de Janeiro.

ro e discutir como esta diversidade é modulada pela fauna de morcegos em resposta a alterações na paisagem.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a infecção por tripanosomatídeos em morcegos provenientes de duas áreas de florestas de terras baixas da Mata Atlântica do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a riqueza e abundância relativa dos morcegos analisados, avaliando a influência do grau de antropização existente nas duas áreas;
- Diagnosticar a infecção por tripanosomatídeos em morcegos através de abordagens parasitológicas e moleculares;
- Determinar a prevalência e perfis de infecção por tripanosomatídeos na fauna de quirópteros, isolando e caracterizando as subpopulações de parasitos;
- Identificar os potenciais reservatórios destes tripanosomatídeos e a distribuição dos parasitos entre as áreas e a fauna de quirópteros avaliada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas estudadas e pontos de coleta

As áreas estudadas estão no bioma Mata Atlântica, de vegetação predominante Ombrófila Densa de terras baixas, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. A principal característica do bioma é a vegetação multi estratificada e de clima úmido.

A Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA) (22° 27' 10.62" S e 42° 46' 13.45" O), está situada região serrana do estado do estado do Rio de Janeiro, no município de Cachoeiras de Macacu que fica a aproximadamente 110 km da cidade Rio de Janeiro. É uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), de aproximadamente 7000 ha, com temperatura média de 23°C, com períodos com chuva nos meses de novembro a abril e tempo seco nos meses de maio a outubro (Veloso, Filho e Alvez, 1991).

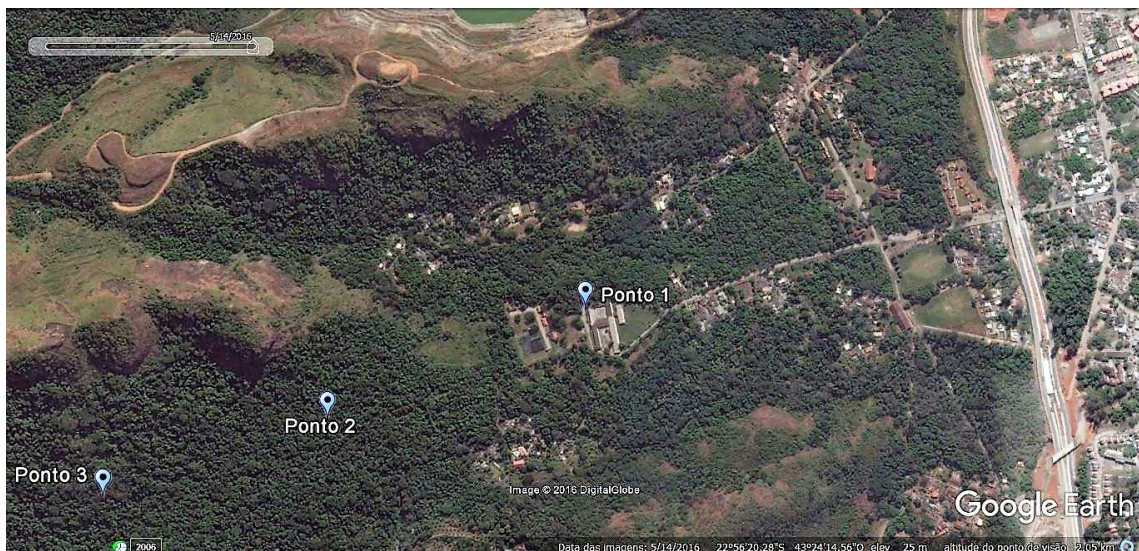
A Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica (EFMA) está situada na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro (22° 56' 24.04" S e 43° 24' 15.87" O), no bairro Jacarepaguá. Seu território inclui áreas de mata, ambientes preservados e outros sob forte influência antrópica, além de áreas com maior densidade humana, como é o caso da área onde funcionava a antiga instalação do hospital psiquiátrico Juliano Moreira. A temperatura média anual é de 28 °C na estação chuvosa e 19 °C na estação seca.

Apesar de estarem em um mesmo bioma e apresentarem o mesmo perfil de vegetação, estas duas áreas diferem muito no grau de preservação: na REGUA observa-se uma área mais bem preservada, com pouco uso do solo para pastagens, e grande cobertura vegetal heterogênea. Há espécies arbóreas e pouquíssimas construções ao redor (Figura 2). Por outro lado, a EFMA apresenta um grau de preservação bem mais baixo em sua borda, com forte presença humana, animais domésticos e de produção que, apesar do alto grau de desmatamento, recentemente tem sido alvo de programas de reflorestamento. Um fato que influencia a composição dessa paisagem degradada da EFMA é estar situada bem próxima ao centro urbano, favorecendo a maior circulação de pessoas e de veículos todos os dias (Figura 3).

Figura 2 - Foto aérea da Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), no município de Cachoeiras de Macacu/RJ, destacando os três pontos de captura de morcegos.



Figura 3 - Foto aérea da Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA), no município do Rio de Janeiro/RJ, destacando os três pontos de captura de morcegos



Até o momento não há trabalhos publicados sobre infecções por tripanosomatídeos na localidade de Guapiaçu, onde fica a REGUA. Já em relação à área onde se localiza o EFMA, sabe-se que já foi considerada endêmica para leishmaniose tegumentar, com casos humanos e caninos. Atualmente, após

ações de educação com a população, em especial, o número de casos foi drasticamente reduzido. Além disso, casos de leishmaniose visceral, com óbitos, também foram reportados nas proximidades da estação biológica (Souza, N. A. de *et al.*, 2015; Marzochi, 2016). Pontes (2015) avaliou pequenos mamíferos na região do maciço e detectou a existência de ciclos silvestres de *Leishmania* sp. e *T. cruzi* na área, com elevada taxa de infecção e parasitemia por *T. cruzi* em gambás (*Didelphis aurita*).

Em cada área de estudo, foram definidas 3 pontos de amostragem, a aproximadamente 140 m de altitude, de acordo com o grau de preservação do ambiente (Figura 4): o ponto 1, para ambos locais estudados, corresponde ao sítio de presença humana e degradação da paisagem vegetal. É uma área quase sempre frequentada por cães domésticos, com pastagens nas proximidades, bananais, construções, cercas de arame farpado e, no caso da EFMA, circulação de veículos com frequência. O ponto 2, que constitui um sítio de transição entre área de maior preservação para a de menor preservação, apresenta um perfil de vegetação madura, em processo de regeneração, com menos influência humana. Observa-se nela pouco desgaste do solo e presença de vegetação de médio porte (sub-bosque). O ponto 3 corresponde ao ponto de maior preservação, com um perfil de mata fechada e presença de árvores de dossel, serrapilheira. Nesse trecho o microclima é bem úmido e possui temperatura mais baixa que os outros pontos. Apesar das características em comum na definição dos pontos de coleta, o nível de preservação em cada um dos pontos é sempre bem maior na REGUA do que no EFMA. Foram realizadas 8 amostragens mensais intercaladas entre as áreas, sendo realizadas nos meses de setembro (2015), novembro (2015), março (2016) e maio (2016) na EFMA; e em outubro (2015), dezembro (2015), fevereiro (2016) e abril (2016) na REGUA.

Figura 4 - Locais de coleta de morcegos nos 3 pontos de captura, na Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA) e Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA)



Legenda: 1) ponto 1 da REGUA; 2) ponto 1 da EFMA; 3) ponto 2 da REGUA; 4) ponto 2 da EFMA; 5) ponto 3 da REGUA e 6) ponto 3 da EFMA.

4.2 Captura dos morcegos

A captura de morcegos ocorreu no período de setembro de 2015 a maio de 2016, sendo quatro meses (12 noites no total) para cada local de estudo, totalizando um esforço amostral de 38.880 m².hora rede, sendo 19.440 m².hora rede para cada área, 4.860 m².hora.rede por expedição e 1.620 m².hora.rede por noite. Para a sessão de captura dos morcegos foram utilizadas 10 redes de neblina medindo 9 m x 3 m, com malha de 35 mm), de acordo com Kunz e Kurta (1988), abertas por seis horas após o por do sol, durante três noites (uma para cada ponto de amostragem), de acordo com Brown (1968) e LaVal (1970). A cada 1h as redes eram checadas para retirada dos animais presos. Nas noites mais frias, cuja temperatura média chegava a 10°C, as rondas aconteciam de 30 em 30 minutos. De acordo com a licença de coleta de morcegos, as fêmeas identificadas como grávidas ou lactantes eram soltas no campo após a triagem e, portanto, não entraram nos cálculos de abundância e taxas de infecção.

4.3 Identificação dos morcegos

Os morcegos capturados foram retirados das redes de neblina utilizando-se luvas de couro e colocados individualmente em sacos de pano para serem levados até o laboratório de campo. No laboratório de campo, foram anotadas informações como hora da captura, temperatura, umidade relativa do ar e em qual ponto (1, 2 ou 3) ocorreu a captura. Em seguida, os morcegos foram preliminarmente identificados por especialistas, de acordo com um conjunto de caracteres externos, como coloração, padrão e textura da pelagem, forma da orelha, trago e uropatágio, seguindo informações de Dias (2002), Reis (2007), Dias e Peracchi (2008) e Simmons e Voss (1998).

As medidas de antebraço (em milímetros) foram realizadas utilizando paquímetro manual (precisão de 0,01 mm), além da determinação da massa corporal (em gramas), utilizando dinamômetro Pesola® (precisão de 0,1 g). Sexo e estágio reprodutivo foram determinados de acordo com Zórtea (2003). O hábito alimentar foi determinado de acordo com a classificação de Kalko (1996). A categoria etária foi determinada através da ossificação das epífises

das falanges, de acordo com Anthony (1998). A nomenclatura das espécies seguiu Nogueira et al. (2014).

Todas as análises preliminares realizadas no campo foram posteriormente corroboradas pelo grupo de taxonomistas do Dr. Ricardo Moratelli, colaborador do presente trabalho e pesquisador do Campus Fiocruz Mata Atlântica.

4.4 Procedimentos no campo com os morcegos

Após a identificação dos morcegos, os mesmos foram mantidos em sacos de tecido de algodão até a manhã do dia seguinte para a realização dos procedimentos de laboratório. Todo material biológico foi coletado no campo, em laboratório montado especialmente para esta finalidade (REGUA) ou em um laboratório físico existente adaptado para realização dos nossos procedimentos (EFMA).

Para contenção dos morcegos, foi utilizada uma associação de Cloridrato de Cetamina (100 mg/mL) e Acepromazina (100mg/mL) 9: 1, sendo 0,1mL desta combinação para cada 100 g de peso corpóreo do animal. Todo o corpo do animal foi higienizado com sabonete anti bactericida, álcool iodado e álcool 70%. Em seguida, foi feita uma tricotomia no local de retirada do sangue, para diminuir as chances de contaminação. Para um ambiente mais livre de contaminação possível, todos os procedimentos listados a seguir foram realizados próximos a um fogareiro. Assim como todos os instrumentos cirúrgicos utilizados (individualmente para cada morcego) em todo o procedimento foram previamente esterilizados.

Através de punção cardíaca em animal previamente anestesiado foi coletado aproximadamente 0,5 – 1 mL de sangue para os seguintes procedimentos:

- 1- inoculação em meio base NNN (Nicolle, Novy e Mc Neal) contendo meio líquido LIT (Liver Infusion Triptose);
- 2- inoculação em meio base NNN contendo meio líquido Schneider;
- 3- colocação de uma gota entre lâmina e lamínula para visualização ao microscópio óptico (exame direto); e
- 4- centrifugação e obtenção de soro e coágulo para armazenamento.

O meio NNN é o meio bifásico nutritivo, onde a base sólida é composta de sangue de coelho acrescido de Agar e Cloreto de Sódio e água destilada. Esse meio base é acrescido de: (i) meio LIT, contendo cloreto de sódio, Glicose, Triptose, Infusão de fígado, água destilada; ou (ii) meio Schneider® (Sigma S9895) enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

Após a separação de parte do sangue para realização das culturas e do exame à fresco, o restante do sangue coletado foi centrifugado a 3.000RPM por 10 minutos para obtenção de soro e coágulo. Cada tubo contendo soro/coágulo foi identificado com o número LBT/Campo e lacrado com parafilme na tampa.

Dado o tamanho dos espécimes, nem sempre foi possível a realização de todas as etapas descritas acima para o sangue coletado. Neste caso, era priorizada a realização de: (i) exame a fresco; (ii) hemocultivo em NNN/LIT; (iii) hemocultivo em NNN/Schneider; e (iv) obtenção de soro e coágulo.

Após coleta de sangue, os morcegos foram submetidos à eutanásia através de injeção intracárdica de Cloreto de Potássio 10%. Após a confirmação da morte do animal, verificada pela ausência dos batimentos cardíacos, dois fragmentos de pele, baço e fígado foram coletados. Um fragmento em solução salina, acrescida de antibiótico e antifúngico (10 mg de estreptomicina, 25 µl anfotericina B e 10.000 UI de penicilina por mL - Sigma®), e outro fragmento em etanol absoluto para realização do diagnóstico molecular. Para a coleta dos tecidos, foi realizada tricotomia para retirada do pêlo da região abdominal com auxílio de uma lamina. Com a utilização de instrumental estéril, primeiramente era realizada a coleta dos fragmentos de pele. Como o mesmo instrumental, abriu-se a cavidade abdominal e um novo instrumental estéril era utilizado para retirada de fragmentos de baço e fígado.

Após 24 h estocados a 4 °C, os tecidos em salinas foram transferidos para tubos contendo meio NNN/Schneider. Com auxílio de agulhas de seringa, cada tecido foi coletado e transferido para o tubo contendo meio NNN/Schneider. Na REGUA, essa etapa foi realizada no laboratório de campo próximo ao fogareiro, como já mencionado. Na EFMA, dada a proximidade com a FIOCRUZ, os tecidos em salina eram levados para o LABTRIP e o procedimento realizado dentro de cabine de biossegurança nível 2 (Fluxo Laminar).

No campo, todos os tubos contendo amostras de sangue, tecidos em salinas, soros e coágulos foram devidamente rotulados. Informações como número de campo, número de laboratório, data de coleta, local e operador foram preenchidos no momento da coleta.

4.5 Diagnóstico Parasitológico

4.5.1 Exame a fresco

Para a verificação de formas flageladas circulantes no sangue, foi depositada uma amostra de sangue entre lamina e lamínula, identificado e armazenado em câmaras úmidas até o final das necropsias. Imediatamente após os procedimentos, todos os campos das lâminas foram observados em microscópio óptico em aumento de 400x e o resultado definido como positivo em caso de observação de formas flageladas semelhantes a *T. cruzi*.

4.5.2 Acompanhamento das culturas

Os tubos contendo as amostras foram mantidos dentro de caixas de papelão, devidamente lacradas em temperatura ambiente até a chegada ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos. Ao chegar ao laboratório, todas as amostras foram conferidas e anotadas em planilhas para posterior rastreamento. Os tubos foram dispostos em estufa a 28 °C.

Após 10 dias em ambiente estéril de cabines de segurança biológica, parte do material dos tubos é coletado com o auxílio de pipetas estéreis de 3 mL de vidro, dispostas em laminas e visualizadas ao microscópio. Quando observados parasitos nas culturas, os mesmos foram submetidos a repiques para a amplificação da população até obter-se, aproximadamente 10^7 a 10^8 parasitas flagelados, para posterior processo de extração de DNA. Parasitos derivados de todas as culturas positivas foram depositados na Coleção Institucional de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (COLTRYP).

Os tubos contendo hemocultivo onde foram visualizados parasitas em alguma das observações, mas onde não foi possível ampliar a população parasitária e obter a cultura de parasitos, foram submetidos ao acréscimo de mais

meio líquido LIT, transferidos para um tubo Falcon de 1,5 mL e centrifugados por 15 min a 4 °C. Em seguida, foram ressuspensos em aproximadamente 10 ml de PBS 10% para lavagem e, após secagem da massa de células, estocado a - 20°C para posterior uso no processo de extração de DNA.

As culturas negativas foram acompanhadas quinzenalmente por até cinco meses. Os tubos contendo tecidos em meio bifásico NNN/Schneider foram mantidos exatamente como os tubos de hemocultivos. Exceto que foram visualizados no dia seguinte à chegada ao laboratório e, após a primeira leitura, foram semanalmente visualizadas ao microscópio óptico por até dois meses.

4.5.3 Extração Fenol – Clorofórmio

As massas de parasitos preparadas em tubo falcon de 15mL acima foram acrescidas de 1ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, ácido Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, pH 8.0), sendo homogeneizadas no próprio tubo falcon e, em seguida, transferidos 500 µL da mistura em dois tubos do tipo eppendorf (estéreis), cada: um microtubo foi submetido à extração de DNA, enquanto o segundo microtubo foi armazenado à - 20°C para possíveis repetições.

No microtubo da extração foram acrescentados os seguintes reagentes: 50 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e proteinase K (10 mg/mL). Em seguida, os microtubos foram mantidos à 56 °C em agitação por 2 h. Após as 2h de incubação, as amostras foram submetidas à segunda parte da extração do DNA que é a fase de purificação. Essa fase consiste em lavagens com Fenol-Clorofórmio e Clorofórmio, sendo três lavagens com Fenol-Clorofórmio seguidas de duas com Clorofórmio, para a obtenção de um DNA mais puro o possível (Sambrook e Russel, 2001). As amostras cujas massas não conseguimos isolamento foram lavadas 2 vezes com Fenol-Clorofórmio e 1 vez com Clorofórmio, a fim de minimizar a perda do DNA entre as lavagens.

Foram acrescentados 500 µL de Fenol-Clorofórmio em cada amostra, homogeneizando até que se verificasse um mistura de cor leitosa, centrifugado em seguida durante 3 min a 16.000 g, sendo o sobrenadante sempre coletado nas três etapas e transferido para um novo microtubo limpo. O mesmo foi feito

com o Clorofórmio, após acréscimo de 500 µL as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para novo microtubo. A etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA extraído. Foram adicionados etanol absoluto (dobro do volume da amostra) e acetato de sódio (10% da amostra), centrifugados por 10 min. A seguir, após o desprezo do sobrenadante, foram adicionados 500 µl de etanol 70%, com centrifugação por 12 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os microtubos ficaram invertidos num papel filtro para secagem. Uma vez secos, foram acrescentados 150 µl de TE (para os parasitos isolados) ou 40 µl no material derivado culturas sem isolamento do parasito. Todo o material foi estocado a – 20 °C até sua utilização nas reações de PCR.

4.5.4 PCR para o gene 18S rRNA

Essa etapa da caracterização teve como alvo o 18S SSU rDNA, que consiste na subunidade menor do gene ribossômico, um dos alvos mais utilizados em estudos de filogenia e taxonomia de tripanossomatídeos e, portanto, aquele que apresenta o maior número de sequencias depositadas (Stevens, 2008). Assim, o DNA extraído foi submetido à *Nested* PCR, que consiste em uma PCR com duas etapas para a região 18S rRNA que é variável, de acordo com Noyes e colaboradores (1999). Usando a Go Taq – Hot Start Green Master Mix (Promega), foram adicionados os seguintes reagentes à 2 µL de DNA extraído: 0,5 µl de cada iniciador, que amplifica a região maior do 18S (Oligo Try R e Oligo Try F) (TRY927F5' GAAACAAGAAACACGGGAG3' e TRY927R–5'CTACTGGGCAGCTTGG3'), com concentração de 16 pmol/µl; acrescido de 12,5 µl da Go Taq Master Mix e; o restante com água estéril para um volume total de 25 µl. A reação foi realizada na seguinte ciclagem: desnaturação a 95°C por 15 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s; anelamento por 55 °C por 60 s; 72 °C por 92 s. O tamanho do fragmento nessa etapa é de 900pb.

A segunda etapa da *Nested* PCR consiste em utilizar iniciadores a uma concentração igual ao da primeira etapa, de 16 pmol, sendo dessa vez para a região menor do alvo: SSU561F 5' TGGGATAACAAAGGAGCA 3' e SSU561R 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3. A segunda reação foi preparada nas mesmas condições que a primeira, usando 2 µl como DNA do produto da pri-

meira etapa diluído 1:10 em água estéril (45 µl de água pura para 5 µl do produto).

Para as amostras de culturas sem isolamento do parasito, a reação foi preparada e calculada para adição de 5 µl de DNA, em ambas as etapas.

4.5.5 PCR para o gene gGAPDH

As amostras que não amplificaram na PCR utilizando o alvo 18S, ou cujas sequencias dos produtos amplificados não permitiram a identificação do agente etiológico, foram submetidas à PCR utilizando como alvo o gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase (gGAPDH), de acordo com Borghesan e colaboradores (2013). Foram adicionados ao DNA extraído: 1µl de cada iniciador (0,4 µM) (GAPTRY – F 5'GGBCGCATGGTSTTCCAG'3) e (GAPTRYr - R 5'CCCCACTCGTTRTCRTACC'3); 2,5 µL de tampão; 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 2 µL de dNTP (200 µM); 0,3 µL de Taq Platinum e o restante com água estéril para um volume total de 25 µl.

A reação foi realizada na seguinte ciclagem: desnaturação por 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; anelamento por 2 min a 55 °C; extensão por 2 min a 72 °C, tempo total de 2 h e 57min. O tamanho do fragmento nessa etapa é de aproximadamente 800 pb.

4.5.6 Eletroforese em gel de agarose

Para visualizar a amplificação dos produtos obtidas em ambas as PCRs, as amostras (5 µl) foram aplicadas em gel de Agarose 2%, feito em tampão TBE (Tris Base 89 mM, Ácido Bórico mM e EDTA 2 mM pH 8.0). O peso molecular utilizado foi de 100 pb (faixa de 100 a 1000 pb), com aplicação de 3 µl. A corrida foi realizada em cuba horizontal BioRad em tampão TBE 1X a uma corrente constante de 90V por aproximadamente 60 min. Nos primeiros 30 min o gel foi mergulhado em solução de Brometo de Etídio, e deixado mais 30 min em corrida. A visualização do produto amplificado foi feita com transiluminador UV (Gel logic 212 PRO Carestream). O produto amplificado obtido nesta etapa

é de aproximadamente 600 pb para o 18S (Noyes *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008) e de 800 pb para o gGAPDH (Borghesan *et al.*, 2013).

4.5.7 Purificação de DNA

Após amplificação e confirmação de sua positividade em gel de agarose, as amostras positivas foram submetidas a purificação do DNA utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA / Gel Band Purification (GE, Healthcare), cujo protocolo consiste em adicionar tampão tipo 3 (captura) (500 µl de tampão para 100 µl de amostra) no produto amplificado e em seguida passar pela coluna de purificação, através de centrifugação por 30 s a 16.000 g. Em seguida, foi adicionado 500 µl de tampão tipo 1 (lavagem) na coluna, por mais 30 segundos de centrifugação. Por fim, ocorreu a adição de 30 µl de tampão de Eluição para retirada do DNA retido na coluna. Após esse procedimento foi realizada eletroforese em gel de Agarose nas mesmas condições descritas acima para confirmação da purificação, através da visualização de bandas entre 500 e 600 pb no gel para o 18S e de aproximadamente 800 pb para o gGAPDH.

4.5.8 Sequenciamento e análises das sequências

As amostras devidamente purificadas foram enviadas à Plataforma de Sequenciamento (RPT01A) – PDTIS/Fundação Oswaldo Cruz – RJ. O preparo das amostras para envio consistiu em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 µL contendo DNA, iniciador (F) e água e outro tubo correspondente contendo o mesmo, só que com o iniciador Reverse (R). O volume máximo para a reação é de 7,5 µl, sendo 1 µl do iniciador para o alvo de interesse a 3,2 pmol. Os outros reagentes são adicionados de acordo com a quantidade do produto purificado. Normalmente é utilizado 5 µL de DNA e 1,5 µL de água estéril, porém quando não se obtém muito produto purificado, é preciso adicionar um pouco mais de DNA à reação, ajustando assim, o volume da água para que ao final se mantenha o volume total de 7,5 µL. O sequenciamento ocorreu conforme Sanger (1975), utilizando kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Foram utilizados 2 µL de DNA,

1,88 uL de Tampão 5X, 0,25 uL de BigDye e água Milli-Q. A reação seguiu com a ciclagem de 35 ciclos de 96 °C durante 15 s, 50 °C durante 10 s e 60 °C durante 4 min.

As reações foram realizadas em máquina GeneAmp e análise automática de sequências realizada pelo analisador de DNA (ABI 3730X Applied Biosystem)

Após o resultado do sequenciamento, as sequências foram pareadas (F e R) e editadas no programa SeqMan – DNASTar (Lasergene, 1994). A edição foi realizada com base na observação de complementariedade das sequências, bem como presença ou não de picos curtos e duplos, ou até mesmo se uma das fitas estava muito curta. Após a edição, as sequências editadas foram salvas (com extensão fasta) e esse arquivo foi carregado no site NCBI - GenBank a fim de comparar as sequências editadas com sequências já depositadas por outros usuários. Esse último procedimento se chama Blast. Para identificação da espécie e/ou DTU de *T. cruzi*, adotamos como critério a similaridade com sequências que apresentavam cobertura e identidade igual ou maior que 98%.

4.5.9 Análise filogenética

Foram incluídas nesta análise apenas as espécies confirmadas pelo critério anterior e cujas sequências não continham picos duplos e possuíam tamanho mínimo de 400 pb. O alinhamento com das sequências com as sequências encontradas no Genbank foram alinhadas e editadas no programa Bioedit (Hall, 1999) A árvore filogenética com o gene 18S foi produzida utilizando o melhor modelo de substituição nucleotídica escolhido no programa *jModelTest* versão 2.1, o Kimura 2 parâmetros (K2 +G) (Kimura, 1980). O método probabilístico usado foi de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood – ML*), usando o programa Mega versão 7. A árvore com o alvo gGAPDH, seguiu o o método de distância Neighbo Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987) e também o modelo Tamura Nei (TN 9 + G) (Tamura e Nei, 1993).

4.6 Diagnóstico molecular frente à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*

4.6.1 Extração de DNA

As amostras de pele, baço e fígado coletadas em etanol absoluto foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification, da Promega, Madison, EUA. Uma etapa anterior à utilização do kit consistiu na hidratação dos tecidos com água MiliQ, por três vezes. Em seguida, foram secos em papel filtro para então dar início ao processo de extração, de acordo com o fabricante. Fragmentos dos tecidos medindo aproximadamente de 0,5 a 1 cm foram colocados em tubos de 1,5 mL (tipo eppendorf) estéreis, juntamente com solução de lise nuclear e proteinase K (20 mg/mL), e deixados sob temperatura de 55 °C por 3 h. Após as 3 h, foram adicionados em cada tubo 200 µL de solução de precipitação proteica para a separação de restos celulares e proteínas do DNA. Após centrifugação por 4 min a 14.000 g, torna-se visível ao fundo do tubo a massa proteica, enquanto o DNA fica no sobrenadante. Esse sobrenadante contendo o DNA foi então transferido para um tubo contendo 600 µL de isopropanol, dando início à etapa de precipitação do DNA. Nesta etapa é possível visualizar uma massa branca se formando. Após centrifugação por 1 min a 14.000 g, foi descartado o sobrenadante e adicionados 600 µL de etanol absoluto. E por último, após nova centrifugação com descarte novamente do sobrenadante, foram adicionados 600 µL de etanol 70%. O DNA foi ressuspendido em solução de rehidratação (100 µl) e incubado a 65 °C por 1h até ser estocado no freezer a -20 °C até a etapa de PCR.

Em cada reação de extração foram usados controles negativos (tecidos de hamsters não infectados) e positivos (baço ou fígado de hamsters experimentalmente infectados) e oriundos do biotério do Instituto Oswaldo Cruz. Os animais do controle positivo foram experimentalmente infectados com cepa de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) obtida junto à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC e todos os tecidos haviam sido previamente testados.

4.6.2 PCR com alvo para o kDNA de *Leishmania sp.*

Para a reação, foi utilizado o Kit comercial Pure Taq Ready To Go – PCR Beads (GE Healthcare). O alvo escolhido para este estudo foi o fragmento correspondente à região do minicírculo do gene kDNA de *Leishmania*. Esses iniciadores foram desenvolvidos por Degrave (1994) e previamente utilizados para diagnóstico da infecção em mamíferos silvestres por Roque, 2010 e Cassia-Pires (2014): (5'- GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA3') e 152R (5' - (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3').

O kit Pure Taq Ready To Go já vem com a enzima DNA polymerase, dNTPs e tampão de PCR, todos liofilizados em uma micro esfera. Para um volume total final de 25 µl, as concentrações dos reagentes são: 2.5 unidades de Pure Taq DNA polymerase, 200 µM de cada dNTP, 50 mM de KCl e 1.5 mM de MgCl₂. Portanto, apenas necessitando da adição dos iniciadores específicos para kDNA, como comentado acima (10 pmol), 2 µl do DNA a ser testado e água pura (MiliQ). Também foram incluídas nas reações as amostras controles da extração (positivo e negativo), além do controle da PCR, que é 25 µL da MIX. A reação tem duração de aproximadamente 2 h, com a seguinte ciclagem: desnaturação – 1min (94 °C); anelamento – 1 min (60 °C); extensão – 30 s (72 °C) e extensão final – 5 min (72 °C) no Termociclador Esco Swift MaxPro da Eppendorf.

4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese numa corrente constante de 110 V por aproximadamente 50 min numa cuba de eletroforese vertical (BioRad).

Foram aplicados no gel polimerizado (acrilamida 8%) 6 µl do produto amplificado mais tampão de amostra, cuja composição: 125 mM Tris-HCl; 4% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); 0,002% de azul de bromofenol; e glicerol 20%. Além, das amostras e dos controles, foi aplicado também o peso molecular de 50 pb (Promega, Madison, EUA). O tampão de corrida utilizado na cuba foi o TBE. Para a visualização da corrida, os géis foram corados por Nitrato de

Prata, através do Kit DNA Silver Staining (GE Healthcare). São 4 as etapas e respectivas soluções: Fixação em etanol 24%; coloração por Prata em si; Revelação (com a adição de Tiosulfeto de Sódio 2% e Formaldeído 37%); e Solução de interrupção da reação e conservação dos géis. Os géis tiveram imagens documentadas através do densitômetro GS-800® (Bio-Rad, Hercules, EUA).

Amostras consideradas positivas apresentam bandas de tamanho que pode variar entre 120 pb a 140 pb (Rodgers, Popper e Wirth, 1990; Marques *et al.*, 2006).

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Microsoft Excel utilizando o teste Qui-quadrado, sendo consideradas significativas quando o valor calculado de p foi menor que 0,05.

4.8 Aspectos éticos

As capturas foram realizadas sob a Licença Permanente IBAMA/ICMBio de número 19037-1, com emissão em 25/05/2009, de responsabilidade do pesquisador Ricardo Moratelli. Os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Fiocruz (licença L-81/12). Todos os procedimentos também foram realizados de acordo com as normas de biossegurança e todo o lixo biológico produzido durante a expedição foi levado para descontaminação e descarte nas dependências da Fiocruz.

5 RESULTADOS

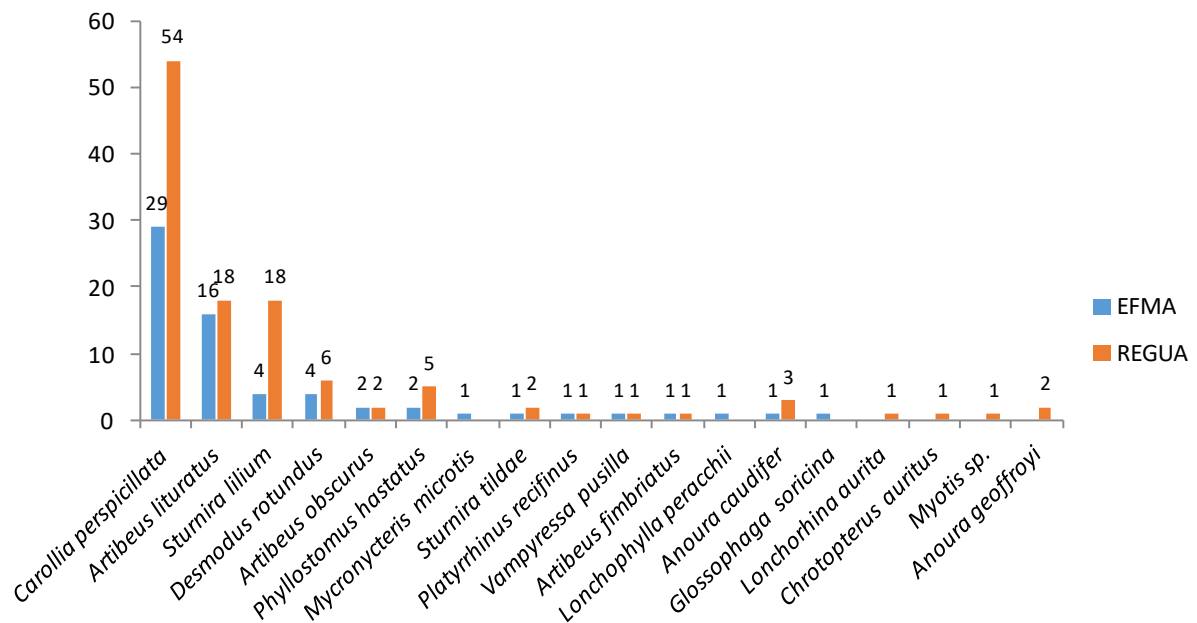
5.1 Quiropterofauna analisada

Foram analisados ao todo 181 morcegos (113 machos e 68 fêmeas) pertencentes a 18 espécies diferentes, sendo 116 (64% do total de capturados) provenientes da REGUA e 65 (36%) da EFMA. À exceção de um único indivíduo do gênero *Myotis*, pertencente à família Vespertilionidae (capturado na REGUA), todos os demais morcegos capturados pertencem à mesma família, Phyllostomidae.

A riqueza de espécies foi similar entre as duas áreas: quinze na REGUA e quatorze na EFMA (Figura 5). As duas espécies mais capturadas em ambas as áreas foram *Carollia perspicillata* [n=54 (47%) na REGUA e n= 29 (45%) na EFMA] e *Artibeus lituratus* [n=18 (16%) na REGUA e n=16 (25%) na EFMA]. Além destes, *Sturnira lilium* também foi bastante capturada na REGUA [n=18 (16%)]. A espécie hematófaga *Desmodus rotundus* foi capturada nas duas áreas, sendo seis (5%) indivíduos na REGUA e quatro (6%) na EFMA. Todas as demais espécies foram capturadas em número menor que quatro indivíduos durante todo o trabalho (Figura 5).

Algumas espécies foram capturadas somente em uma das áreas: *Anoura geoffroyi*, *Chrotopterus auritus*, *Lochorrina aurita* e *Myotis* sp, capturadas somente na REGUA e, *Glossophaga soricina*, *Lonchophylla peracchii* e *Myzomycotis microtis* capturadas somente na EFMA.

Figura 5 - Riqueza e abundância de morcegos capturados em 4 expedições científicas para cada uma das áreas: Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).



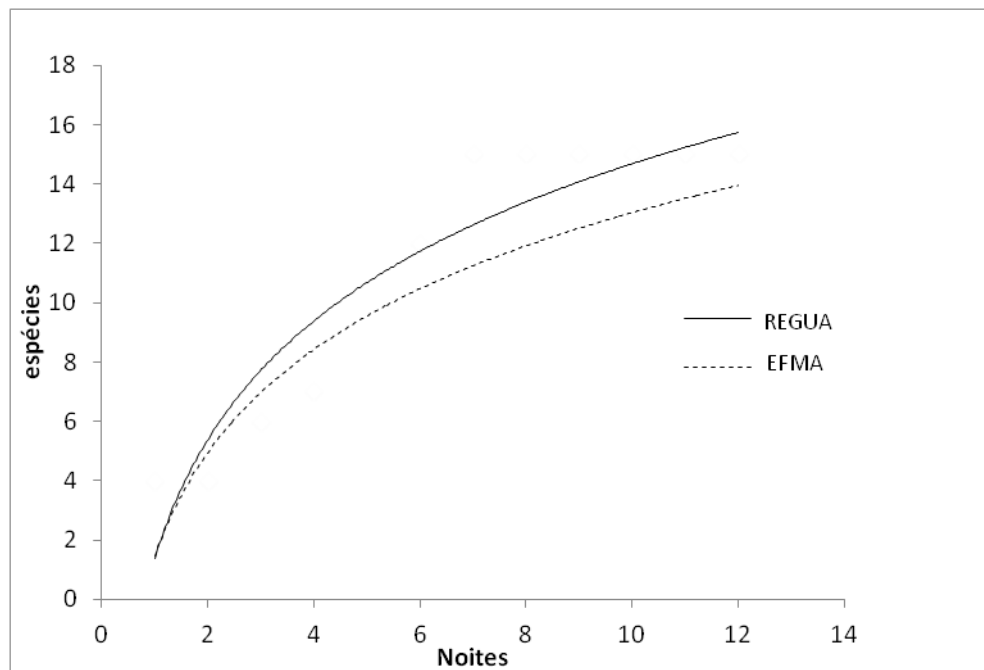
Em relação à captura de indivíduos por ponto em cada área de estudo, temos na REGUA que o maior número de capturas foi observado no ponto 2 [n=48 (41%)], seguido dos pontos 1 e 3, [n=40 (34%)] e [n=28(24%)], respectivamente (Tabela 2). Entre as espécies mais abundantes, a maior captura das espécies *C. perspicillata* e *A. lituratus* aconteceu no ponto 2, enquanto que a espécie *S. liliium* foi mais abundante no ponto 1 (com maior influência antrópica). Já na EFMA, houve maior captura nos os pontos 1 e 2 [n=23 cada(35%)]. Com relação à distribuição das espécies mais abundantes, *C. perspicillata* e *S. liliium* foram mais abundantes no ponto 2, enquanto que *A. lituratus* foi mais abundante no ponto 1 (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das espécies de morcegos capturadas por área [Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapi-açu (REGUA)] e por ponto de amostragem (1, 2 ou 3).

Espécies	Campo / Pontos					
	EFMA			REGUA		
	1	2	3	1	2	3
<i>Anoura caudifer</i>	-	-	1	2	1	-
<i>Anoura geoffroyi</i>	-	-	-	2	-	-
<i>Artibeus fimbriatus</i>	-	-	1	1	-	-
<i>Artibeus lituratus</i>	8	2	6	7	8	3
<i>Artibeus obscurus</i>	1	1	-	1	1	-
<i>Carollia perspicillata</i>	9	11	9	11	26	17
<i>Chrotopterus auritus</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Desmodus rotundus</i>	1	2	1	1	4	1
<i>Glossophaga soricina</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Lonchophylla peracchii</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Lonchorrina aurita</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Mycronycteris microtis</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Myotis</i> sp.	-	-	-	1	-	-
<i>Phyllostomus hastatus</i>	2	-	-	5	-	-
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	-	-	1	-	-	1
<i>Sturnira liliium</i>	1	3	-	8	6	4
<i>Sturnira tildae</i>	1	-	-	-	-	2
<i>Vampyressa pusilla</i>	-	1	-	-	1	-
Total de indivíduos	23	23	19	40	48	28
Total de espécies	7	9	6	11	8	6

Em relação à riqueza de espécies por ponto, na REGUA o ponto 1 foi o de maior riqueza, com onze espécies diferentes, enquanto na EFMA foi observado a maior riqueza no ponto 2, com nove espécies diferentes. A figura 6 mostra o acúmulo de espécies para ambas as áreas por noite de captura.

Figura 6 - Curva de acumulação de espécies capturadas na Reserva Ecológica de Guapiaçu/RJ e Estação Biológica Fiocruz Mata Atlântica/RJ



Em relação ao hábito alimentar, houve maior captura de morcegos com hábito frugívoro (alimentam-se de frutos), em ambas as áreas de estudo. Quanto aos hematófagos (sangue), tivemos maior número de captura no ponto 2, em ambas as áreas de estudo. Com relação aos insetívoros (insetos voando ou pousados), na EFMA, tivemos apenas uma ocorrência e foi no ponto 1, ao passo que na REGUA houve duas ocorrências, ficando distribuídas nos pontos 1 e 2. Os nectarívoros (flores, néctar e pólen) foram ausentes no ponto 1 da EFMA, com maior ocorrência no ponto 2, enquanto que na REGUA, eles foram ausentes no ponto 3 e com maior ocorrência no ponto 1. Em relação aos morcegos onívoros (flores, frutos, insetos, vertebrados, etc), obtivemos apenas duas ocorrências na EFMA (ambas no ponto 1), enquanto que na REGUA tivemos cinco capturas, todas também no ponto 1. O hábito carnívoro (tetrápodes) é relatado apenas para um dos morcegos coletados (*C. auritus*), capturado no ponto 1 da REGUA (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição do número de indivíduos coletados por área e ponto em relação aos seus hábitos alimentares. O número de espécies diferentes é apresentado entre parênteses.

Hábito alimentar	Campo/Ponto								Total Geral
	EFMA				REGUA				
	1	2	3	Total	1	2	3	Total	
Carnívoro	-	-	-	-	1 (1)	-	-	1 (1)	1 (1)
Frugívoro	20 (5)	18 (5)	17 (4)	55 (8)	28 (5)	42 (5)	27 (5)	97 (8)	152 (8)
Hematófago	1 (1)	2 (1)	1 (1)	4 (1)	1 (1)	4 (1)	1 (1)	6 (1)	10 (1)
Insetívoro	-	1 (1)	-	1 (1)	1 (1)	1 (1)	-	2 (2)	3 (3)
Nectarívoro	-	2 (2)	1 (1)	3 (3)	4 (2)	1 (1)	-	5 (2)	8 (4)
Onívoro	2 (1)	-	-	2 (1)	5 (1)	-	-	5 (1)	7 (1)
Total geral	23	23	19	65	40	48	28	116	181

Em relação à riqueza de espécies de morcegos ao longo das expedições, somente na segunda expedição de cada área de estudo houve diferença no padrão de ocorrência, sendo dezembro/2015 com quinze espécies e Novembro/2015 com seis espécies, na REGUA e EFMA, respectivamente.

As espécies do gênero *Anoura* foram capturadas apenas no verão na REGUA (dezembro/fevereiro) e na primavera na EFMA (setembro); *A. fimbriatus* ocorreu apenas no verão na REGUA e na primavera na EFMA; *A. lituratus* ocorreu em todas as expedições na REGUA e só não ocorreu em setembro na EFMA; *A. obscurus* ocorreu em fevereiro na REGUA e em novembro e maio na EFMA; *C. perspicillata* ocorreu em todas as expedições em ambas as áreas; *D. rotundus* ocorreu em outubro e dezembro na REGUA, enquanto que na EFMA só não ocorreu em maio; *P. hastatus* ocorreu em todas as expedições na REGUA e em novembro e maio na EFMA; *P. recifinus* ocorreu na REGUA em dezembro e na EFMA em maio; *S. lilum* só não ocorreu em fevereiro na REGUA e

em setembro na EFMA; *V. pusila* ocorreu apenas em fevereiro na REGUA e em março na EFMA (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Distribuição das espécies coletadas na REGUA em cada expedição

Espécies	Expedições				Total geral
	1º	2º	3º	4º	
<i>Anoura caudifer</i>	-	1	2	-	3
<i>Anoura geoffroyi</i>	-	2	-	-	2
<i>Artibeus fimbriatus</i>	-	-	1	-	1
<i>Artibeus lituratus</i>	3	4	7	4	18
<i>Artibeus obscurus</i>	-	-	2	-	2
<i>Carollia perspicillata</i>	17	11	7	19	54
<i>Chrotopterus auritus</i>	-	1	-	-	1
<i>Desmodus rotundus</i>	3	3	-	-	6
<i>Lonchorhina aurita</i>	-	-	1	-	1
<i>Myotis sp.</i>	-	-	-	1	1
<i>Phyllostomus hastatus</i>	2	1	1	1	5
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	-	1	-	-	1
<i>Sturnira lilium</i>	5	8	-	5	18
<i>Sturnira tildae</i>	-	1	-	1	2
<i>Vampyressa pusilla</i>	-	-	1	-	1
Total espécie	5	10	8	6	
Total geral	30	33	22	31	116

Tabela 5 – Distribuição das espécies coletadas na EFMA em cada expedição

Espécies	Expedições				Total geral
	1º	2º	3º	4º	
<i>Anoura caudifer</i>	1	-	-	-	1
<i>Artibeus fimbriatus</i>	1	-	-	-	1
<i>Artibeus lituratus</i>	-	5	7	4	16
<i>Artibeus obscurus</i>	-	1	-	1	2
<i>Carollia perspicillata</i>	9	5	8	7	29
<i>Desmodus rotundus</i>	2	1	1	-	4
<i>Glossophaga soricina</i>	-	-	1	-	1
<i>Lonchophylla peracchii</i>	1	-	-	-	1
<i>Mycronycteris microtis</i>	-	-	1	-	1
<i>Phyllostomus hastatus</i>	-	1	-	1	2
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	-	-	-	1	1
<i>Sturnira lilium</i>	-	2	1	1	4
<i>Sturnira tildae</i>	-	-	1	-	1
<i>Vampyressa pusilla</i>	-	-	1	-	1
Total espécie	5	6	8	6	
Total geral	14	15	21	15	65

5.2 Exame a fresco

Apenas uma amostra foi positiva no exame a fresco. A amostra foi coletada de *S. lillium*, na REGUA (LBT 7559), na última expedição. Essa amostra também foi positiva na hemocultura com isolamento tanto para sangue inoculado em meio LIT como em meio Schneider.

5.3 Infecção em amostras de sangue e caracterização molecular

Um total de conte e quatro morcegos (13%) apresentaram hemocultivos (em LIT e/ou Schneider) positivos, sendo dezessete provenientes da REGUA e 7 da EFMA. A diferença entre as taxas de infecção (15% na REGUA e 11% na EFMA) não foi estatisticamente significativa ($p=0,46$).

Considerando as taxas de infecção por ponto, na REGUA houve mais morcegos infectados no ponto 3, com 21% dos positivos para essa área. Enquanto que para a EFMA, o ponto com maior taxa de infecção foi o ponto 2, com 22% dos positivos para esse campo. Nenhum morcego foi positivo no ponto 3 na EFMA (tabela 6). As diferenças de taxas de infecção entre os pontos não foram estatisticamente significante nem na REGUA ($p= 0,51$) nem na EFMA ($p= 0,07$).

Tabela 6 – Taxa de positividade por culturas de sangue em morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA), dividido por ponto de amostragem (1, 2 ou 3).

Ponto	EFMA	REGUA	Total
1	9%	13%	11%
2	22%	13%	15%
3	0%	21%	13%
Total	11%	15%	13%

Em relação às espécies infectadas, um total de seis espécies diferentes foram positivas na EFMA e/ou REGUA. Na EFMA, foram quatro espécies diferentes: *C. perspicillata* (N=4; 13,8%), *A. lituratus* (N=1; 6%), *S. lillium* (N=1;

25%) e *D. rotundus* (N=1; 25%) Na REGUA foram cinco espécies: *C. perspicillata* (N= 7; 13%), *S. liliium* (N=5; 28%), *D. rotundus* (N=3; 50%), *A. caudifer* (N= 1; 33%) e *A. geoffroyi* (N=1; 50%).

Em relação à taxa de infecção por hábito alimentar, na REGUA o que apresentou maior taxa de infecção foi o hematófago, com 50% de indivíduos infectados. E na EFMA foi observado o mesmo perfil de infecção, com taxa de 25% de indivíduos infectados (Tabela 7).

Tabela 7 - Taxas de infecção em relação ao hábito alimentar do hospedeiro observada através da cultura de sangue de morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).

Hábito alimentar	EFMA	REGUA	Total geral
Carnívoro	0,0%	0,0%	0,0%
Frugívoro	10,9%	12,4%	11,8%
Hematófago	25,0%	50,0%	40,0%
Insetívoro	0,0%	0,0%	0,0%
Nectarívoro	0,0%	40,0%	25,0%
Onívoro	0,0%	0,0%	0,0%
Total geral	10,8%	14,7%	13,3%

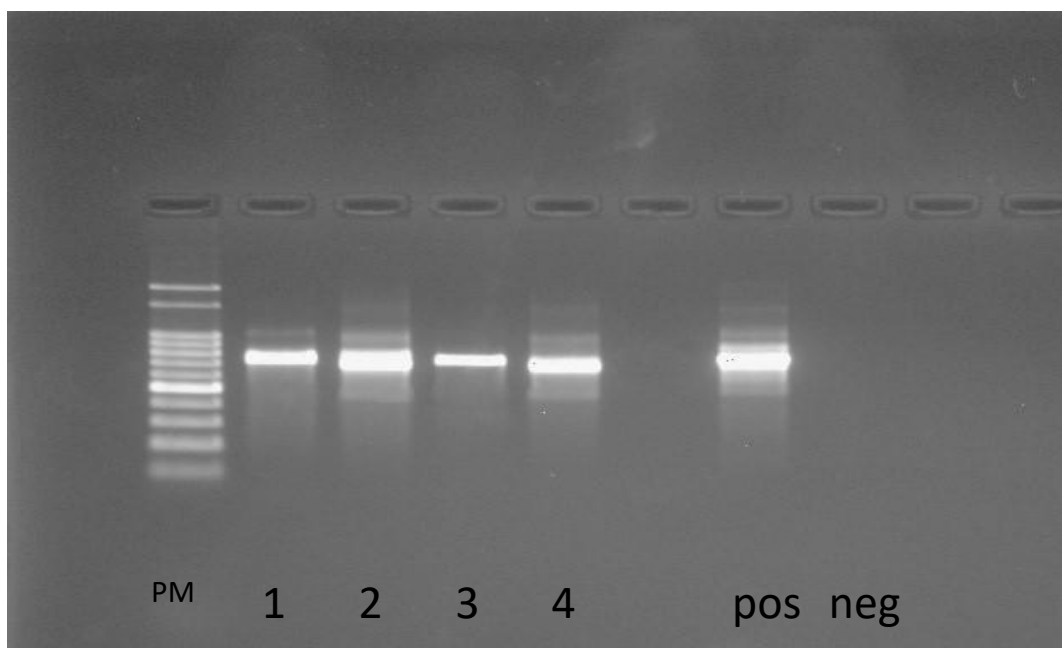
Dos vinte e quatro morcegos positivos, dez (42%) foram positivos somente no meio LIT (oito na REGUA e dois na EFMA), quatro (17%) somente positivos em Schneider (todos oriundos da REGUA) e dez (42%) positivos em ambos os meios (cinco na REGUA e cinco na EFMA). Na tabela 7 estão dispostas as espécies positivas e o(s) meio(s) em que foram positivas, além da obtenção ou não do parasito viável em cultura (isolado).

Na REGUA, dos dezessete morcegos positivos, em oito (47%) deles foi possível o isolamento de parasitos em cultura, enquanto que na EFMA, o sucesso de isolamento de parasitos dentre os morcegos com hemocultivos positivos foi de 86% (6/7). Na REGUA, dos oito isolados, seis foram isolados somente em LIT, enquanto que um foi isolado em meio Schneider e um isolado em ambos. Na EFMA, das sete isolados três foram isolados em LIT, um isolado em Schneider e dois em ambos (Tabela 8).

Como dez morcegos foram positivos tanto no meio LIT como no meio Schneider ficamos com um total de trinta e quatro amostras para serem examinadas. Destas trinta e quatro, obtivemos sucesso no isolamento de dezesseis amostras, as quais foram caracterizadas e encontram-se criopreservadas na COLTRYP. Em dezesseis amostras, apesar de termos visualizado parasitos durante o acompanhamento, as culturas não se estabeleceram e o diagnóstico foi realizado em material de massa celular. Em uma delas (no meio LIT do morcego LBT 7663) não foi possível nem o isolamento e nem a obtenção de massa celular e por isso a amostra não foi caracterizada (Tabela 8).

Todas as trinta e três amostras positivas nas hemoculturas que conseguimos extrair DNA foram submetidas à PCR 18S SSU rDNA e apenas uma delas (LBT 6873) não foi positiva nas duas etapas da reação (Figura 7). Esta amostra, assim como a amostra do LBT 7439 foram positivas na PCR com o alvo gGAPDH, confirmando a infecção por tripanosomatídeos em todas estas amostras.

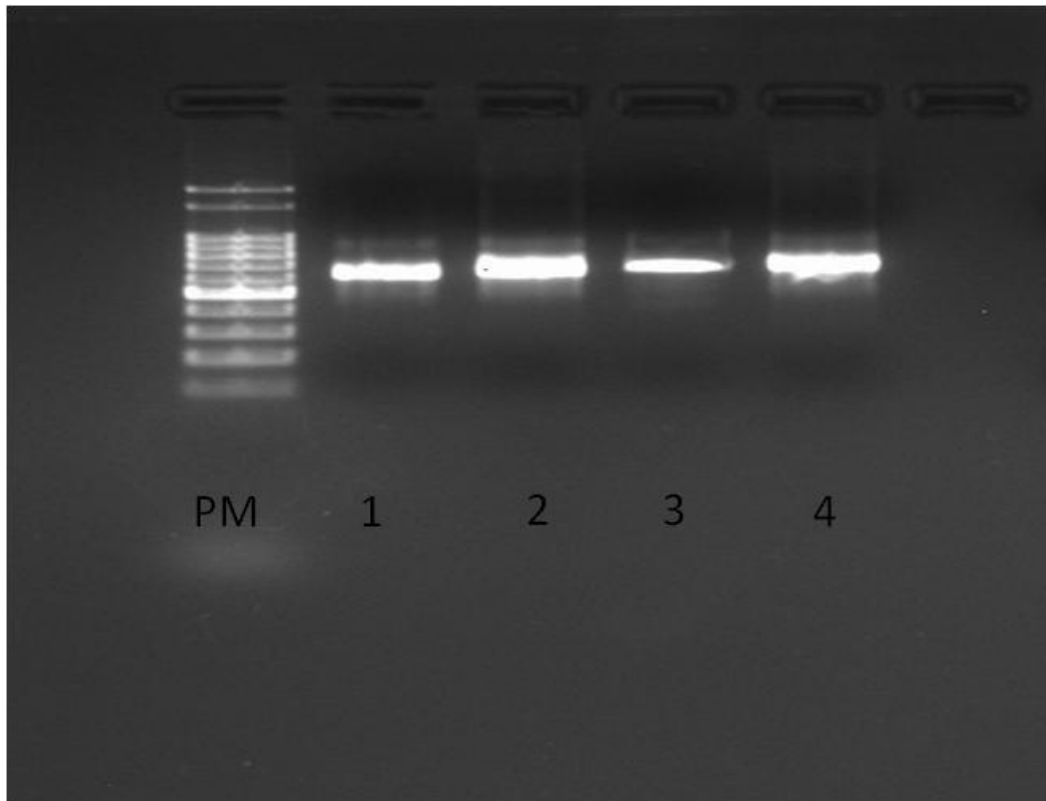
Figura 7 - Foto representativa do gel de Agarose 2% da segunda etapa da reação de PCR utilizando como alvo 18S SSU nas amostras de morcegos com hemoculturas positivas



Legenda: PM) peso molecular, 100pb (com faixa de 100 a 1000); 1)LBT6890; 2)LBT7118S; 3)LBT 7118L; 4)LBT7137; pos) Controle positivo; e neg) Controle negativo.

As trinta e três amostras positivas na PCR 18S SSU rDNA e/ou gGAP-DH foram submetidas à purificação antes do envio à Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz. Conseguimos confirmar a presença de uma banda única após a purificação em todas as trinta e três amostras (Figura 8).

Figura 8 - Foto representativa do gel de Agarose 2% do produto de PCR 18S SSU purificado



Legenda: PM) peso molecular, 100pb; 1)LBT6890; 2)LBT7118S; 3)LBT 7118L; 4)LBT7137.

Nenhuma das 541 culturas de pele, baço ou fígado dos morcegos analisados foi positiva.

Tabela 8 – Número de registro, localização e espécie de morcegos com hemocultivos positivos na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA), indicando o meio de cultura em que foi observada a positividade, o sucesso de isolamento e o resultado da caracterização molecular.

LBT	Local	Espécie	Meio*	Isolamento*	Caracterização alvo 18S SSU rRNA
7439	REGUA	<i>Anoura caudifer</i>	L	Sim (L)	<i>Crithidia mellificae</i> **
7149	REGUA	<i>Anoura geoffroyi</i>	L/S	Não	<i>T. dionisii</i> (L/S)
6873	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Não	<i>Trypanosoma. sp.</i> ^{1**}
6890	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Não	<i>Trypanosoma. sp.</i> ²
7578	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Não	<i>Trypanosoma. sp.</i> ¹
6882	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Sim (L)	<i>T. cruzi</i> Tc I
7557	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Sim (L)	<i>T. dionisii</i>
7137	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	S	Não	<i>T. dionisii</i>
7455	REGUA	<i>Carollia perspicillata</i>	S	Sim (S)	<i>T. dionisii</i>
6889	REGUA	<i>Desmodus rotundus</i>	L	Sim (L)	<i>T. dionisii</i>
7118	REGUA	<i>Desmodus rotundus</i>	L/S	Não	<i>Trypanosoma sp.</i> ² (L/S)
7123	REGUA	<i>Desmodus rotundus</i>	S	Não	<i>Trypanosoma. sp.</i> ²
6875	REGUA	<i>Sturnira lilium</i>	L	Sim (L)	<i>T. dionisii</i>
7138	REGUA	<i>Sturnira lilium</i>	L/S	Não	<i>Trypanosoma.sp.</i> ¹ (L) / - (S)
7148	REGUA	<i>Sturnira lilium</i>	L/S	Sim (L)	<i>T. dionisii.</i> (L) / <i>T. cruzi</i> Tc I (S)
7559	REGUA	<i>Sturnira lilium</i>	L/S	Sim (L/S)	<i>T. dionisii</i> (L/S)
7128	REGUA	<i>Sturnira lilium</i>	S	Não	<i>T. cruzi</i>
6967	EFMA	<i>Artibeus lituratus</i>	L/S	Sim (L)	<i>T. cruzi</i> Tc III (L)/ <i>T. dionisii</i> (S)
7668	EFMA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Não	<i>T. cruzi</i> Tc IV
7666	EFMA	<i>Carollia perspicillata</i>	L	Sim (L)	<i>Trypanosoma. sp.</i> ¹
6968	EFMA	<i>Carollia perspicillata</i>	L/S	Sim (L)	<i>T. dionisii</i> (L/S)
7663	EFMA	<i>Carollia perspicillata</i>	L/S	Sim (S)	<i>T. dionisii</i> (S) - (L)
6973	EFMA	<i>Desmodus rotundus</i>	L/S	Sim (L/S)	<i>T. dionisii</i> (L/S)
6969	EFMA	<i>Sturnira lilium</i>	L/S	Sim (L/S)	<i>T. dionisii</i> (S)/ <i>Trypanosoma.sp.</i> ¹ L

* L= LIT; S = Shneider

** Gene alvo - gGAPDH

¹Picos duplos e/ou similaridade baixa no Blast

²Analisadas filogeneticamente

Dezessete amostras (51%), de treze morcegos diferentes (54%) foram caracterizadas como *T. dionisii*. Dessas dezessete amostras, o DNA obtido da

massa celular em meio Schneider da amostra LBT 6968 apresentou sequências com picos duplos no eletroferograma e, portanto, esta sequência não foi incluída na análise filogenética, apesar da análise por similaridade no Blast ter confirmado a infecção por *T. dionisii* com similaridade de 100% (anexo A). Cabe lembrar que deste mesmo animal, conseguimos isolar e caracterizar os parasitos no meio LIT, confirmando a infecção por *T. dionisii*. Nesta análise, podemos observar que todas as demais 16 amostras estão agrupadas na parte superior da árvore, em clado separado dos demais (Figura 9).

Em relação à origem dos morcegos infectados por este parasito, oito deles foram coletados na REGUA e cinco na EFMA. As espécies de morcegos infectadas foram: *C. perspicillata* (5), *S. liliium* (4), *D. rotundus* (2), *A. lituratus* (1) e *A. geoffroyi* (1). Um destes morcegos, um *A. lituratus* LBT 6967 havia sido positivo nos dois meios de cultura utilizados e, enquanto a população parasitária presente no meio Schneider foi caracterizada como *T. dionisii*, os parasitos isolados em meio LIT foram caracterizados como *T. cruzi* TcIII, confirmando a infecção mista do animal. Situação semelhante foi observada para um *S. liliium* coletado na REGUA (LBT 7148), onde a amostra em LIT foi caracterizada como *T. dionisii* e a amostra em Schneider como *T. cruzi* TcI (Figuras 9 e 10). Um terceiro morcego que apresentou positividade nos dois meios de culturas analisados (LBT 6969) foi confirmado infectado por *T. dionisii* em meio Schneider, mas a identificação da espécie de *Trypanosoma* presente na amostra em LIT não foi possível dada a baixa qualidade e a presença de picos duplos na sequência obtida.

Além dos dois morcegos anteriores com infecção mista com *T. dionisii*, outros 3 morcegos tiveram a infecção confirmada por *T. cruzi*. Um *C. perspicillata* coletado na EFMA (LBT 7668) apresentou identidade de 100% e foi agrupado na árvore filogenética juntamente com outros isolados de *T. cruzi* TcIV (Figuras 9 e 10). A amostra de outro *C. perspicillata* coletado na REGUA (LBT 6882) apresentou identidade acima de 98% para duas DTUs de *T. cruzi* (TcI e TcIV), mas seu posicionamento na árvore filogenética definiu esta população como pertencente a DTU TcI (Figura 11). Já um *S. liliium* coletado na REGUA (LBT 7128) apresentou identidade acima de 98% com as DTUs TcI e TcIV de *T. cruzi*, mas a presença de picos duplos na sequência não possibilitaram sua

inserção na análise filogenética. Por isso, a identificação do parasito em questão limitou-se a *T. cruzi*, sem definição da sua DTU (Figuras 9 e 10).

Um total de quatro amostras, derivadas de três diferentes morcegos (LBT 6890, LBT 7118 e LBT 7123), apresentaram identidade no Blast maior ou igual a 98% para espécies de *Trypanosoma* ainda não descritas e foram definidas apenas como *Trypanosoma* sp. Essas amostras tiveram sequencias similares com espécies de tripanossomas de morcegos neotropicais capturados no Brasil (RNMO63 e RNMO56). Essas amostras foram posicionadas na base da árvore filogenética, agrupadas juntas em um grupo monofilético (Figura 10).

Outras amostras, provenientes dos morcegos LBT 7138, LBT 7578 e LBT 7666 apresentaram baixo percentual de identidade que pudessem definir a espécie de *Trypanosoma* envolvida. De modo geral, estas três amostras apresentaram baixa qualidade de sequencia e presença de picos duplos, e foram definidas apenas como *Trypanosoma* sp. com base nas características morfológicas observadas em cultura e na positividade da reação de PCR usando o gene 18S SSU.

A amostra proveniente do morcego LBT 6873, um *C. perspicillata* coletado na REGUA foi negativa na PCR do 18S SSU, mas positiva quando testada frente ao alvo do gGAPDH. As sequências obtidas, no entanto, foram de baixa qualidade e apresentaram vários picos duplos, impossibilitando a identificação do parasito. Esta amostra também foi classificada como *Trypanosoma* sp.

Figura 9 - Árvore filogenética para o gene 18S pelo método *Máxima Verossimilhança* com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros (K2 + G).

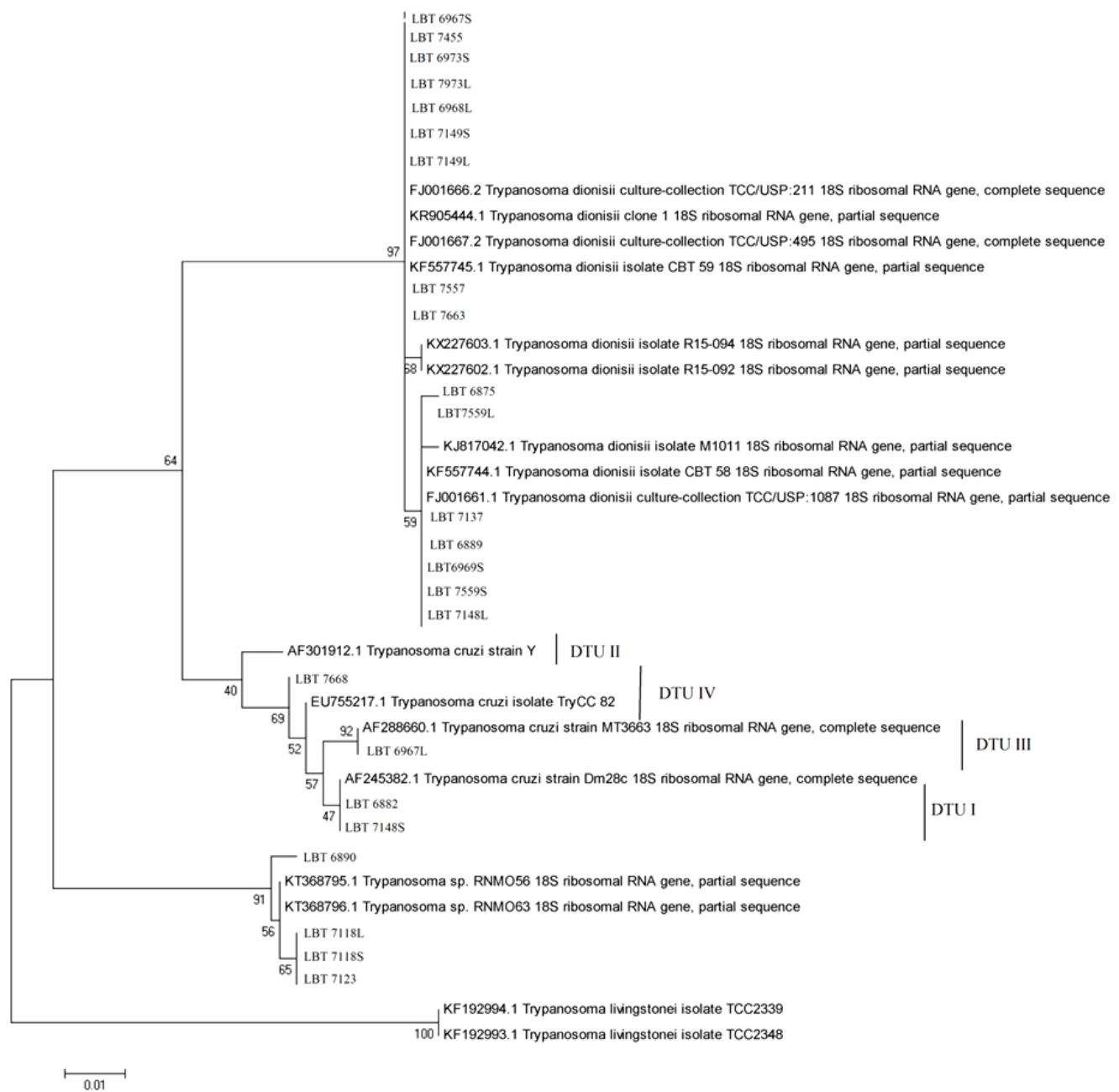
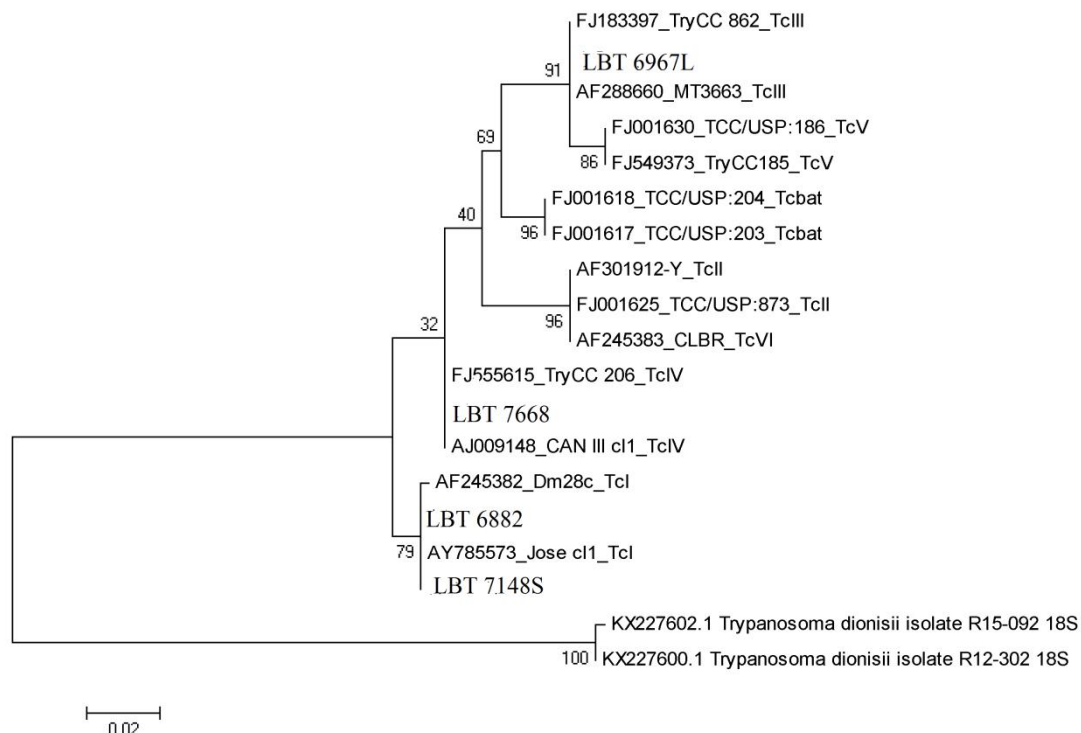


Figura 10 - Árvore filogenética para o gene 18S, para disposição de DTUs, utilizando o método *Máxima Verossimilhança* com base na matriz de distância Kimura 2- parâmetros.



A espécie monoxênica, *Crithidia melifficae* foi isolada de um macho da *Anoura caudifer* (LBT 7439), coletado na REGUA. Este isolado desde o início parecia tratar-se mesmo de um tripanosomatídeo que não pertencente ao gênero *Trypanosoma*, pela presença, em cultura, de formas que se assemelhavam a formas coanomastigotas. De fato, as sequências obtidas na PCR com o alvo 18S SSU sugeriam a infecção por um tripanosomatídeos monoxênico, no entanto as sequências de retorno obtidas no Blast apresentam identidade baixa (próxima a 90%). Esta amostra foi então testada com a PCR com o alvo gGAPDH e a sequência obtida apresentou 99% de identidade com várias sequências de *Crithidia melifficae*, confirmando a infecção. A análise filogenética confirmou a identificação de *C. melifficae*, posicionando este isolado junto a outras sequências de referência da espécie em um único clado, tanto no modelo Kimura 2p, quanto no modelo Tamura Nei (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Árvore filogenética para o gene gGAPDH com o método *Neighbor-joining*, utilizando matriz de distância Kimura 2- parâmetros

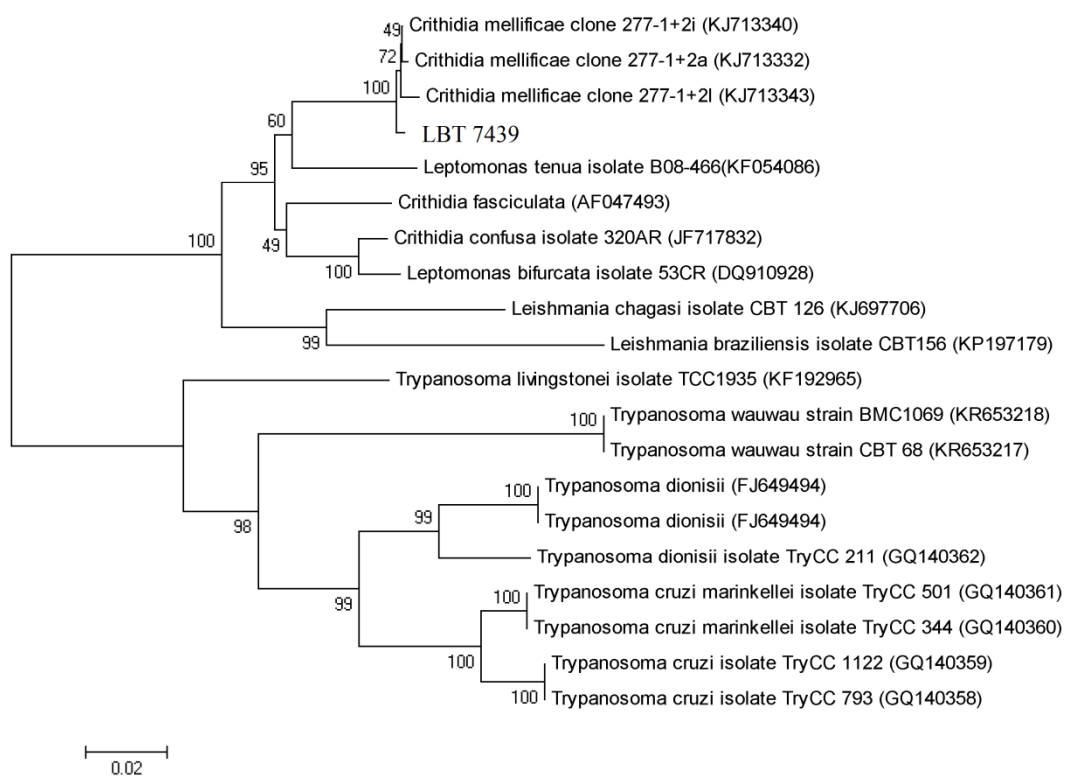
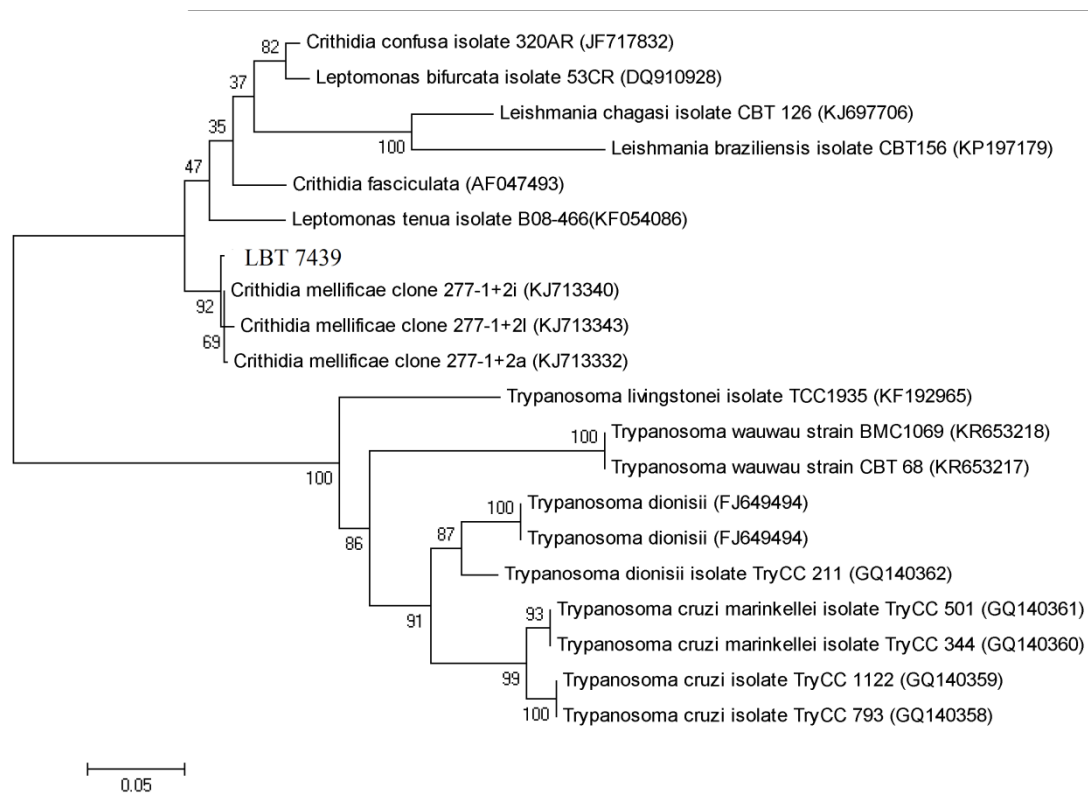


Figura 12 - Árvore filogenética para o gene gGAPDH utilizando o método de *Máxima Verossimilhança*, com base na matriz de distância de Tamura – Nei (TN 93 + G)



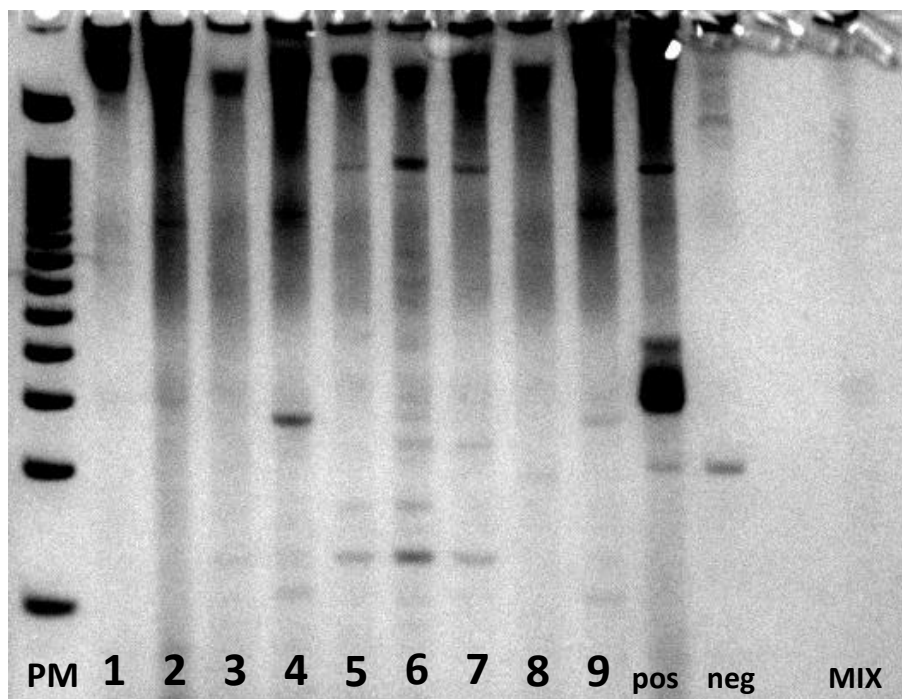
5.4 Análise molecular da infecção pelo gênero *Leishmania*

Os tecidos pele, baço e fígado coletados em etanol absoluto, foram submetidos a PCR com alvo para região do kDNA de *Leishmania*. Ao todo foram encontrados trinta (16,6%) indivíduos infectados por *Leishmania* sp. (detecção do kDNA do parasito em ao menos um dos tecidos analisados) sendo dezessete provenientes da REGUA e treze da EFMA, sem diferença estatística entre as taxas de infecção (15% na REGUA e 20% na EFMA) ($p=0,35$). Estes indivíduos pertenciam a dez espécies diferentes, sendo sete provenientes da REGUA e oito da EFMA (Figura 13).

Na REGUA, as maiores taxas de infecção foram observadas nos pontos 2 (18,8%) e 1 (17,5%), e a menor no ponto 3 (3,6%). Na EFMA houve maior taxa de infecção no ponto 3 (36%), seguida pelo ponto 2 (21,7%) e 1 (4,3%). A

diferença da infecção entre os pontos não foi estatisticamente diferente na REGUA ($p= 0,16$), mas foi na EFMA ($p= 0,03$) (Tabela 9).

Figura 13 – Foto representativa de um gel de poliacrilamida 8% contendo amostras de pele de morcegos provenientes da EFMA testados frente a infecção por *Leishmania* sp. através da reação de PCR utilizando como alvo um fragmento do kDNA destes parasitos.



Legenda: PM) peso molecular, 50pb; 1 a 3, 5, 7 e 8 = amostras negativas; 4,6, e 9, amostras positivas, respectivamente: LBT 6969, 6971, e 6974; controle negativo, controle positivo e controle da Mix.

Tabela 9 – Prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em morcegos capturados em diferentes pontos (1, 2 ou 3) na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).

Ponto	Campo		
	EFMA*	REGUA	Total
1	4,3%	17,5%	12,7%
2	21,7%	18,8%	19,7%
3	36,8%	3,6%	17,0%
Total geral	20,0%	14,7%	16,6%

* Estatisticamente significante ($p<0,05$)

Seis espécies diferentes de morcegos apresentaram infecção por *Leishmania* sp. em fragmentos de pele, sendo cinco espécies provenientes de cada área: *A. caudifer*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus*, *C. perspicillata*, *S. liliium* e *V. pusila*. Verificamos também alguns indivíduos com infecção por *Leishmania* sp em mais de um tecido. Ao todo foram quatro indivíduos infectados tanto na pele como no fígado, sendo três deles na EFMA e um deles na REGUA. A infecção em pele e baço em um mesmo indivíduo foi verificada apenas na REGUA, com duas espécies do gênero *Artibeus* infectadas. Além disso, verificamos infecção somente no fígado em quatro indivíduos, sendo dois na REGUA e dois na EFMA em três diferentes espécies. Não encontramos nenhum morcego cuja infecção por *Leishmania* sp foi confirmada apenas em amostras de baço (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição da infecção por *Leishmania* sp. em tecidos e espécies de morcegos na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).

Tecido/Espécie	EFMA	REGUA	Total
Fígado			
<i>Anoura caudifer</i>	-	1	1
<i>Artibeus lituratus</i>	1	1	2
<i>Carollia perspicillata</i>	1	-	1
Total	2	2	4
Pele			
<i>Anoura caudifer</i>	1	2	3
<i>Artibeus fimbriatus</i>	1	-	1
<i>Artibeus obscurus</i>	1	1	2
<i>Carollia perspicillata</i>	3	4	7
<i>Sturnira liliium</i>	2	4	6
<i>Vampyressa pusila</i>	-	1	1
Total	8	12	20
Pele/Baço			
<i>Artibeus obscurus</i>	-	1	1
<i>Artibeus lituratus</i>	-	1	1
Total	-	2	2
Pele/Fígado			
<i>Artibeus lituratus</i>	1	-	1
<i>Desmodus rotundus</i>	1	-	1
<i>Lonchophylla peracchii</i>	1	-	1
<i>Sturnira liliium</i>	-	1	1
Total	3	1	4
Total geral	13	17	30

Quando observada a infecção por kDNA em cada tecido nas duas áreas, a pele foi o tecido que mais apresentou infecção, com um total de vinte e seis indivíduos infectados (14,4%), sendo quinze (12,9%) deles na REGUA e onze na EFMA (16,9%). O fígado foi o segundo tecido a apresentar maior prevalência de infecção, com oito indivíduos infectados ao todo (4,4%), sendo três (2,6%) na REGUA e cinco (7,7%) na EFMA. Apenas dois (1,1%) indivíduos apresentam infecção em baço, ambos capturados na REGUA.

Avaliando separadamente cada um dos pontos de coleta, pudemos observar que na REGUA, a taxa de infecção por *Leishmania* sp. em morcegos foi maior no ponto 2 (16,7%) para pele e no ponto 1 (5%) para o tecido baço – o único ponto com morcego positivo. Ainda na REGUA, a maior taxa de infecção no fígado ocorreu no ponto 1 (5%), sendo que não foi detectada infecção em nenhum indivíduo do ponto 3.

Na EFMA encontramos maior taxa de infecção por *Leishmania* sp. em morcegos capturados no ponto 3, tanto em pele (31,6%), quanto em fígado (15,8%) (tabela 11). Dado o baixo número amostral por categoria, não foram realizados testes estatísticos para suportar estatisticamente as diferenças observadas.

Tabela 11 – Taxas de infecção por *Leishmania* sp. em tecidos e espécies de morcegos capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).

	EFMA	REGUA	Total
Pele			
1	0,0%	15,0%	9,5%
2	21,7%	16,7%	18,3%
3	31,6%	3,6%	14,9%
Total	16,9%	12,9%	14,4%
Baço			
1	0,0%	5,0%	3,2%
2	0,0%	0,0%	0,0%
3	0,0%	0,0%	0,0%
Total	0,0%	1,7%	1,1%
Fígado			
1	4,3%	5,0%	4,8%
2	4,3%	2,1%	2,8%
3	15,8%	0,0%	6,4%
Total	7,7%	2,6%	4,4%

Considerando a taxa de infecção por *Leishmania* sp. em relação ao hábito alimentar, foi observada uma maior taxa nos morcegos nectarívoros, tanto na REGUA quanto na EFMA. A taxa de infecção para morcegos de hábito hematófago foi a segunda maior na EFMA, enquanto não foi observada infecção em animais com este hábito alimentar na REGUA (Tabela 12).

Tabela 12 – Taxas de infecção por *Leishmania* sp. em morcegos de diferentes hábitos alimentares capturados na Estação Biológica Fiocruz da Mata Atlântica (EFMA) e Reserva Biológica de Guapiaçu (REGUA).

Hábito alimentar	EFMA	REGUA	Total geral
Carnívoro	0%	0%	0%
Frugívoro	18%	14%	16%
Hematófago	25%	0%	10%
Insetívoro	0%	0%	0%
Nectarívoro	67%	60%	63%
Onívoro	0%	0%	0%
Total geral	20%	15%	17%

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho procuramos entender a diversidade de tripanosomatídeos e como ela se distribui através de seus hospedeiros quirópteros, em duas áreas com paisagens diferentes: uma preservada (REGUA), e a outra bem mais degradada (EFMA). Sendo assim, dentro de cada área procuramos algum padrão que revelasse como parasitos e hospedeiros estão condicionados pelas mudanças ambientais; e isso seria testado através da amostragem de hospedeiros e parasitos em pontos de captura com gradiente crescente de preservação. A quiropterofauna semelhante entre as áreas de estudo, apesar do nível distinto de preservação entre elas, resultou em que as taxas de infecção e diversidade de parasitos fossem muito semelhantes entre si.

De acordo com os resultados de captura obtidos, foi detectada maior abundância de morcegos na REGUA, enquanto a riqueza de espécies não foi significativamente diferente entre as áreas: quinze espécies para REGUA e quatorze para a EFMA. Em relação à abundância, podemos associar às questões climáticas, como alta ocorrência de chuva na região da EFMA durante as noites de capturas, principalmente nos meses de novembro e março. Em relação à similaridade na riqueza de espécies, parece que, apesar de as áreas apresentarem um perfil distinto de preservação, os morcegos conseguem se adaptar bem a estas mudanças, uma vez que são capazes de usar ao máximo os recursos que o local ofereça, além de poder dispersar com facilidade no ambiente (Pires *et al.*, 2002; Estrada *et al.*, 2004; Gorresen e Willing, 2004; Bernard e Fenton, 2007; Trevelin *et al.*, 2013).

Foi possível observar que a maior riqueza de espécies ocorreu no ponto intermediário de preservação (ponto 2) na EFMA, enquanto que na REGUA foi no de maior perturbação (ponto 1), o que, ao menos na REGUA, corrobora os dados de Souza e colaboradores (2015) num estudo com comunidade de quirópteros naquela localidade. O ambiente mais antropizado pode fornecer mais recursos de forrageio e de abrigo do que na mata contínua. E ainda, algumas espécies podem se adaptar a um fragmento menos preservado, como *A. lituratus*, que é uma espécie indicadora de ambientes perturbados (Reis *et al.*, 2003). Apesar de na EFMA a riqueza de espécies ter sido maior no ponto 2, a diferença entre os pontos 1 e 2 foi pequena, em comparação com a riqueza

bem menor observada no ponto mais preservado da área (ponto 3). Em ambas as áreas, portanto, áreas com maior influência antrópica apresentaram uma maior riqueza de espécies em comparação com a área de mata mais preservada, reforçando a grande capacidade de adaptação destas espécies a estes ambientes modificados. Cabe ressaltar que as diferenças entre as áreas fazem com que, em termos de degradação ambiental e influência antrópica, o ponto 2 da EFMA não seja tão diferente do ponto 1 da REGUA.

Embora o estado do Rio de Janeiro tenha registro de ocorrência de 8 famílias de quirópteros (Peracchi e Nogueira, 2010), neste trabalho foram capturadas espécies de uma única família, Phyllostomidae, à exceção de um único indivíduo de *Myotis* sp. capturado na REGUA e que pertence a família Vespertilionidae. De fato, a família Phyllostomidae é a mais encontrada nas regiões neotropicais (Fenton *et al.*, 1992), e também é a que possui maior número de espécies (150 espécies) (Simmons, 2005). Além disso, Souza e colaboradores, (2015) também encontraram essas mesmas espécies de filostomídeos na REGUA, e outros trabalhos também reportaram uma grande diversidade de espécies de filostomídeos em áreas florestais do Parque Estadual Pedra Branca e Maciço da Tijuca, região onde localiza a EFMA (Esbérard, 2003). A captura de espécimes pertencentes a outras famílias de morcegos pode ter sido dificultada pela metodologia usada, em função da maior percepção (ecolocalização bem mais desenvolvida) das redes de neblinas por membros destas outras famílias (Portfors *et al.*, 2000; Gorresen *et al.*, 2008).

Outro ponto a ser destacado é que empregamos no trabalho a metodologia de rede de espera. Isso significa que os animais amostrados são apenas aqueles que estão de passagem nos locais onde as redes foram dispostas. A escolha destas áreas seguia sempre possíveis rotas de voos, localizadas próximas a vegetação com presença de frutos. Esta abordagem está intimamente ligada à ecologia de cada espécie, pois algumas espécies ficam mais propensas a serem coletadas devido ao horário de forrageio, organização da colônia, população e, principalmente, o tipo de alimentação. Este fato, aliado a um esforço amostral que, apesar de grande, ainda é insuficiente quando comparado ao esforço amostral descrito em trabalhos de ecologia de populações, resultam em que neste trabalho a riqueza de morcegos observada foi menor do que ob-

servada em outros estudos já conduzidos nas mesmas áreas (Dias, Peracchi e Silva, 2002; Esbérard, 2003; Souza, R. D. F. *et al.*, 2015).

Outro aspecto que explica a maior captura em ambas as áreas de espécies de alimentação predominantemente frugívora, é a altura das redes, capazes de capturar aquelas espécies que voam próximas aos vegetais com floração e frutificação. No caso específico das espécies *C. perspicillata* e *S. liliium*, podemos associar a grande abundância na sua captura à presença de árvores das famílias Piperaceae e Solanaceae, que produzem frutos descritos como preferidos por essas duas espécies, respectivamente (Marinho-Filho *et al.*, 1991; Bizerril e Raw, 1998; Mello, Kalko e Silva, 2008). A espécie *A. lituratus*, que também foi abundante nas duas áreas, possui dieta mais generalista, incluindo espécies das famílias Piperaceae, Solanaceae, Moraceae e Cecropiaceae e do gênero *Ficus*, mas, dependendo da escassez, podem incorporar insetos à sua dieta. Aliás, as três espécies mais abundantes no presente trabalho apresentam como característica a flexibilidade de hábito alimentar, tornando comum o encontro de restos de insetos, folhas e pólen nos estudos com suas fezes (Carvalho, 2008; Leonan *et al.*, 2009).

C. perspicillata foi a espécie mais abundante em todas as capturas em ambas as áreas. Entre as áreas, esta espécie foi mais abundante na REGUA do que na EFMA, provavelmente pelo fato de já ter sido descrito que esta é uma espécie encontrada principalmente em áreas de mata, que são muito mais preservadas na REGUA (Mendes *et al.*, 2014). Em relação à espécie *A. lituratus*, pode ser notado que na EFMA não há diferença no padrão de captura entre os pontos, enquanto que na REGUA é possível observar que sua frequência diminui no ponto de mata mais preservado (ponto 3). Isso pode se traduzir no fato de a EFMA possuir nos três pontos características marcantes de floresta secundária em regeneração, com abundância de espécies vegetais típicas de áreas em processo de regeneração. Outro ponto que explicaria a captura homogênea dessa espécie na EFMA é o fato da espécie se adaptar bem nesses ambientes com interferência antrópica, ser capaz de ocupar diferentes ambientes, percorrer grandes distâncias e possuir uma dieta eclética (Menezes *et al.* 2008). A presença de *P. hastatus* apenas no ponto 1 em ambas as áreas indica a adaptação da espécie à ambientes perturbados. A espécie possui uma dieta variada, incluindo predação de outras espécies de morcegos, e consegue

se abrigar em construções humanas; resultando em sua proximidade com o homem (Esbérard *et al.*, 1994; Oprea *et al.*, 2006). A espécie *P. recifinus*, endêmica do leste do Brasil, foi capturada apenas no ponto 3 para ambas as áreas, sugerindo sua presença ligada a ambientes mais úmidos, de mata fechada e, conseqüentemente, com maior nível de preservação. Apenas 1 espécie carnívora (*C. auritus*) foi detectada nesse estudo, na REGUA. Isso pode se dever ao fato de espécies carnívoras serem mais sensíveis às mudanças antrópicas, devido a alterações de disponibilidade de presas e recursos ambientais (Fenton *et al.*, 1992; Gorresen e Willing, 2004; Meyer e Kalko, 2008).

A observação do parasito no exame a fresco indica elevada parasitemia, uma vez que é sabido que este teste, apesar de rápido e muito específico, é capaz de detectar apenas parasitemias maiores que 10^3 a 10^4 parasitos/ml. Este fato foi observado em um único indivíduo da espécie *S. liliium* (LBT 7559) coletado na REGUA e infectado por *T. dionisii*. A elevada parasitemia foi ainda corroborada pelo fato de termos isolado parasitos nos dois meios de cultura empregados (LIT e Schneider). Os outros vinte e três morcegos positivos no hemocultivo, embora certamente com parasitemias mais baixas que o indivíduo LBT7559, podem ser consideradas potencialmente capazes de infectar um vetor. Isso porque a quantidade de sangue que inoculamos nos meios de cultura é de aproximadamente 0,2 – 0,3mL de sangue, quantidade aproximada de sangue que um triatomíneo é capaz de ingerir durante um repasto sanguíneo (Sant’Anna *et al.*, 2016). Além disso, em dez morcegos infectados, houve positividade nos hemocultivos realizados com os dois meios de cultura inoculados. O nível de parasitemia detectável nos hemocultivos demonstra que há um claro potencial destes hospedeiros em servir de fonte de infecção aos vetores, seja na transmissão de uma mesma espécie de parasito ou mesmo de espécies diferentes nos casos de infecção mista, cenário comum no meio silvestre.

O tipo de abrigo que os morcegos utilizam pode traduzir o perfil de infecção numa região. Neste trabalho, observamos que as espécies de morcegos com hábitos mais generalistas, tais como as que utilizam oco de árvore e construções humanas (abandonadas ou não) como abrigo representaram a maior parte dos infectados. Considerando os resultados do hemocultivo, dos 24 morcegos positivos no hemocultivo apenas 1 indivíduo (*A. lituratus*) não está associado a tais abrigos e sim a palmeiras. Este perfil provavelmente reflete a chan-

ces de encontros entre os morcegos e vetores, os quais podem compartilhar os mesmos abrigos, em especial considerando os triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*, que são mais frequentes na Mata Atlântica. Cabe ressaltar que este perfil é bem diferente do encontrado na Amazônia, onde a infecção está muitas vezes associada a animais que utilizam palmeiras como abrigo devido ao hábito do principal vetor na área (espécies do gênero *Rhodnius*), o qual é considerado raro na Mata Atlântica.

As taxas de infecção no exame parasitológico de sangue entre os morcegos da REGUA e EFMA foram similares (15% na REGUA e 11% na EFMA), sugerindo que não há interferência do grau de preservação das áreas nas taxas de infecção dos parasitos estudados. No que diz respeito aos pontos de amostragem, observamos uma tendência de na REGUA haver maior circulação de parasitos entre os morcegos capturados no ponto 3, que por sua vez foi o ponto onde encontramos a menor riqueza de espécies de morcegos. A variação da taxa de infecção entre os três pontos não foi estatisticamente significativa, e isso pode significar que: (i) que de fato não há diferença entre elas; ou (ii) há diferença, mas esta não pode ser estatisticamente comprovada dado o baixo número amostral para comparação entre os diferentes pontos de uma mesma área. Nesta segunda hipótese, sendo o ponto de menor riqueza de espécies de hospedeiros, aquela com as maiores taxas de infecção, isto estaria de acordo com a teoria proposta por Keesing e colaboradores - “*Dilution Effect*” (Keesing, Holt e Ostfeld, 2006) em que a diversidade do hospedeiro seria inversamente proporcional às taxas de infecção e que isso poderia resultar num maior risco de expansão do ciclo silvestre e ocorrência de casos humanos nas adjacências. Este cenário pode ocorrer através de vários mecanismos, dentre eles podemos citar “redução do encontro”, onde uma alta diversidade do hospedeiro diminuiria a taxa de encontro entre vetores e hospedeiros infectados; e “regulação de hospedeiros susceptíveis”, o que diminuiria o número de hospedeiros suscetíveis no ambiente (Keesing, Holt e Ostfeld, 2006). Já na EFMA, esta teoria não poderia ser aplicada, uma vez que observamos que a infecção estaria positivamente relacionada à diversidade de espécies de morcegos, já que o ponto intermediário apresentou maior número de espécies e também maior taxa de infecção.

Por outro lado, sabemos que os morcegos percorrem muitos lugares numa mesma noite. Por isso, pode ser que a distância entre os pontos definidos neste estudo não tenha sido suficiente para identificarmos algum padrão diferencial, se é que ele existe de fato. Por trabalharmos com um animal com grande capacidade de deslocamento e de grande longevidade, há sempre a necessidade de uma avaliação cautelosa ao estudarmos os cenários de transmissão, que são fortemente influenciados pela biologia do hospedeiro. A presença de um parasito numa espécie de morcego, *a priori*, não pode ser diretamente relacionada ao local onde ele foi capturado. Este animal pode ter se infectado em outra área ou em época mais antiga. Ressalta-se que não conhecemos o perfil de infecção de morcegos por *T. cruzi* e muito menos por *T. dionisii*, que é um parasito sobre o qual não se tem estudos. O padrão de infecção não é traço homogêneo entre os hospedeiros de um parasito, mesmo frente à mesma espécie ou subpopulação de um parasito. Neste sentido, é sabido que infecções em humanos e cães são caracterizadas por um curto período de parasitemia, seguida pelo controle da população parasitária e sua quase não detecção após 30 dias. Por outro lado, gambás (gênero *Didelphis*) conseguem manter altas parasitemias a com DTU TcI por longo tempo, o que não é descrito nas infecções pela DTU TcII. Ao contrário, micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia*) são capazes de manter altas e duradouras parasitemias quando infectados pela DTU TcII (Deane *et al.*, 1984; Lisboa *et al.*, 2015). O que podemos afirmar é que a presença de um morcego infectado por uma dada espécie e/ou genótipo demonstra que esta população parasitária está presente e, potencialmente, pode ser transmitida a outros mamíferos naquela área.

Observamos que as espécies de morcegos com maiores taxas de infecção, detectadas através dos hemocultivos em ambas as áreas são aquelas mais comuns no estado do Rio de Janeiro: *C. perspicillata*, *S. liliium* e *D. rotundus* (Esbérard, 2003; Peracchi e Reis, 2010; Nogueira *et al.*, 2014). Tais espécies conseguem se adaptar bem aos diferentes níveis de preservação da paisagem e, no caso das frugívoras, por terem uma dieta eclética. A espécie *C. perspicillata* é um das espécies neotropicais bem mais distribuídas, e também já foi descrita no Brasil, Colômbia e Bolívia infectada por *T. rangeli*, *T. c. marin-kellei*, *T. dionisii*, e *T. cruzi* das DTUs I, II, III e IV e Tcbat (García *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2014a). A espécie *S. liliium*, apesar de não ser tão frequente

como a espécie anterior, já foi encontrada no Brasil infectada com *T. dionisii* e *T. cruzi* (Nishimura, Filho e Magalhães, 2010; Lima, Espinosa-Álvarez, Ortiz, *et al.*, 2015).

Os morcegos hematófagos (*D. rotundus*) foram os que tiveram maior taxa de infecção para ambas as áreas, apesar do baixo número de animais analisados (1/4 no EFMA e 3/6 na REGUA). Esses animais são restritos à hematofagia (Mayen, 2003), tendo como fonte primária sangue de mamíferos e aves. Tanto na REGUA como na EFMA foram capturados em maior número no ponto 2, o que corrobora com o comportamento desses animais e o encontro desses animais infectados num ponto intermediário de preservação. Estes animais apresentam alta capacidade de mobilidade entre diferentes ecótopos, se alimentando do sangue de animais na área peridoméstica (em especial cavalos, bois, porcos e galinhas). Talvez este conjunto de fontes alimentares preferenciais explica o fato desses animais não serem muito encontrados infectados por *T. cruzi*. Isso porque, entre estas fontes alimentares estão incluídos animais raramente encontrados infectados com este parasito (bovinos e cavalos), animais onde o parasito é normalmente encontrado em parasitemas não detectáveis (porcos), e mesmo animais refratários às infecções por este parasito, como é o caso das aves (Kierszenbaum, Ivanyi e Budzko, 1976). Este fato foi corroborado no presente trabalho, onde não diagnosticamos *T. cruzi* nestes animais e dos quatro morcegos positivos, dois estavam infectados por *T. dionisii* e outros dois como uma espécie de *Trypanosoma* ainda não descrita, mas que não corresponde nem a *T. dionisii* nem *T. cruzi*.

Obtivemos com sucesso a detecção de DNA de *Trypanosoma* spp. também nos tubos de cultura onde foram observados parasitos, mas não houve replicação (e consequentemente isolamento) dos mesmos. Isso resultou num aumento do número de amostras que tiveram seu status taxonômico determinado, de dezessete (que foram isoladas) para vinte e cinco. Há neste processo, no entanto, a limitação de estarmos lidando com amostras que apresentam pouco DNA. Esse fato pode interferir no sucesso das técnicas, já que a recuperação de DNA é comprometida e as sequências obtidas destas podem dificultar o diagnóstico preciso do agente etiológico envolvido. Isso ocorreu em sete amostras.

Uma grande variedade de espécies de tripanossomas tem sido descritas em morcegos por todo o mundo e, até o momento, não há trabalhos que descrevam sintomatologia associada à infecção (Molyneux e Stiles, 1991; Cavazzana *et al.*, 2010). No entanto, é possível que esta informação esteja mascarada em virtude do difícil acesso a esses animais no meio silvestre, em especial no caso daqueles doentes. Lembrando que a metodologia aplicada na maioria dos trabalhos de parasitologia com morcegos (de rede de espera) favorece apenas a captura de animais sadios, que estão com sua capacidade de voo e forrageamento preservadas.

T. dionisii foi a espécie mais detectada nas duas áreas estudo. Conseguimos isolar com sucesso o parasito de dez indivíduos, além de três indivíduos que conseguimos caracterizar os parasitos no material de cultura que não se estabeleceu. Este parasito é descrito infectando morcegos tanto no Novo quanto no Velho Mundo. No Brasil, já foi descrito em todos os demais biomas do país, além da Mata Atlântica (Cavazzana *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2014; Dario *et al.*, 2016). O parasito, apesar de ser descrito como exclusivo de morcegos, pode ser considerado um parasito eclético no que diz respeito à diversidade de espécies de morcegos que é capaz de infectar. Esta diversidade inclui pelo menos vinte espécies de cinco famílias já descritas como hospedeiras, incluindo vários hábitos alimentares. No Brasil, seus hospedeiros conhecidos incluem, entre outras espécies, as mais comuns (*C. perspicillata*, *S. liliium*, *D. rotundus*), da família Phyllostomidae, e também de outras famílias, como *Noc-tiolionidae*, *Vespertilionidae* e *Molossidae* (Marcili, A *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010). Todas as espécies encontradas infectadas no presente trabalho já haviam sido anteriormente encontradas infectadas por este parasito: *S. liliium*, *C. perspicillata*, *D. rotundus* e *A. caudifer*.

Além da infecção simples, foi possível detectar pela primeira vez a infecção mista por *T. dionisii* e *T. cruzi*, sendo concomitante com DTU TcI em *S. liliium* (n=1) e com a DTU TcIII, em *A. lituratus* (n=1). Apesar de associada majoritariamente a infecções em morcegos, ainda não se sabe ao certo como ocorre a transmissão de *T. dionisii*, já que este não se multiplica em triatomíneos. Há uma única descrição de vetor deste parasito, no Velho Mundo, onde o parasito foi encontrado infectando cimiécidos da espécie *C. pipistrellus* (Gardner e Molyneux, 1988). Estes cimiécidos, por sua vez, são descritos co-

mo vetores também de outra espécie de *Trypanosoma* (*T. vespertilionis*), esta restrita ao Velho Mundo. O encontro de morcegos infectados por *T. dionisii* e *T. cruzi* ao mesmo tempo demonstra que este hospedeiro é capaz de manter parasitemias detectáveis em hemocultura por ambos os parasitos ao mesmo tempo, tornando-os potencialmente fontes de infecção ao(s)vetor(es) dos dois parasitos. Importante observar ainda que, dada a semelhança de ciclos de transmissão e nichos que podem ocupar no hospedeiro mamífero, certamente estes dois parasitos competem dentro do mesmo hospedeiro e, ainda assim, podem ser transmitidos no mesmo momento.

Além das infecções mistas, detectamos também infecção simples pelas DTUs I e IV na espécie *C. perspicillata*. As DTUs I, III e IV são frequentemente encontradas em morcegos (Marcili, Arlei *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010), inclusive com infecções mistas, como TcI/TcIV, que é a segunda mais comum, de acordo com Jansen e colaboradores (2015). A DTU TcI, por sua vez, é a mais bem dispersa e mais predominante no bioma Amazônia. Tivemos ainda um indivíduo de *S. liliium* cuja infecção por *T. cruzi* só foi possível ao nível de espécie. O sequenciamento mostrou similaridade com sequências de *T. cruzi*, porém, quando comparado com sequências de *T. cruzi* de diferentes DTUs, o diagnóstico foi dificultado, principalmente pelos picos duplos na sequência obtida.

Em oito morcegos com hemoculturas positivas não conseguimos identificação do agente etiológico envolvido. Desses oito indivíduos, dois *D. rotundus* e um *C. perspicillata* tiveram as sequências de seus parasitos similares à sequências de espécies de *Trypanosoma* ainda não identificadas, e descritas em dois morcegos da espécie *Trachops cirrhosus*, capturados no estado Rio Grande do Norte (Lima, Espinosa-Álvarez, Pinto, *et al.*, 2015). De acordo com a análise filogenética dos autores, esses isolados, juntamente com *T. wawau*, espécie recém descrita infectando morcegos do gênero *Pteronotus*, posicionaram em um agrupamento mais basal dos tripanosomas de morcegos Neotropicais, bem próximo inclusive dos tripanosomas isolados australianos. *T. cirrhosus* é primariamente onívora e possui distribuição por toda a América Central, ocorrendo em todos os biomas, com mais capturas registradas para o estado Espírito Santo e em quarto o Rio de Janeiro, de acordo com Souza e colaboradores (Souza, Tenório e Faria, 2013).

Outros cinco morcegos, das espécies *C. perspicillata* e *S. liliium*, tiveram o resultado das sequências apresentando picos duplos e algumas bases nitrogenadas não definidas. Isso impossibilitou a identificação precisa, resultando num valor baixo de identidade, e baixa similaridade com várias espécies de *Trypanosoma* ao mesmo tempo. É possível observar ainda que o DNA de seis dos oito morcegos que apresentaram este problema foi obtido de massa parasitária não isolada, o que, como reportado acima, é um material escasso e, portanto, difícil de ser trabalhado. Das duas amostras que temos parasitos isolados, uma apresentou problema em apenas em uma das fitas sequenciadas enquanto a outra mostrou identidade baixa apenas com um dos dois meios isolados. Estas amostras necessitariam passar por um processo de clonagem molecular e/ou utilização de outros alvos e técnicas para a determinação da espécie de *Trypanosoma* envolvida.

Pela primeira vez foi detectada a presença de *Crithidia mellificae* na América do Sul. Mais do que isso, este tripanosomatídeo monoxênico foi detectado em sangue de um hospedeiro mamífero, no caso um morcego *Anoura caudifer*, proveniente da REGUA. Esta espécie monoxênica é um dos parasitos mais conhecidos de abelhas da espécie *Apis mellifera* nos Estados Unidos, Europa e Japão. Essa espécie compõe o grupo de parasitos envolvidos em grandes perdas econômicas em países como Estados Unidos, Bélgica, China e Japão, onde a apicultura é frequente. Recentemente essa espécie foi encontrada infectando outra espécie de abelha no Japão – *Apis ceranae ceranae* (yang 2013); além de *V. squamoas*, *Osmia cornuta* e *O. bicornis* nos Estados Unidos (Schwarz *et al.*, 2015).

A população de *Apis mellifera* no Brasil contém populações de origem europeia e africana (híbridas) e foram introduzidas no século XIX, formando hoje subpopulações bem distintas em relação a outros países e com grande adaptação aos diferentes climas do país (Nunes *et al.*, 2012). Apesar disso, não há ainda relatos do Brasil de abelhas infectadas por *Crithidia mellificae*.

Os morcegos da espécie *A. caudifer* são primariamente nectarívoros. Porém, alguns trabalhos reportam o encontro de restos de insetos junto aos de pólen no intestino de indivíduo dessa espécie, evidenciando que tais mamíferos incorporam uma dieta eclética de acordo com oportunidades do meio ambiente. Além disso, um estudo no sudeste do país indicou uma variação sazonal dessa

espécie quanto à dieta (Barros, Rui e Fabian, 2013). Um estudo recente numa área de altitude na Mata Atlântica reportou que pelo menos três das várias famílias de plantas visitadas por abelhas da espécie *A. mellifera* são visitadas também por *A. caudifer* (Wolowski *et al.*, 2016). Há vários cenários possíveis que expliquem como ocorreu esta infecção: (i) por frequentarem o mesmo tipo de planta, o morcego pode ter se infectado através da ingestão do pólen contaminado com excretas de abelhas, uma vez que este parasito é encontrado na porção final do trato digestivo dos insetos; (ii) este morcego ingeriu uma abelha infectada; (iii) uma abelha infectada pode ter desprendido seu ferrão (que normalmente inclui junto a porção final de seu trato digestivo) em um morcego e este ter se infectado ao lamber o local da picada. Esta lambadura (e consequente infecção) pode ter ocorrido a partir do ferrão da abelha inserido nele ou em outro morcego da colônia, dado o hábito desta espécie em lamber os demais indivíduos. Em todas estas situações, nossa hipótese é que a infecção ocorreu pela via oral.

Recentemente, um estudo no Texas detectou pela primeira vez a infecção por um tripanosomatídeo monoxênico em morcego (Hodo *et al.*, 2016). O achado foi em tecido cardíaco da espécie *Todarida braziliensis* e de *Nycticeius humeralis*, pertencente à família Molossidae e Vespertilionidae, respectivamente. Ambos possuem hábito insetívoro, sendo o primeiro abundante na região do estudo e com hábito migratório, podendo ser encontrada também no Brasil. A segunda espécie de morcego é nativa da América do Norte, ainda sem registro no Brasil. Embora sem sucesso de isolamento do parasito, a detecção deste no tecido cardíaco, juntamente com o achado deste presente trabalho, mostra que estes parasitos monoxênicos conseguiram estabelecer infecção num hospedeiro vertebrado (neste caso, morcegos). A questão mais intrigante disso é como este parasito que provavelmente foi ingerido (ou mesmo entrou por alguma lesão de pele) conseguiu ultrapassar as barreiras de defesa do sistema digestivo e atingir outros órgãos, como sangue e/ou coração.

Devemos acrescentar que a espécie encontrada infectada por *Crithidia mellificae* neste trabalho também apresentou positividade para o kDNA de *Leishmania* na pele. Esse dado sugere que: (i) este morcego tinha infecção mista por estes dois parasitos; ou (ii) apesar da reação de PCR frente a kDNA de *Leishmania* sp. ser universalmente empregada em dezenas de trabalhos e tida

como específica deste gênero de parasitos, a banda correspondente a 120 pares de bases observadas na pele deste animal é devida a infecção por *C. mellificae* também neste tecido. Cabe ressaltar que a detecção de *Herpetomonas samuelpessoai* através deste mesmo alvo já foi observada em flebotomíneos, mas nunca ainda em mamíferos (Souza Rocha, de *et al.*, 2010).

Em relação à infecção por *Leishmania* sp., as duas áreas possuem histórico diferentes, como mencionado acima. A zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, especificamente nas áreas do entorno do Maciço da Pedra Branca, foi durante anos considerada endêmica para Leishmaniose Tegumentar, sendo a espécie *L. braziliensis*, o principal agente etiológico na região. Os casos estavam normalmente associados a surtos esporádicos, e incluíam também a área urbana, com casos na região de Jacarepaguá, onde fica a EFMA. Além disso, esta região tem um histórico antigo quanto à existência de um ciclo de transmissão de *L. infantum* em cães (Leishmaniose visceral canina), que se iniciou nos anos 70, na área periurbana ao redor do Maciço da Pedra Branca (zona oeste da cidade). Esse cenário está diretamente associado às práticas de desmatamento, que tornou o espaço comum às principais espécies vetoras existentes naquela região, bem como aos animais domésticos e, consequentemente, o homem. Contrastando com esse cenário, a localidade onde fica a REGUA, Guapiaçu, não tem registro da doença, nem em humanos e nem em cães, embora tenha havido a expansão geográfica das leishmanioses por vários municípios do estado do Rio de Janeiro e recentemente tenha sido notificado um caso de leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, município onde fica a localidade de Guapiaçu, além de poucos casos de leishmaniose tegumentar.

Assim como observado nas taxas de infecção por hemocultivo, a taxa de infecção por *Leishmania* sp. nos morcegos coletados, através da detecção do kDNA do parasito, não diferiu significativamente entre a REGUA e a EFMA. No caso da REGUA, isso demonstra que a ausência de registros e/ou pesquisas no tema em uma localidade não significa que não ocorra a transmissão de parasitos na área. Este mesmo cenário foi observado por Savani e colaboradores (2010), quando pesquisaram infecção por *Leishmania* sp. em morcegos de uma área preservada na cidade de São Paulo, sem casos notificados de Leishmaniose Visceral e poucos casos de Leishmaniose Cutânea e, dentre 683

animais examinados, encontraram infecção por *Leishmania amazonensis* em 18 morcegos e por *L. infatum* em três espécimes. Para região onde fica a EFMA, no entanto, alguns estudos indicavam que, apesar da não mais ocorrência de casos humanos, havia ainda um ciclo silvestre de transmissão do parasito, como observado pelas coletas de flebotomíneos e mamíferos (domésticos e silvestres) infectados. Cenário oposto também já foi observado e, mesmo na presença de outros animais infectados e casos humanos, todos os morcegos investigados na Guiana Francesa (Rotureau, Catzefflis e Carme, 2006) e Espanha (Millán *et al.*, 2014) estavam negativos frente a infecção por *Leishmania* sp.

Dentro de cada área, observamos que a distribuição dos morcegos infectados por *Leishmania* sp. entre os três pontos de coleta foi significativa apenas na EFMA, ocorrendo as maiores taxas de infecção no ponto 3; ou seja, a infecção por *Leishmania* sp. foi mais frequente na área com maior grau de preservação e onde tivemos menor número de espécies (menor riqueza). Nesta área, o gradiente de preservação teve reflexo direto na taxa de infecção (diretamente proporcional), mas não na diversidade de espécies de morcegos. Acreditamos que nesse resultado estejamos registrando a influência de uma comunidade de fauna adjacente que é diretamente influenciada pelo nível de preservação e provavelmente está também inserida nos mesmos ciclos de transmissão. Como resultado, teríamos um ciclo de transmissão mais robusto na área mais preservada, expondo os morcegos desta área a tal ciclo. Um estudo de 2015 na área da EFMA com flebotomíneos já mostrou que a espécie mais encontrada na área, independente do ponto de coleta, *L. intermedia*, circula tanto na área de mata como na área antropizada (Souza, N. A. de *et al.*, 2015). Este dado sugere que a influência nas taxas de infecção dos morcegos refere-se provavelmente mais à outros hospedeiros mamíferos, do que a fauna de vetores. Já na REGUA, a infecção foi nos pontos 1 e 2 e não pode ser relacionada com a riqueza de espécies de morcegos ou grau de preservação do ambiente.

Em ambas as áreas, como observado frente a infecção por *Trypanosoma* spp., a infecção por *Leishmania* sp. prevaleceu entre as espécies de morcego mais comuns: *C. perspicillata*, *S. liliium* e o gênero *Artibeus* (*A. lituratus*, *A. fimbriatus* e *A. obscurus*). Isso mostra que esses animais podem se expor a diferentes ciclos de transmissão, sendo este fato intimamente associado ao

hábito generalista que possuem. Também como observado ao analisarmos as taxas de infecção por hemocultivo, as espécies de morcegos com hábitos mais generalistas e que utilizam oco de árvore e construções humanas (abandonadas ou não) como abrigo representaram a maior parte dos infectados por *Leishmania* sp. Dos 30 animais diagnosticados infectados no presente estudo, apenas 4 indivíduos (*A. lituratus*) utilizam palmeiras e não os locais supracitados como abrigos. Como os morcegos possuem uma alta capacidade de mobilidade e adaptação aos diferentes ambientes, incluindo os ambientes domésticos, estudar as relações ecológicas entre eles e outros seres, bem como avaliar os possíveis cenários de interações com vetores são necessários para entendermos melhor a diversidade de parasitos que esses animais albergam.

Estando estas espécies de morcegos mais generalistas inseridas numa paisagem onde mudanças ambientais, outros hospedeiros e a própria diversidade de parasitos são frequentes, há de se esperar que a dinâmica de infecção se apresente mesmo que minimamente relacionada à disposição desses animais no ecossistema, favorecendo a ocorrência de infecções mistas entre elas. Dos vinte e quatro morcegos infectados por *Trypanosoma* spp., três estavam infectados por *Leishmania* sp., detectado através da PCR frente ao kDNA destes parasitos. Além do *A. caudifer* infectado por *C. mellificae* já mencionado acima, dois *S. liliium* infectados por *T. dionisii* no sangue foram observados infectados por *Leishmania* sp. em amostra de pele.

Podemos observar que, neste estudo, o tecido de maior taxa de infecção foi a pele, com 14,4% dos indivíduos infectados, sendo maior na EFMA do que na REGUA. A detecção do parasito na pele indica um potencial de transmissão aos vetores, por ser este um tecido exposto aos mesmos. Devemos considerar, no entanto, que o diagnóstico positivo foi baseado apenas em análise molecular, e todas as culturas realizadas no mesmo tecido e nos mesmos animais foram negativas. Isso significa que a carga parasitária certamente é baixa, a ponto de não poder ser detectada nas culturas. Além disso, um diagnóstico por PCR confirma a infecção do morcego (é um hospedeiro do parasito), já que detecta partes constitutivas (no caso DNA) dos parasitos, mas não garante a viabilidade do mesmo, ou seja, se ele conseguiria ou não transmitir este parasito a um vetor que venha se alimentar nele. A positividade em PCR, associada com os resultados negativos obtidos nas culturas, indica que possivelmente

esses morcegos não estariam, naquele momento, sendo potenciais transmissores a insetos vetores. No entanto o morcego é o micro-habitat dos parasitos e, sabendo da longevidade desses animais e do fato de que nenhum mamífero é capaz de eliminar completamente a infecção por *Leishmania* sp., o perfil da infecção sempre pode mudar. Assim, é possível que haja alguma modulação pelo próprio parasito na resposta imune desses animais, ou então por outro parasito que venha a infectar o mesmo hospedeiro (co-infecção) e modifique perfil desta infecção. Assim, um animal que neste momento não parece ser um importante transmissor do parasito pode passar a ser.

Observamos que algumas espécies foram positivas em dois tecidos. Os morcegos *A. obscurus* e *A. lituratus* apresentaram infecção na pele e no baço, enquanto que *S. liliium*, *A. lituratus*, *L. peracchi* e *D. rotundus* foram positivas tanto na pele como no fígado. As espécies *A. obscurus*, *V. pusila*, *A. fimbriatus*, *A. caudifer* e *L. peracchi* são descritas pela primeira vez positivas para kDNA de *Leishmania*, sendo ainda *L. peracchi*, restrita à Mata Atlântica, detectada pela primeira vez infectada por um tripanossomatídeo. *D. rotundus*, já foi reportado infectado por *L. infantum* e *L. amazonensis* em área urbana na cidade de São Paulo. Em relação às espécies *S. liliium* e *A. lituratus* foram detectadas com infecção por *L. mexicana*, em Chiapas e Tabasco, (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015), inclusive esta última apresentou lesões na pele típicas de *L. amazonensis*. No Brasil, *A. lituratus* também já foi encontrada infectada por *L. amazonensis* (Savani *et al.*, 2010). A infecção em dois tecidos diferentes pode indicar três possibilidades: (i) trata-se de uma infecção mista por duas espécies diferentes de *Leishmania*, uma em cada tecido; (ii) trata-se de uma mesma espécie de *Leishmania* que está presente em ambos tecidos do mesmo hospedeiro; ou (iii) trata-se de uma infecção mista por uma espécie de *Leishmania* e um outro tripanosomatídeo, como por exemplo, um monoxeno, como já comentado anteriormente para o morcego LBT 7439. Em humanos a infecção por espécies de *Leishmania* está normalmente associada à sintomatologia clínica. Porém essas associações não podem ser extrapoladas para as infecções em animais silvestres, como demonstrado por Cassia-Pires e colaboradores (2014), ao encontrar espécies relacionadas a leishmaniose cutânea humana infectando baço de roedores. De forma inversa, *L. infantum*, relacionada à forma visceral da doença é bastante reportada em pele de cães (Maia *et al.*, 2013). Isso ressalta a impor-

tância de não sugerirmos nenhuma espécie de *Leishmania* relacionada às infecções encontradas no presente trabalho. As caracterizações moleculares confirmatórias ainda serão realizadas e poderão revelar as espécies deste parasito que estão infectando os morcegos.

O estudo do papel dos morcegos como reservatórios de *Leishmania* sp. tem crescido nos últimos anos. A infecção nesses animais pode existir tanto em ambientes endêmicos como em ambientes sem casos reportados (Lima *et al.*, 2008; Savani *et al.*, 2010; Kassahun *et al.*, 2015). Portanto, é de crucial importância avaliar de que forma esses hospedeiros estão inseridos no dinâmico ciclo de parasitos na natureza, bem como entender qual o papel deles em diferentes configurações da paisagem.

Conclusões

- Os diferentes níveis de preservação entre REGUA e EFMA não foram suficientes para influenciar a riqueza das espécies de morcegos, apesar da maior abundância observada na REGUA;
- Ambas as áreas apresentaram perfil similar de infecção por tripanosomatídeos no sangue (15% na REGUA e 11% na EFMA), sendo *T. dionisii* o parasito mais prevalente (54%);
- Os meios de cultivo diferentes LIT ou Schneider parecem não exercer um filtro seletivo na detecção de diferentes espécies de *Trypanosoma* sp.;
- *T. cruzi* foi encontrado infectando morcegos em infecções mistas com *T. dionisii* (TcI e TcIII) ou em infecções simples (TcI e TcIV);
- Registramos pela primeira vez a presença de *Crithidia mellificae* infectando um hospedeiro mamífero;
- A infecção por *Leishmania* spp. também foi similar entre as áreas estudadas (15% na REGUA e 20% na EFMA), com maior taxa de infecção observada no tecido pele (14,4%);
- A pele foi o tecido de maior positividade para kDNA específico para detecção de *Leishmania*, tanto na REGUA quanto na EFMA.;
- *C. perspicillata* é um potencial dispersor de *T. cruzi* em ambas as áreas. Outras espécies envolvidas nesta dispersão são *S. liliium* na REGUA e *A. lituratus* na EFMA.

- Em ambas áreas, as espécies *S. liliun*, *D. rotundus* e *C. perspicillata* são possíveis reservatórios de *T. dionisii*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. DA C. L. *et al.* Survey of Trypanosoma and Leishmania in wild and domestic animals in an Atlantic rainforest fragment and surroundings in the state of Espírito Santo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 3, p. 686–93, 2014.
- AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SORIANO, P. J. Trypanosoma cruzi congenital transmission in wild bats. **Acta Tropica**, v. 109, n. 1, p. 78–80, jan. 2009.
- ARAUJO, A. *et al.* Paleoparasitology: the origin of human parasites. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 9B, p. 722–726, set. 2013.
- ARGIBAY, H. D. *et al.* 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. 11, p. 1358–1368, 25 set. 2016.
- ARIAS, J. R. *et al.* The opossum, Didelphis marsupialis (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of Leishmania braziliensis guyanensis in the Amazon Basin of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 537–541, jan. 1981.
- BAGSTER, I. A.; PARR, C. W. Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. **Nature**, v. 244, n. 5415, p. 364–6, 10 ago. 1973.
- BAKER, J. R. *et al.* Biochemical characterization of some species of Trypanosoma (Schizotrypanum) from bats (Microchiroptera). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 27, n. 3, p. 483–91, maio 1978.
- BARBOSA, A. D. *et al.* Trypanosoma teixeirae: A new species belonging to the T. cruzi clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (Pteropus scapulatus). **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 214–221, 2016.
- BARNABÉ, C. *et al.* Reconsideration of the seven discrete typing units within the species Trypanosoma cruzi, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 176–186, abr. 2016.
- BARNABE, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus Schizotrypanum based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 201–8, fev. 2003.
- BARROS, M. A. S.; RUI, A. M.; FABIAN, M. E. Seasonal Variation in the Diet of the Bat Anoura caudifer (Phyllostomidae: Glossophaginae) at the Southern Limit of its Geographic Range. **Acta Chiropterologica**, v. 15, n. 1, p. 77–84, 2013.
- BERNARD, E.; FENTON, M. B. Bats in a fragmented landscape: Species composition, diversity and habitat interactions in savannas of Santarém, Central Amazonia, Brazil. **Biological Conservation**, v. 134, n. 3, p. 332–

343, 2007.

- BERZUNZA-CRUZ, M. *et al.* Leishmania (L.) mexicana Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2015.
- BIZERRIL, M. X. A.; RAW, A. Feeding behaviour of bats and the dispersal of Piper arboreum seeds in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 109–114, 1998.
- BORGHESAN, T. C. *et al.* Molecular phylogenetic redefinition of Herpetomonas (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. **Protist**, v. 164, n. 1, p. 129–52, jan. 2013.
- BOTERO, A. *et al.* Morphological and Phylogenetic Description of Trypanosoma noyesi sp. nov. : An Australian Wildlife Trypanosome within the T. cruzi Clade. **Protist**, v. 167, n. August, p. 425–439, 2016.
- BRANDÃO, E. M. V. **Pequenos mamíferos infectados por Trypanosoma cruzi e Leishmania spp. em Cumari / GO : mais uma peça do quebra-cabeças que envolve a transmissão desses parasitas na área Pequenos mamíferos infectados por Trypanosoma cruzi e Leishmania spp. em Cumari / G.** [s.l.] Fundação Osealdo Cruz, 2016.
- BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004792, 29 ago. 2016.
- BROWN, J. H. Activity patterns of some neotropical bats. **Journal of Mammalogy**, v. 49, n. 4, p. 754–757, 1968.
- BUITRAGO, R. *et al.* PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among Leishmania strains native to La Paz, Bolivia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 557–563, 2011.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in parasitology**, v. 42, p. 29–112, 1999.
- CAMARGO, R. *et al.* Variant surface glycoproteins from Venezuelan trypanosome isolates are recognized by sera from animals infected with either Trypanosoma evansi or Trypanosoma vivax. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1, p. 17–33, 2015.
- CARTAYA, J. T. Nueva filaria y otros parásitos en la sangre del murciélago Artibeus perspicillatus. **Revta Sanid. Benef. munic. Habana**, v. 3, p. 503–509, 1910.
- CARVALHO, I. D. DE; OLIVEIRA, R. DE; PIRES, A. DOS S. Medium and large-sized mammals of the Reserva Ecológica de Guapiacu, Cachoeiras de Macacu, RJ. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 3, 2014.
- CARVALHO, M. C. DE. **Frugivoria por morcegos em floresta estacional semidecídua: dieta, riqueza de espécies e germinação de sementes após passagem pelo sistema digestivo.** [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, 2008.

- CÁSSIA-PIRES, R. *et al.* Distinct Leishmania Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, p. e3389, dez. 2014.
- CAVAZZANA, M. *et al.* Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 3, p. 345–55, 1 mar. 2010.
- CORREDOR, A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 40, n. 5, p. 480–6, maio 1989.
- COSTA, A. P. DA *et al.* *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, nov. 2015.
- COSTA, A. P. DA *et al.* Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. **Acta Tropica**, v. 164, p. 185–193, 2016.
- COSTA, L. P. *et al.* Biogeography of South American Forest Mammals: Endemism and Diversity in the Atlantic Forest1. **BIOTROPICA**, v. 32, n. 4, p. 872, 2000.
- COTTONTAIL, V. M.; WELLINGHAUSEN, N.; KALKO, E. K. V. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panamá. **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1133–1145, 2009.
- COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.
- CUPOLILLO, E. *et al.* A Revised Classification for Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142–144, abr. 2000.
- D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 956–965, 2015.
- DARIO, M. A. *et al.* Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1–14, 2016.
- DEANE, M. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 513–515, dez. 1984.
- DEANEI, L. M.; SUGAY, W. *Trypanosoma pessoai* n. sp., in vampire bats *Desmodus rotundus* from the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 4, p. 165–9, 1963.
- DEGRAVE, W. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 367–368, set. 1994.

- DESCHAMPS, P. *et al.* Phylogenomic Analysis of Kinetoplastids Supports That Trypanosomatids Arose from within Bodonids. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 53–58, 1 jan. 2011.
- DESQUESNES, M. *et al.* Trypanosoma evansi and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed research international**, v. 2013, p. 194176, 2013.
- DIAS, D.; PERACCHI, A. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá, estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 333–369, 2008.
- DIAS, D.; PERACCHI, A. L. AL; SILVA, S. S. P. DA S. Quirópteros do Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia , Brasil**, v. 19, n. 2, p. 113–140, 2002.
- DIAS, J. P. *et al.* Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. v. 41, n. 3, p. 296–300, 2008.
- DIETRICH, P. *et al.* The Trypanosoma cruzi ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, v. 125, n. 1, p. 103–7, 15 mar. 1993.
- ELP, A. Age determination in bats. *In*: KUNZ T.H (Ed.). . **Ecological and behavioral methods for the study of bats**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1998. p. 47–58.
- ESBÉRARD, C. E. L. *et al.* Análise preliminar dos problemas com morcegos no Município do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). **Anais do I Encontro Brasileiro de Ciências Ambientais**, v. 1, p. 348–362, 1994.
- ESBÉRARD, C. E. L. Diversidade de morcegos em área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil. **Rev. bras. Zoociências Juiz de Fora**, v. 5, n. 2, p. 189–204, 2003.
- ESTRADA, A. *et al.* General bat activity measured with an ultrasound detector in a fragmented tropical landscape in Los Tuxtlas, Mexico. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 27, n. 2, p. 5–13, 2004.
- FENTON, M. B. *et al.* Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the neotropics. **Biotropica**, v. 24, n. 3, p. 440–446, set. 1992.
- FENTON, M. B.; SIMMONS, N. **A world of Science and mystery**. Chicago: The University of Chicago Press, 2014.
- FERMINO, B. R. *et al.* The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of Crocodylus at the Miocene. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 313, 29 out. 2013.
- FIGUEIREDO, F. B. *et al.* First report of natural infection of a bush dog (Speothos venaticus) with Leishmania (Leishmania) chagasi in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 200–201, fev. 2008.

- FLEGONTOV, P. *et al.* Paratrypanosoma Is a Novel Early-Branching Trypanosomatid. **Current Biology**, v. 23, n. 18, p. 1787–1793, set. 2013.
- GAGER, Y. *et al.* Group size, survival and surprisingly short lifespan in socially foraging bats. **BMC Ecology**, v. 16, n. 1, p. 2, 15 dez. 2016.
- GARCÍA, L. *et al.* Phylogenetic Analysis of Bolivian Bat Trypanosomes of the Subgenus Schizotrypanum Based on Cytochrome b Sequence and Minicircle Analyses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36578, 9 maio 2012.
- GARDNER, R. A.; MOLYNEUX, D. H. Schizotrypanum in British bats. **Parasitology**, v. 97 (Pt 1), p. 43–50, ago. 1988.
- GORRESEN, P. M. *et al.* Assessing Bat Detectability and Occupancy with Multiple Automated Echolocation Detectors. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 1, p. 11–17, 2008.
- GORRESEN, P. M. & WILLING, M. R. Landscape responses of bats to habitat fragmentation in atlantic forest of Paraguay. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 4, p. 688–697, ago. 2004.
- GRIMALDI, G. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 6, p. 645–61, jun. 1991.
- HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** Nucleic Acids Symposium Series, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>
- HAMILTON, P. *et al.* Phylogenetic analysis reveals the presence of the Trypanosoma cruzi clade in African terrestrial mammals☆. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81–86, jan. 2009.
- HAMILTON, P. B. *et al.* Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393–1404, 2004.
- HAMILTON, P. B. *et al.* A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the Trypanosoma brucei subgenus, Trypanozoon. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 26–33, 2008.
- HAMILTON, P. B. *et al.* Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, n. 2, p. 521–526, maio 2012.
- HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 15–25, 2007.
- HAMILTON, P. B.; JAMIE R. STEVENS. Classification and Phylogeny of Trypanosoma cruzi. *In: American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Exeter, UK: School of Biosciences,

University of Exeter, 2010. p. 17.

- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “ bat seeding ” hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 136–141, 2012.
- HERNÁNDEZ, R. *et al.* Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 41, n. 2, p. 207–12, jun. 1990.
- HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 25, n. 1, p. 54–8, jan. 1976.
- HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A.; BEUMER, R. J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 22, n. 5, p. 585–91, set. 1973.
- HERRERA, H. M. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 263–275, 10 nov. 2004.
- HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.**, 1972.
- HODO, C. L. *et al.* Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. **Acta Tropica**, v. 164, p. 259–266, dez. 2016.
- 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. 151, n. 1, p. 1–15, 2015.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: Wild hosts and reservoirs. *In*: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.: s.n.]. p. 243–264.
- KALKO EKV, HANDLEY JR CO, H. D. Organization, diversity, and long-term dynamics of a neotropical bat community,. *In*: CODY, M.L. & SMALLWOOD, J. A. (Ed.). . **Long-term studies of vertebrate communities**. [s.l.] Academic Press, 1996. p. 503–553.
- KASSAHUN, A. *et al.* Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 150, p. 166–170, 2015.
- KEESING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology Letters**, v. 9, n. 4, p. 485–498, 31 mar. 2006.
- KENDALL, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the “hotspot” topogenic signal model. **The EMBO journal**, v. 9, n. 9, p. 2751–8, set. 1990.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZKO, D. B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1–6, jan. 1976.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–20, dez. 1980.
- KOSTYGOV, A. Y. *et al.* Molecular revision of the genus *Wallaceina*. **Protist**, v. 165, n. 5, p. 594–604, set. 2014.
- KOSTYGOV, A. Y. *et al.* Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Evolution of Endosymbiosis in Action. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e01985, 15 mar. 2016.
- KUNZ, T. .; KURTA, A. Capture method and holding devices. *In*: KUNZ, T. H. (Ed.). . **Ecological and behavioral methods for the study of bats**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press., 1988. .
- LAINSON, R. *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 239–42, 1979.
- LAINSON, R. *et al.* *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 64, n. 3, p. 200–207, 19 ago. 1989.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; PÓVOA, M. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pianbois” in north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 611–612, jan. 1981.
- LAMPO, M. *et al.* A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). v. 62, n. 6, p. 718–719, 2000.
- LASERGENE. **User’s guide: A manual for the Lasergene System**. [s.l.] Biocomputing Software for Windows, 1994.
- LAVAL, R. . Banding returns and activity periods of some Costa Rican bats. **Southwestern Naturalist**, v. 15, p. 1–10, 1970.
- LEI, M.; DONG, D. Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. **Nature Publishing Group**, n. June, p. 1–8, 2016.
- LEONAN, R. *et al.* Dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) em área urbana na cidade do Rio de Janeiro: frugivoria e novo registro de folivoria. **Chiroptera Neotropical**, v. 15, n. December, p. 487–493, 2009.
- LIMA, H. DE *et al.* Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. v. 103, n. June, p. 412–414, 2008.
- LIMA, L. *et al.* Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. **Protist**, v. 163, n. 6, p. 856–872, 2012.

- _____. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 221, 2013.
- LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ, P. A.; *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 166–177, 2015.
- LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; PINTO, C. M.; *et al.* New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 657, 23 dez. 2015.
- LISBOA, C. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 156, n. 3–4, p. 314–8, 1 out. 2008.
- _____. Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): an 11-year follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 394–402, maio 2015.
- MACKERRAS, M.; MACKERRAS, M. The haematozoa of Australian mammals. **Australian Journal of Zoology**, v. 7, n. 2, p. 105, 1959.
- MAEDA, F. Y. *et al.* Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 141–7, fev. 2012.
- MAIA, C. S. *et al.* Histopathological assessment of the morphology and pigmentation of the skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Medicina Veterinaria**, 2013.
- MAIA DA SILVA, F. *et al.* *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, mar. 2009.
- _____. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *lewisii* from domestic rats to primates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 522–529, maio 2010.
- MARCILI, A. *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–655, 2009.
- MARCILI, A. *et al.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1265–1274, dez. 2009.
- MARINHO-FILHO, J. S. *et al.* The coexistence of two frugivorous bat species and the phenology of their food plants in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 7, n. 1, p. 59–67, 10 fev. 1991.
- MARINKELLE, C. J. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like

- flagellates in *Cavernicola pilosa*. **Revista de biologia tropical**, v. 30, n. 2, p. 107–11, nov. 1982.
- MARINKELLE, C. J.; DUARTE, C. A. *Trypanosoma pifanoi* n. sp. from Colombian bats. **The Journal of protozoology**, v. 15, n. 3, p. 621–7, ago. 1968.
- MARLOW, M. A. *et al.* Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56177, jan. 2013.
- MARQUES, M. J. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n. 1, p. 37–43, jan. 2006.
- MARZOCHI, M. C. DE A. Editorial Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 147–149, 2016.
- MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 50, n. 10, p. 469–72, dez. 2003.
- MELLO, M. A. R.; KALKO, E. K. V.; SILVA, W. R. Diet and Abundance of the Bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian Montane Atlantic Forest. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 2, p. 485–492, abr. 2008.
- MENDES, P. *et al.* DIFERENTES MÉTODOS DE REGENERAÇÃO FLORESTAL PODEM INTERFERIR NA COMUNIDADE LOCAL DE MORCEGOS? v. 21, n. 2, p. 231–240, 2014.
- MENEZES JR., L. F. *et al.* Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 0–0, jun. 2008.
- MERZLYAK, E. *et al.* Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 48, n. 2, p. 161–9, 2001.
- MEYER, C. F. J.; KALKO, E. K. V. Assemblage-level responses of phyllostomid bats to tropical forest fragmentation: land-bridge islands as a model system. **Journal of Biogeography**, v. 35, p. 1711 – 1726, 2008.
- MICHELS, P. A M. *et al.* Tandemly Linked Identical. **The EMBO**, v. 5, n. 5, p. 1049–1056, 1986.
- MILLÁN, J. *et al.* Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1993–1995, 13 maio 2014.
- MIMORI, T. *et al.* Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. **The American journal of tropical medicine and**

- hygiene**, v. 40, n. 2, p. 154–8, fev. 1989.
- MOLYNEUX, D. H.; STILES, J. K. Trypanosomatid--vector interactions. **Annales de la Société belge de médecine tropicale**, v. 71 Suppl 1, p. 151–66, jan. 1991.
- MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Intoduction: the Brazilian atlantic forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786–792, 2000.
- MORRISON, L. J. *et al.* Discovery of Mating in the Major African Livestock Pathogen Trypanosoma congolense. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5564, 15 maio 2009.
- MORSY, T. A.; SALAMA, M. M.; ABDEL HAMID, M. Y. Detection of Leishmania antibodies in bats. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 797–8, dez. 1987.
- MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 51 Pt 1, p. 263–73, 1986.
- MUTINGA, M. J. The animal reservoir of cutaneous leishmaniasis on Mount Elgon, Kenya. **East African medical journal**, v. 52, n. 3, p. 142–51, mar. 1975.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.
- NAIFF, R. D. *et al.* Epidemiological and nosological aspects of Leishmania naiffi Lainson & Shaw, 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 317–321, set. 1991.
- NISHIMURA, S. M. M.; FILHO, H. O.; MAGALHÃES, M. Trypanosomatids in Phyllostomids (Chiroptera, Phyllostomidae) from Perobas Biological Reserve, Paraná, Brazil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama**, v. 13, n. 2, p. 87–91, 2010.
- NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–5, abr. 2009.
- NOGUEIRA, M. *et al.* Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, n. 4, p. 808–821, 2014.
- NOYES, H. A. *et al.* A nested PCR for the ssrRNA gene detects Trypanosoma binneyi in the platypus and Trypanosoma sp. in wombats and kangaroos in Australia. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 2, p. 331–9, fev. 1999.
- NUNES, L. A. *et al.* Variation morphogeometrics of Africanized honey bees (Apis mellifera) in Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 102, n. 3, p. 321–326, 2012.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate 1. **BIOTROPICA**, v. 32, n. 4, p. 793–810, 2000.

- OLIVEIRA, F. M. DE *et al.* First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Elsevier B.V.**, 2015.
- OLIVEIRA, M. P. DE C. *et al.* Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: invasion, intracellular growth, and nuclear localization. **Acta tropica**, v. 110, n. 1, p. 65–74, abr. 2009.
- _____. Tridimensional ultrastructure and glycolipid pattern studies of *Trypanosoma dionisii*. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 548–556, 2013.
- OLIVEIRA, R. R. Os cenários da paisagem. *In*: OLIVEIRA, R. R. (Ed.). **As Marcas do homem na floresta: História Ambiental de um trecho urbano de Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: PUC- Rio, 2005. p. 230.
- OPREA, M. *et al.* Bat predation by *Phyllostomus hastatus*. **Chiroptera Neotropical**, v. 12, n. 1, 2006.
- PAGLIA, A. P. *et al.* **Annotated checklist of Brazilian mammals**. Second ed. [s.l.] Conservation International, 2012. v. 6
- PERACCHI, A. L.; NOGUEIRA, M. R. Lista anotada dos morcegos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, p. 508–519, 2010.
- PERACCHI, A. L.; REIS, N. R. **Mamíferos do Brasil**. [s.l.: s.n.].
- PINTO, C. M. *et al.* Bats, trypanosomes, and triatomines in Ecuador: New insights into the diversity, transmission, and origins of *trypanosoma cruzi* and chagas disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.
- PIRES, A. S. *et al.* Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. **Biological Conservation**, v. 108, n. 2, p. 229–237, 2002.
- PONTES, E. S. **Infecção por Tripanosomatídeos em Pequenos Mamíferos Provenientes de Áreas com Distintos Perfis de Degradação Ambiental no Entorno do Maciço da Pedra Branca, Rio de Janeiro/RJ**. [s.l.] Faculdades São José, 2015.
- PORTFORS, C. V. *et al.* Bats from Fazenda Interales, Southeastern Brazil: species account and comparison between different sampling methods. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 2, p. 533–538, 2000.
- QUARESMA, P. F. *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579–585, out. 2011.
- RAMÍREZ, J. D. *et al.* Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 250–256, 2014a.
- _____. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 7, p. 477–479, nov. 2014b.
- REIS, N. R. DOS *et al.* O que é melhor para manter a riqueza de espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera): um fragmento florestal grande ou vários fragmentos de pequeno tamanho? **Revista Brasileira de**

- Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 225–230, jun. 2003.
- REIS, N. R. DOS *et al.* **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2007.
- REY, L. **Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–75, out. 1990.
- RODRIGUES, A. C. *et al.* Characterization of spliced leader genes of Trypanosoma (Megatrypanum) theileri: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 111, 21 jan. 2010.
- ROQUE, A. L. R. *et al.* Trypanosoma cruzi Transmission Cycle Among Wild and Domestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreaks. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 742–749, 2008.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wildlife Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, dez. 2014.
- ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. SHORT REPORT : ABSENCE OF LEISHMANIA IN GUIANAN BATS. v. 74, n. 2, p. 318–321, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANGER, F. The Croonian Lecture, 1975: Nucleotide Sequences in DNA. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 191, n. 1104, p. 317–333, 2 dez. 1975.
- SANT'ANNA, M. R. V. *et al.* Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. **Journal of Insect Physiology**, 2016.
- SAVANI, E. S. M. M. *et al.* Detection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in Brazilian bats. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 5–10, 26 fev. 2010.
- SCHWARZ, R. S. *et al.* Characterization of two species of trypanosomatidae from the Honey Bee Apis mellifera: Crithidia mellificae Langridge and McGhee, and Lotmaria passim n. gen., n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 567–583, 2015.
- SEIM, I. *et al.* Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat Myotis brandtii. **Nature Communications**, v. 4, p. 2212, 20 ago. 2013.
- SHAPIRO, J. T. *et al.* First record of Leishmania braziliensis presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1,

p. 171–174, 2013.

- SILVA-ITURRIZA, A. *et al.* Trypanosoma evansi kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. **Parasitology International**, v. 62, n. 2, p. 95–99, abr. 2013.
- SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. *In*: WILSON, D. E., REEDER, D. M. (Ed.). . **Mammals Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. [s.l.] Johns Hopkins University Press, 2005. p. p.312-529.
- SIMMONS, N.; VOSS, R. Order Chiroptera. *In*: Wilson, D. E., Reeder, D. M. **Bats. Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 237, p. 1–219, 1998.
- SMITH, A. *et al.* Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial , the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia : Potoroidae). p. 1329–1335, 2008.
- SOS-MATA ATLÂNTICA. **Florestas » A Mata Atlântica**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>>. Acesso em: 8 fev. 2017.
- SOUSA, R. F.; TENÓRIO, R. C. C. O.; FARIA, K. DE C. First record of *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) (Chiroptera: Phyllostomidae) for the state of Mato Grosso, Central-West region, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 6, p. 1527–1529, 2013.
- SOUZA-LIMA, R. DE C. DE *et al.* Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region , Brazilian Amazon. **Brasileira Sociedade Tropical De Medicina**, v. 46, n. November 2011, p. 510–514, 2013.
- SOUZA, N. A. DE *et al.* Studies on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in the Campus FIOCRUZ Mata Atlântica, Jacarepaguá, in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 26–32, fev. 2015.
- SOUZA, R. D. F. *et al.* Bats (Mammalia, Chiroptera) in a remnant of Atlantic Forest, Rio de Janeiro, southeastern Brazil Morcegos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 10, n. 1, 26 nov. 2015.
- SOUZA ROCHA, L. DE *et al.* Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 465–468, 25 jul. 2010.
- STEVENS, J. R. *et al.* The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 5, p. 749–57, maio 1999.
- _____. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite (Paris, France)**, v. 15, n. 3, p. 226–32, set. 2008.
- STEVENS, L. R.; DOVER, H. A.; GIBSON, W. C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes , *Trypanosoma brucei* and *T . cruzi*. 1999.

- STURM, N. R. *et al.* Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 3, p. 269–79, mar. 2003.
- SVOBODOVA, M. *et al.* *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 423–432, 1 fev. 2007.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 3, p. 512–26, maio 1993.
- TEELING, E. C. *et al.* Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. **PNAs**, v. 99, n. 3, 2002.
- TEELING, E. C. Hear, hear: the convergent evolution of echolocation in bats? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 7, p. 351–354, jul. 2009.
- TELLERIA, J. *et al.* Putative Reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub-andean Focus of Bolivia Identified by kDNA-Polymerase Chain Reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, jan. 1999.
- TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis Chagas disease : one hundred years of research**. 2nd. ed. Montpellier: Academic Press, 2017.
- 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. August, p. 559–565, 2007.
- THOMPSON, C. K. *et al.* Morphological polymorphism of *Trypanosoma copemani* and description of the genetically diverse *T. vegrandis* sp. nov. from the critically endangered Australian potoroid, the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata* (Gray, 1837)). **Parasites & vectors**, v. 6, p. 121, 26 abr. 2013.
- THOMPSON, C. K.; GODFREY, S. S.; THOMPSON, R. C. A. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife Trypanosomes of Australian mammals : A review. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 57–66, 2014.
- TRAVI, B. L. *et al.* **Leishmania(Leishmania)chagasi: Clinical and Parasitological Observations in Experimentally Infected Didelphis marsupialis, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis** *Experimental Parasitology*. [s.l: s.n.].
- TREVELIN, L. C. *et al.* Use of space by frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a restored Atlantic forest fragment in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 291, p. 136–143, mar. 2013.
- VELOSO, H. P.; FILHO, A. L. R. R.; ALVEZ, J. C. L. **CLASSIFICAÇÃO DA VEGETAÇÃO BRASILEIRA , ADAPTADA A UM SISTEMA UNIVERSAL**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.
- VICKERMAN, K.; PRESTON, T. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. *In*: W.H.R LUMSDEN; D.A. EVANS (Eds.). . **Biology of the**

- Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. p. 1–34.
- VOTÝPKA, J. *et al.* Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, p. 763–781, 2013.
- _____. *Kentomonas* gen. n., a New Genus of Endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. **Protist**, v. 165, n. 6, p. 825–838, 2014.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental parasitology**, v. 18, n. 1, p. 124–93, fev. 1966.
- WALLACE, F. G. *et al.* Guidelines for the Description of New Species of Lower Trypanosomatids¹. **The Journal of Protozoology**, v. 30, n. 2, p. 308–313, maio 1983.
- WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: background information. A brief history of the diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 28 nov. 2016.
- WILSON, D. E. **The Smithsonian Answer Book**. Washington, DC: Smithsonian Books Wasshington, 1997.
- WOLOWSKI, M. *et al.* Interações planta -polinizador em vegetação de altitude na Mata Atlântica. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 2, p. 07–23, jul. 2016.
- WYNSBERGHE, N. R. VAN *et al.* Retention of *Leishmania* (*Leishmania*) *Mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 595–600, out. 2000.
- YURCHENKO, V. *et al.* Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 63, n. 2, p. 198–209, 2016.
- ZELEDÓN, R.; ROSABAL, R. *Trypanosoma leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 63, n. 2, p. 221–8, jun. 1969.
- ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. v. 104, n. November, p. 1051–1054, 2009.
- ZORTÉA, M. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 1, p. 159–168, 2003.

ANEXO A - Resultados alcançados através do Blast das sequências obtidas com gene 18S SSU e gGAPDH, com sequências já depositadas no Genbank.

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
6890	Trypanosoma sp. RNMO63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	857	857	100%	0.0	98%	gb KT368796.1
	Trypanosoma sp. RNMO56 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	857	857	100%	0.0	98%	gb KT368795.1
6875	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	966	966	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	97%	0.0	99%	gb KJ817042.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	944	944	100%	0.0	99%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	941	941	97%	0.0	99%	gb KJ817044.1
6889	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	929	929	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	99%	0.0	99%	gb KJ817042.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	917	917	99%	0.0	99%	gb KJ817044.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1014 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	99%	0.0	99%	gb KJ817043.1
6968L	Trypanosoma dionisii isolate CBT 59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	100%	0.0	100%	gb KF557745.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	913	913	100%	0.0	100%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:380 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	100%	0.0	100%	gb FJ001656.1
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	907	907	100%	0.0	99%	gb KR905444.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
6882	Trypanosoma cruzi strain Jose clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	944	944	100%	0.0	100%	gb AY785573.1
	Trypanosoma cruzi strain Yuyu 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	939	939	100%	0.0	99%	gb AF245380.1
	Trypanosoma cruzi partial 18S rRNA gene, isolate Las Palomas 196	933	933	100%	0.0	99%	emb LT220279.1
	Trypanosoma cruzi clone 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	100%	0.0	99%	gb KR905435.1
	Trypanosoma cruzi strain Dm28c 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	931	931	100%	0.0	99%	gb AF245382.1
6969L	Trypanosoma cruzi strain MT3663 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	846	846	100%	0.0	97%	gb AF288660.1
	Trypanosoma cruzi isolate TryCC1078 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	845	845	99%	0.0	97%	gb FJ549380.1
	Trypanosoma cruzi clone 7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	100%	0.0	97%	gb KR905439.1
	Trypanosoma cruzi strain TC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	100%	0.0	97%	gb JQ912643.1
6969S	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	952	952	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	937	937	98%	0.0	99%	gb KJ817042.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	931	931	98%	0.0	99%	gb KJ817044.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	928	928	100%	0.0	99%	gb FJ001667.2
6973L	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	959	959	100%	0.0	100%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	100%	0.0	99%	gb KJ817044.1
	Trypanosoma dionisii isolate CBT 59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	97%	0.0	100%	gb KF557745.1
6973S	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	909	909	100%	0.0	99%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	904	904	100%	0.0	99%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	99%	gb KJ817044.1
	Trypanosoma dionisii isolate CBT 59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	98%	0.0	99%	gb KF557745.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
6967L	Trypanosoma cruzi strain MT3663 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1035	1035	100%	0.0	100%	gb AF288660.1
	Trypanosoma cruzi strain TC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1029	1029	100%	0.0	99%	gb JQ912643.1
	Trypanosoma cruzi clone 2.7 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1029	1029	100%	0.0	99%	gb AF359465.1
	Trypanosoma cruzi strain SO3 cl5 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1027	1027	100%	0.0	99%	gb AY785580.1
7148L	Trypanosoma dionisii isolate R15-094 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	329	329	100%	1E-86	99%	gb KX227603.1
	Trypanosoma dionisii isolate R15-092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	329	329	100%	1E-86	99%	gb KX227602.1
	Trypanosoma dionisii isolate R14-230 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	329	329	100%	1E-86	99%	gb KX227601.1
	Trypanosoma dionisii isolate R12-302 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	329	329	100%	1E-86	99%	gb KX227600.1
7148S	Trypanosoma cruzi strain Jose clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1018	1018	100%	0.0	99%	gb AY785573.1
	Trypanosoma cruzi strain Dm28c 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1013	1013	100%	0.0	99%	gb AF245382.1
	Trypanosoma cruzi strain Yuyu 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1013	1013	100%	0.0	99%	gb AF245380.1
	Trypanosoma cruzi partial 18S rRNA gene, isolate Las Palomas 196	1009	1009	100%	0.0	98%	emb LT220279.1
7455	Trypanosoma dionisii isolate R15-094 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	359	359	100%	1E-95	100%	gb KX227603.1
	Trypanosoma dionisii isolate R15-092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	359	359	100%	1E-95	100%	gb KX227602.1
	Trypanosoma dionisii isolate R14-230 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	359	359	100%	1E-95	100%	gb KX227601.1
	Trypanosoma dionisii isolate R12-302 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	359	359	100%	1E-95	100%	gb KX227600.1
7557	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	941	941	100%	0.0	99%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	935	935	100%	0.0	99%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	918	918	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	904	904	97%	0.0	99%	gb KJ817044.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
7663s	Trypanosoma dionisii isolate CBT 59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	859	859	100%	0.0	98%	gb KF557745.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	859	859	100%	0.0	98%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:380 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	859	859	100%	0.0	98%	gb FJ001656.1
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	854	854	100%	0.0	98%	gb KR905444.1
7559L	Trypanosoma dionisii isolate M1011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	905	905	100%	0.0	99%	gb KJ817042.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	905	905	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate CBT 58 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	904	904	99%	0.0	99%	gb KF557744.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:1087 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	904	904	99%	0.0	99%	gb FJ001661.1
7559S	Trypanosoma dionisii isolate CBT 58 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	99%	0.0	100%	gb KF557744.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:1087 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	99%	0.0	100%	gb FJ001661.1
	Trypanosoma dionisii voucher TryCC 633 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	942	99%	0.0	100%	gb EU867812.1
	Trypanosoma dionisii isolate M1011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	100%	0.0	99%	gb KJ817042.1
7439	Crithidia mellificae clone 277-1+2i glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1317	1317	100%	0.0	99%	gb KJ713340.1
	Crithidia mellificae clone 277-1+2a glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1312	1312	100%	0.0	99%	gb KJ713332.1
	Crithidia mellificae clone 277-7+8y(x2) glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1306	1306	100%	0.0	99%	gb KJ713365.1
	Crithidia mellificae clone 277-7+8x(x5) glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1306	1306	100%	0.0	99%	gb KJ713364.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
6873	Trypanosoma sp. kangaroo H25 partial gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, isolate kangaroo H25	1070	1070	99%	0.0	91%	emb AJ620276.1
	Trypanosoma sp. BACO46 glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1066	1066	99%	0.0	91%	gb KT368801.1
	Trypanosoma sp. AB-2016a isolate woylie glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene, partial cds	1062	1062	99%	0.0	91%	gb KU354264.1
6967S	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	782	782	100%	0.0	100%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	782	782	100%	0.0	100%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	774	774	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii partial 18S rRNA gene, isolate gnash, isolate gnash	769	769	99%	0.0	99%	emb FN599057.1
6968S	Trypanosoma dionisii isolate R15-094 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	100%	5E-177	100%	gb KX227603.1
	Trypanosoma dionisii isolate R15-092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	100%	5E-177	100%	gb KX227602.1
	Trypanosoma dionisii isolate R14-230 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	100%	5E-177	100%	gb KX227601.1
	Trypanosoma dionisii isolate R12-302 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	630	630	100%	5E-177	100%	gb KX227600.1
7118L	Trypanosoma sp. RNMO63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	961	961	100%	0.0	99%	gb KT368796.1
	Trypanosoma sp. RNMO56 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	961	961	100%	0.0	99%	gb KT368795.1
7118S	Trypanosoma sp. RNMO63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	965	965	100%	0.0	99%	gb KT368796.1
	Trypanosoma sp. RNMO56 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	965	965	100%	0.0	99%	gb KT368795.1
7123	Trypanosoma sp. RNMO63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	965	965	100%	0.0	99%	gb KT368796.1
	Trypanosoma sp. RNMO56 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	965	965	100%	0.0	99%	gb KT368795.1
	Trypanosoma wauwau strain BMC1069 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	100%	0.0	97%	gb KR653211.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
7128	Trypanosoma cruzi clone 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	665	665	100%	0.0	98%	gb KR905435.1
	Trypanosoma cruzi partial 18S rRNA gene, isolate Las Palomas 196	665	665	100%	0.0	98%	emb LT220279.1
	Trypanosoma cruzi partial 18S rRNA gene, isolate Las Palomas 188	665	665	100%	0.0	98%	emb LT220277.1
	Trypanosoma cruzi partial 18S rRNA gene, isolate Las Palomas 185	665	665	100%	0.0	98%	emb LT220276.1
7137	Trypanosoma dionisii isolate CBT 58 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	800	800	100%	0.0	98%	gb KF557744.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:1087 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	800	800	100%	0.0	98%	gb FJ001661.1
	Trypanosoma dionisii voucher TryCC 633 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	800	800	100%	0.0	98%	gb EU867812.1
7138L	Trypanosoma cruzi isolate TCC515 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	651	651	100%	0.0	95%	gb KT829458.1
	Trypanosoma cruzi isolate TCC 515 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	651	651	100%	0.0	95%	gb KT305917.1
	Trypanosoma cruzi isolate TryCC 540 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	651	651	100%	0.0	95%	gb FJ555616.1
	Trypanosoma cruzi strain Jose clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	651	651	100%	0.0	95%	gb AY785573.1
7138S	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	372	622	74%	6E-99	91%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	366	593	74%	3E-97	91%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	366	598	74%	3E-97	91%	gb FJ001667.2
7149L	Trypanosoma dionisii isolate CBT 59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	898	898	100%	0.0	100%	gb KF557745.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	898	898	100%	0.0	100%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:380 18S ribosomal RNA gene,	898	898	100%	0.0	100%	gb FJ001656.1

Amostra	Espécie identificada	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Nº de acesso
	partial sequence						
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	893	893	100%	0.0	99%	gb KR905444.1
7149S	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:495 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	959	959	100%	0.0	100%	gb FJ001667.2
	Trypanosoma dionisii clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	gb KR905444.1
	Trypanosoma dionisii culture-collection TCC/USP:211 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	937	937	100%	0.0	99%	gb FJ001666.2
	Trypanosoma dionisii isolate M1015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	933	933	99%	0.0	99%	gb KJ817044.1
7578	Trypanosoma rangeli isolate TCC900 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	429	100%	1E-116	97%	gb KT368799.1
	Trypanosoma rangeli isolate 200_AJ_PenaBlanca 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	429	100%	1E-116	97%	gb KM406858.1
	Trypanosoma cruzi isolate Palmascl7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	429	100%	1E-116	97%	gb JF746697.1
	Trypanosoma cruzi isolate AAC1cl3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	429	100%	1E-116	97%	gb JF746684.1
7668	Trypanosoma cruzi isolate TryCC 206 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	961	961	100%	0.0	100%	gb FJ555615.1
	Trypanosoma cruzi isolate TryCC 1441 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	961	961	100%	0.0	100%	gb EU755247.1
	Trypanosoma cruzi 18S rRNA gene, isolate CAN III (clone 1)	961	961	100%	0.0	100%	emb AJ009148.1
	Trypanosoma cruzi clone 6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	100%	0.0	99%	gb KR905438.1
7666	Trypanosoma dionisii isolate R15-094 18S ribosomal RNA gene partial sequence	401	401	99%	3e-108	93%	gb KX227603.1
	Trypanosoma dionisii isolate R15-092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	401	401	99%	3e-108	93%	gb KX227602.1
	Trypanosoma dionisii isolate R14- 230 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	401	401	99%	3e-108	93%	gb KX227601.1
	Trypanosoma dionisii isolate R12-302 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	401	401	99%	3e-108	93%	gb KX227600.1